



Éco	ole doctorale
Sc	iences chimiques   ED 222
	Université de Strasbourg

## ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES IPHC - UMR 7178 Département des Sciences Analytiques

# THÈSE présentée par Laetitia Maidodou

soutenue le 13 décembre 2024

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline/Spécialité : Chimie analytique

## Identification de biomarqueurs de pathologies par GC-MS et développement de protocoles de capture d'odeurs pour la détection olfactive canine

THÈSE dirigée par

MARCHIONI Eric CLAROT Igor

**RAPPORTEURS :** 

FOULON Catherine FERDENZI-LEMAITRE Camille

**AUTRES MEMBRES DU JURY :** 

Professeur, Université de Strasbourg Professeur, Université de Lorraine

Professeure, Université de Lille Chargée de recherches, Centre de Recherches en Neurosciences de Lyon

FROMANTIN Isabelle STEYER Damien Chargée de recherches, Institut Curie, Paris Directeur, Twistaroma, Illkirch-Graffenstaden

# Avertissement au lecteur / Warning to the

# reader

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition des membres de la communauté universitaire. Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Cela implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document. D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction ou représentation illicite encourt une poursuite pénale. This document is the result of a long process approved by the jury and made available to members of the university community. It is subject to the intellectual property rights of its author. This implies an obligation to quote and reference when using this document. Furthermore, any infringement, plagiarism, unlawful reproduction or representation will be prosecuted.

### Code de la Propriété Intellectuelle

### Article L122-4 :

Toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite. Il en est de même pour la traduction, l'adaptation ou la transformation, l'arrangement ou la reproduction par un art ou un procédé quelconque.

Any representation or reproduction in whole or in part without the consent of the author or his successors in title or assigns is unlawful. The same applies to translation, adaptation or transformation, arrangement or reproduction by any art or process whatsoever.

Articles L335-1 à L335-9. : Dispositions pénales / Penal provisions.

# Licence attribuée par l'auteur / Licence attributed by the author



https://creativecommons.org/licenses/?lang=fr-FR

# Laetitia MAIDODOU

## Identification de biomarqueurs de pathologies par GC-MS et développement de protocoles de capture d'odeurs pour la détection olfactive canine

### Résumé

Les Composés Organiques Volatils (COVs) issus du corps humain, sont étudiés pour le développement de méthodes diagnostiques innovantes utilisant l'olfaction canine. Le manque de standardisation des protocoles de prélèvement des COVs est cependant l'un des facteurs limitants, pour parvenir à des applications cliniques. Ce manuscrit comporte une revue des méthodologies les plus pertinentes dans ce contexte. Une étude expérimentale est ensuite menée par Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS). Les limites analytiques de 5 dispositifs (compresse médicale, tube Getxent<sup>®</sup> (Biodesiv), tube Sorbstar<sup>®</sup> (Action Europe), Twister (Gerstel), et patch en Polydiméthylsiloxane (PDMS)) sont comparés. En outre, des supports nanostructurés innovants pour le piégeage sélectif des thiols volatils sont développés. Enfin, des échantillons de sueur issus de 160 individus, positifs à la COVID-19 (symptomatiques ou asymptomatiques) ou négatifs, sont analysés par GC-MS. Trois biomarqueurs sont identifiés par des analyses statistiques. La méthode développée est automatisée, reproductible, et applicable à l'étude de diverses pathologies.

**Mots clés :** Composés Organiques Volatils, Chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de masse, odeur corporelle, olfaction canine, diagnostique de pathologies, COVID-19

### Abstract

The study of Volatile Organic Compounds (VOCs) from the human body is of great interest for disease diagnosis using canine olfaction. However, the lack of standardized VOCs sampling protocols is a limiting factor for clinical applications. This manuscript includes a review of the most relevant methodologies in this context. An experimental study is carried out using Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC-MS). The analytical limits of five devices (medical gauze, Getxent<sup>®</sup> tube (Biodesiv), Sorbstar<sup>®</sup> tube (Action Europe), Twister (Gerstel), and Polydimethylsiloxane (PDMS) patch) are compared. In addition, innovative nanostructured devices for the selective trapping of volatile thiols are developed. Finally, sweat samples from 160 individuals, either COVID-19 positive (symptomatic or asymptomatic) or negative, are analyzed by GC-MS. Three biomarkers are identified through statistical analysis. The method developed herein is automated, reproducible, and applicable to the study of various pathologies.

**Keywords:** Volatile Organic Compounds, Gas Chromatography - Mass Spectrometry, body odor, canine olfaction, disease diagnosis, COVID-19

### **Remerciements**

Avant tout, je tiens à remercier sincèrement Eric Marchioni, mon directeur de thèse, et Igor Clarot, mon co-directeur de thèse, sans qui rien n'aurait été possible. Un grand merci à tous deux pour m'avoir guidée tout au long de ces trois années de thèse, avec une grande bienveillance. Je vous remercie pour votre disponibilité, et vos précieux conseils, pour la réalisation de ces travaux.

De même, je souhaite remercier Damien Steyer, mon responsable scientifique dans l'entreprise Twistaroma, qui m'a soutenue quotidiennement, et inspirée par sa détermination sans faille. Un grand merci Damien de m'avoir permis de m'épanouir professionnellement, depuis cinq ans maintenant, et de m'avoir transmis ta passion pour l'analyse des composés volatils.

Je remercie également notre responsable R&D, Céline Leitao, qui m'a toujours encouragée à donner le meilleur de moi-même, et sans qui je n'aurais peut-être pas osé me lancer dans cette aventure.

Je suis très reconnaissante envers Isabelle Fromantin, pour son soutien scientifique, mais également sa bienveillance et sa sympathie au cours de ces trois années de collaboration.

Je tiens à remercier Michelle Leemans, pour son aide tout au long de ma thèse, ses conseils et ses mots d'encouragements, notamment lors de la rédaction de ma première revue, qui fut un challenge.

*Je remercie la fondation Royal Canin pour son soutien, et toutes les équipes du projet K-DOG, avec qui se fut un plaisir de collaborer.* 

Un grand merci à Catherine Foulon et Camille Ferdanzi-Lemaitre, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, et d'examiner ce manuscrit.

Je remercie Frédérique Retornaz, et l'équipe de l'Hôpital Européen de Marseille, avec qui ce fut très enrichissant d'échanger et de collaborer.

Également, je souhaite remercier les professeurs qui m'ont particulièrement suivie et encouragée au cours de mon cursus universitaire depuis le master, Paul Nkeng, et Antoine Bonnefont.

J'en profite aussi pour remercier mes collègues (dont la plupart ont d'ailleurs accepté volontiers de me faire don de leur sueur pour diverses expériences...).

Lionel, c'était un plaisir de débuter chez Twist à tes cotés. Manon, merci pour tous nos bons moments et nos fous rires partagés, sans oublier tes incroyables gaufres au Nocciolata, les meilleures. Marie-Anaïs, ma binôme de bricolage préférée au labo, que ce soit pour installer un CIS, grimper sur la paillasse la clé en mains, ou expérimenter des branchements douteux, je n'ai que des bons souvenirs partagés avec toi.

Marine G. et P'tite Marine, merci et merci encore, pour vos attentions au quotidien, et pour avoir accepté de me suivre dans le froid pour aliquoter toutes ces compresses. Laura, que dire si ce n'est merci, d'avoir été si présente dans la dernière ligne droite, ta personnalité solaire et ton humour au quotidien ont rendu mes longues journées de

rédaction beaucoup plus joyeuses. Et puis Solène, ma Soso, je ne m'imagine pas une seconde revivre ces trois années sans toi, toujours présente, dans les meilleurs moments comme dans les plus stressants, toujours prête à inverser la tendance en m'embarquant à la Peau d'Vache (ou pire... au Bunny's...:).) quand ce fut nécessaire.

Pour finir, je tiens à remercier ma famille et mes amis, et en particulier mes parents, qui m'ont donné les moyens et encouragée à faire des études. Merci pour tout ! A ma sœur, pour toutes les heures passées au téléphone, et les week-ends où tu m'as chouchouté. A mon frère, pour tout ton soutien et pour avoir été mon premier lecteur. Et je conclue ces remerciements avec mon meilleur ami et partenaire. Merci pour ton soutien permanent et le bonheur incommensurable que tu m'apportes au quotidien depuis que tu es entré dans ma vie.

L'espoir est semblable à un chemin de campagne : le chemin n'a jamais vraiment existé, mais si beaucoup l'empruntent, il finit par apparaître

Une citation de Lin Yutang

# Table des matières

CURRICULUM VITAE	_ 9
PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES	10
LISTE DES FIGURES	12
LISTE DES TABLEAUX	15
LISTE DES ABREVIATIONS	17
	19
CHAPITRE 1: ETAT DE L'ART DES PROTOCOLES DE PRELEVEME	NT,
D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DES COVS DE LA SUEUR ET DE L'AIR EXPI	RE
PAR GC-MS ET PAR OLFACTION CANINE	23
1. COMPOSITION DE LA SUEUR	23
2. COMPOSITION DE L'AIR EXPIRE	25
3. Revue de la litterature	27
1. COMPOSITION DE L'URINE	46
	TU
REVUE DE LA LITTEDATURE	40 //7
CHAPITRE 3: ETUDE EXPERIMENTALE SUR LES SUPPORTS	DE
PRELEVEMENTS DE LA SUEUR	62
PARTIE 1 : COMPARAISON DES TECHNIQUES D'EXTRACTION PAR SPME ET DHS, PO	DUR
L'ANALYSE PAR GC-TOF-MS D'ECHANTILLONS DE SUEUR AXILLAIRE PRELEVES A L'AIDE	DE
TUBES GETXENT CHEZ DES INDIVIDUS SAINS	63
1.1 Matériels et méthodes	63
1.2 Résultats	68
1.3 Conclusion	79
PARTIE 2 : COMPARAISON D'UNE SELECTION DE 5 DISPOSITIFS DE PRELEVEMENT	DE
L'ODEUR CORPORELLE, PERTINENTS POUR L'ANALYSE PAR OLFACTION CANINE ET PAR	GC-
MS	81
2 1 Matériels et méthodes	79

2.2 Résultats et discussion	106
2.3 Conclusion	112
PARTIE 3 : DEVELOPPEMENT DE SUPPORTS NANOSTRUCTURES POUR LE PREL	EVEMENT
SPECIFIQUES DES THIOLS VOLATILS	115
3.1 Matériels et méthodes	115
3.2 Résultats	121
3.3 Conclusion	124
CHAPITRE 4 : IDENTIFICATION D'UN PROFIL CHROMATOGRA	PHIQUE
ASSOCIE A UNE INFECTION PAR LE VIRUS SARS-COV-2	127
1 MATERIELS ET METHODES	 127
1 1 Echantillons	127
1.2 Développement de la méthode d'extraction par Dynamic Headspac	/ _ / _ /
	131
1.3. Méthode d'analyse finale	133
1.4. Pré-traitement des données	135
2. RESULTATS	138
2.1 Méthode d'extraction par DHS	138
2.2 Traitement des données	139
3. DISCUSSION	156
3.1 Identification de potentiels biomarqueurs	156
3.2 Limites de l'étude	159
4. CONCLUSION	160
	162
PERSPECTIVES	165
TRAVAUX AXES SUR LES MATERIAUX ET METHODES DE PRELEVEMENT DES COVS	ISSUS DU
CORPS HUMAIN	165
TRAVAUX AXES SUR LA RECHERCHE DE BIOMARQUEURS DE PATHOLOGIES	168
REFERENCES	169

### Curriculum Vitae

### EXPERIENCE

Nov. 2021 – Déc. 2024 Doctorante Cifre, Responsable de projet R&D, dans l'entreprise Twistaroma à Illkirch-Graffenstaden, et étudiante dans l'équipe de Chimie analytique des molécules bioactives et pharmacognosie (CambaP) au département des sciences analytiques de l'IPHC, à Strasbourg

**Sept. 2020 – Oct. 2021** *Responsable de projet en chimie analytique*, entreprise Twistaroma à Illkirch-Graffenstaden

Développement et optimisation de méthodes d'analyse des Composés Organiques Volatils (COVs) par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et à l'olfactométrie (GC-MS, GC-MS/O) pour les secteurs agroalimentaire et cosmétique.

**Nov. 2019 – Juin 2020 Stagiaire formation ARDAN**, CNAM Grand Est à Strasbourg Stage de 6 mois (management de projet, développement personnel, communication interpersonnelle, management de proximité, marketing - communication, responsabilité sociétale de l'entreprise, stratégie d'entreprise)

**Sept. 2017 – Sept. 2019** *Apprentie ingénieure en chimie analytique* (contrat d'apprentissage), au Syndicat d'assainissement des eaux d'Alsace- Moselle (SDEA) à Schiltigheim

Analyses physico-chimiques des eaux usées dans un laboratoire de contrôle accrédité par le Cofrac selon la norme NF/ISO:17025 (version 2017), contrôle qualité, validation de méthodes

Juin - Juillet 2014 Technicienne en contrôle qualité pharmaceutique (stage), au sein des Laboratoires Pharmaster à Erstein-Kraft

Analyses du Carbone Organique Total (COT) dans les eaux de rinçage des cuves de production dans le cadre d'une validation de nettoyage. Formation aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL)

### FORMATION

**Nov. 2021 – Déc. 2024 –** DOCTORAT CHIMIE ANALYTIQUE, Ecole doctorale des sciences chimiques de Strasbourg (ED222)

**Sept. 2017 – Sept. 2019** - MASTER SCIENCES ANALYTIQUES, CHIMIE, ENVIRONNEMENT, BIOLOGIE en alternance, UNIVERSITE DE STRASBOURG, Mention Assez-Bien

**Sept. 2014 – Sept. 2017** - LICENCE GENERALE en CHIMIE parcours Chimie-Physique, UNIVERSITE DE STRASBOURG

### **Productions scientifiques**

### Congrès nationaux

- Présentation orale en visio-conférence lors de la journée scientifique sur le thème « Matrices Complexes » organisée par le club Grand Est de l'Association Francophone des Sciences Séparatives, le 17 mars 2022. Titre : « Un nouveau souffle pour l'analyse de l'air expiré ». Auteurs : <u>Laetitia Maidodou</u>, Damien Steyer, Eric Marchioni

- Présentation orale lors du congrès SEP2023 à Paris, organisé par l'Association Francophone des Sciences Séparatives du 28 au 29 mars 2023. Titre : « Comparaison des performances de dispositifs de capture d'odeurs pour le diagnostic de pathologies chez l'humain, par olfaction canine et par GC-MS ». Auteurs : <u>Laetitia Maidodou</u>, Damien Steyer, Igor Clarot, Eric Marchioni

- Présentation orale lors du congrès annuel organisé par le Réseau d'Etude de la Santé Humaine par des APproches Evolutives et historiques (RESHAPE), groupe CNRS, à Marseille, du 27 au 28 septembre 2023. Titre : « Capturer et analyser l'odeur corporelle pour la détection de biomarqueurs volatils chez l'Homme : matériaux et méthodes ». Auteurs : <u>Laetitia Maidodou</u>, Damien Steyer, Igor Clarot, Eric Marchioni

- Présentation orale lors de la journée scientifique organisée par le club Grand Est de l'Association Francophone des Sciences Séparatives le 15 mars 2024 « JO 2024, les sciences séparatives entrent en jeu » à Nancy. Titre : « Recherche de biomarqueurs dans la sueur par GC-ToF-MS : Une approche statistique avec l'outil Metaboanalyst ». Auteurs : <u>Laetitia Maidodou</u>, Damien Steyer

### **Congrès internationaux**

- Présentation orale en visio-conférence lors du congrès international : Advances in Pharmaceutical Analysis (APA) 4th International symposium, du 27 au 30 juin 2022. Titre : "Human body odors sampling devices for the detection of diseases biomarkers". Auteurs : <u>Laetitia Maidodou</u>, Damien Steyer, Eric Marchioni

- Présentation orale lors du congrès international « Sciences séparatives au service de la santé » organisé par le club Grand Est de l'Association Francophone des Sciences Séparatives du 6 au 7 novembre 2023 à Liège (Belgique). Titre : « Capture d'odeur chez l'Homme : analyse de compresses par DHS GC-ToF-MS ». Auteurs : Laetitia Maidodou, Damien Steyer, Igor Clarot, Eric Marchioni

- Présentation d'un poster lors du congrès international « Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA) 2024 », du 8 au 12 septembre 2024 à Genève (Suisse). Titre : « Improvements in body odor sampling and analysis for medical diagnosis applications ». Auteurs : <u>Laetitia Maidodou</u>, Damien Steyer, Igor Clarot, Eric Marchioni

### Articles publiés

Maidodou, L.; Clarot, I.; Leemans, M.; Fromantin, I.; Marchioni, E.; Steyer, D. Unraveling the Potential of Breath and Sweat VOC Capture Devices for Human Disease Detection: A Systematic-like Review of Canine Olfaction and GC-MS Analysis. Frontiers in Chemistry. Frontiers Media SA 2023. https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1282450.

L. Maidodou, D. Steyer, M.-A. Monat, M. Leemans, I. Fromantin, E. Marchioni, I. Clarot, Harnessing the potential of sniffing dogs and GC–MS in analyzing human urine: A comprehensive review of sample preparation and extraction techniques, Microchemical Journal 207 (2024) 111907. https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.111907.

### Articles soumis

- En collaboration avec l'Institut Curie, dans le cadre du projet K-DOG, un article décrivant la mesure du seuil de perception olfactif du chien de détection dans une matrice modèle d'urine a été soumis dans la revue PLOS One, le 24 octobre 2024. Titre: *"Exploring canine's olfactive threshold in artificial urine for medical detection"* Auteurs: Michelle Leemans, Sara Hoummady, Emmanuelle Boutin, Adeline Giganti, Laetitia Maidodou, Vincent Cuzuel, Sabrine Ajili, Damien Steyer, Caroline Gilbert, Isabelle Fromantin

### Articles en cours de rédaction

- Les travaux présentés dans le chapitre 4 de ce manuscrit sont en cours de traduction en anglais et de rédaction sous forme d'un article, prévu pour être soumis en début d'année 2025 :

Titre: "A chemometric approach to elucidate COVID-19 biomarkers in sweat samples, analyzed by DHS-GC-ToF-MS"

Auteurs : Laetitia Maidodou, Damien Steyer, Eric Marchioni, Igor Clarot

### Liste des figures

Figure 1 : Schéma de la peau au niveau de la zone axillaire représentant les glandes sébacées, apocrines et eccrines situées dans le derme, ainsi que leurs conduits vers la surface de la peau. La sueur est excrétée par les pores de la peau et les follicules pileux. Figure réalisée sur https://BioRender.com. 24 Figure 2 : Illustration schématique représentant la composition en COVs lors d'une expiration. 26 Figure 3 : Représentation schématique d'une expiration 27 Figure 4 : Illustration d'un tube Getxent<sup>®</sup> (Biodesiv) 63 Figure 5 : Schéma du protocole réalisé pour le prélèvement de sueur à l'aide de tubes Getxent pour les analyses par SPME GC-MS et DHS GC-MS 64 Figure 6 : Illustration du système d'extraction MCTE2501 Markes International Ltd : A : Système vue de l'avant, avec micro-chambres fermées ; B : Micro-chambres ouvertes, vues d'en haut. 65 Figure 7 : Illustration des tubes Tenax TA après l'extraction, réceptionnés au laboratoire de Twistaroma (Strasbourg) 66 Figure 8 : Chromatogrammes (TIC) d'un tube Tenax TA blanc (A), de l'extrait du tube Getxent blanc (B), et d'un échantillon de sueur (C), analysés par DHS-GC-ToF-MS. 69 Figure 9 : Chromatogrammes (TIC) d'un blanc (vial vide) (A), d'un tube Getxent blanc (B), et d'un échantillon de sueur (C), analysés par SPME-GC-ToF-MS\_ 70 Figure 10 : Diagramme en barres représentant le nombre (Nb) de COVs identifiés par SPME et/ou DHS FS-ToF-MS par familles chimiques 77 Figure 11 : Diagrammes en barres représentant les surfaces de pics des 20 COVs significativement différents (p-value < 0,05) entre les extraits par DHS et les extraits par SPME 78 Figure 12 : Illustration d'un patch PDMS (découpé au laboratoire) tenu avec une pince 82 Figure 13 : Illustration d'un tube Sorbstar (Action Europe) tenu avec une pince 83 Figure 14 : Courbe d'épuisement représentant la somme des surfaces de pic des 10 siloxanes majoritaires relargués par les patch PDMS, en fonction du nombre de cycles de conditionnement dans l'éthanol au bain ultrasons 87 Figure 15 : Chromatogrammes (TIC) d'un patch en PDMS non conditionné (A) en haut, et d'un patch conditionné aux ultrasons dans 4 x 1 mL d'éthanol, en bas (B) 88 Figure 16: Chromatogrammes (TIC) d'une compresse analysée avant conditionnement (A). en haut, et après conditionnement (B), en bas. 89 Figure 17 : Chromatogramme TIC de la solution analysée à t0 par SPME GC-ToF-MS. Les composés sont numérotés et annotés dans le Tableau 6. 96 Figure 18 : Représentation graphique des surfaces de pics du 3-méthyl-3-sulfanylhexan-1-ol de t0 à t+9 jours. Les points bleus correspondent à la moyenne des surfaces de pics, et les points gris aux valeurs individuelles : les barres d'erreurs correspondent aux coefficients de 97 variation (n=3). Figure 19 : Schema du protocole pour l'analyse de la solution étalon de sueur et des solutions diluées, analysées par DHS GC-ToF-MS 98 Figure 20 : Protocole mis en œuvre pour mimer un prélèvement de composés volatils par les dispositifs de capture d'odeurs à l'aide de la solution de sueur étalon 102 Figure 21 : Droite d'étalonnage de l'octanal, avec les patchs PDMS analysés par TD-GC-ToF-106 MS Figure 22 : Droite d'étalonnage du trans-2-nonenal avec les Twisters par TD-GC-ToF-MS107 Figure 23 : Droite d'étalonnage du 6-methyl-5-hepten-2-one avec les tubes Sorbstar par TD-GC-ToF-MS 108 Figure 24 : Droite d'étalonnage du 1-décanol pour les compresses par DHS-GC-ToF-MS 109 Figure 25 : Droite d'étalonnage du trans-2-nonenal pour les tubes Getxent par DHS-GC-ToF-110 MS

Figure 26 : Schéma du protocole de préparation des supports en PDMS nanostructurés 116 Figure 27 : Illustration des Twisters avant fonctionnalisation, après dépôt de 5 couches de nanoparticules, et après dépôt de 10 couches de nanoparticules (photographies réalisées au laboratoire CITHEFOR, Nancy) \_\_\_\_\_\_ 117

Figure 28 : Schéma représentant le protocole de désorption liquide des supports nanostructurés \_\_\_\_\_\_\_\_\_120

Figure 29 : Courbe d'épuisement représentant les surfaces de pics du 1-octanethiol et du 3-MHA en fonction du nombre de bains dans le DTT, utilisé comme solvant de désorption. 121 Figure 30 : Graphique représentant les surfaces de pics du 1-octanethiol et du 3-MHA en fonction du nombre de cycles de désorptions (de 1 à 3 bains) en fonction du solvant utilisé (DTT dans l'éthanol ou éthanol). \_\_\_\_\_\_122

Figure 31 : Graphique représentant les surfaces de pics du 3-MHA dans la solution de DTT analysée après la première désorption des patchs nanostructurés et des patchs classiques. Les barres d'erreur correspondent aux coefficients de variation des moyennes des surfaces de pics (n=3). \_\_\_\_\_\_ 122

*Figure 32: Graphique représentant les surfaces de pics des thiols identifiés par TD GC-MS/SCD avec les Twisters classiques et les Twisters nanostructurés. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types des valeurs moyennes (n=3).* 123

Figure 33 : Photographies illustrant le transfert des échantillons des sacs Diagnobag (à droite), aux vials utilisés pour l'analyse par DHS GC-ToF-MS. 130

Figure 34 : Schéma représentant les différentes étapes de l'extraction par DHS et les paramètres pouvant être optimisés (avec le module DHS automatisé, Gerstel). La première étape est l'incubation. La seconde étape est une pré-purge pour éliminer l'excédent de solvant ; non réalisée dans cette étude. L'étape 3 est le trapping, permettant de piéger les COVs dans la phase adsorbante. L'étape 4 correspond au séchage de l'adsorbant. L'étape 5 correspond à la thermodésorption du tube adsorbant dans le système GC-MS. Les points rouges représentent les COVs piégés lors de l'étapes 3 ; les points bleus représentent les molécules d'eau ; les points verts représentent les COVs non retenus par la phase adsorbante. 132

Figure 35 : Schéma du protocole analytique illustrant les étapes d'extraction par DHS, désorption thermique et injection des COVs dans le système d'analyse par GC-ToF-MS 134 Figure 36 : Schéma représentant la normalisation des données brutes par centrage et réduction d'échelle \_\_\_\_\_\_ 137

Figure 37 : Graphique des effets principaux pour la moyenne des COVs. \_\_\_\_\_\_ 138 Figure 38 : Diagrammes en barres représentant les surfaces de pics des composés en fonction de la température et du débit d'azote. Les barres d'erreur représentent les coefficients de variation des valeurs moyennes (n=2). \_\_\_\_\_\_ 139

Figure 39 : Schéma résumant les principales étapes du traitement des données collectés par DHS-GC-ToF-MS, ainsi que les outils (méthodes et logiciels) utilisés. \_\_\_\_\_\_\_140 Figure 40 : Graphique des intervalles représentants les valeurs normalisées du 2-éthyl hexanol, en fonction du facteur « fumeur » ou « non-fumeur ». Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95% des valeurs moyennes (pour le groupe des « fumeur » n =36 ; pour le groupe « non-fumeurs » n = 124). \_\_\_\_\_\_\_141 Figure 41 : Diagramme des scores de l'ACP représentant les 160 échantillons de sueur, selon les deux composantes principales, à gauche ; diagramme des contributions des variables, à droite. Les variables considérées sont les 32 COVs identifiés par ANOVA (p-valeur <0.05).

143

Figure 42 : Diagramme des scores de l'ACP représentant les 50 individus positifs asymptomatiques et des 60 témoins non infectés, selon les deux composantes principales, à gauche ; diagramme des contributions des variables, à droite. Les variables considérées sont les 20 COVs identifiés par t-test (p-valeur <0.05). \_\_\_\_\_\_\_\_144

Figure 43 : Graphiques des intervalles représentant les surfaces de pics normalisées du styrène, en fonction du groupe d'échantillons. Les barres d'erreurs correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. Les \* indiquent que la p-value est significative (p < 0,05). \_\_\_\_\_\_ 147

Figure 44 : Graphiques des intervalles représentant les surfaces de pics normalisées de l'acétylacétone, en fonction du groupe d'échantillons. Les barres d'erreurs correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. Les \* indiquent que la p-value est significative (p < 0,05). 149 Figure 45 : Graphiques des intervalles représentant les surfaces de pics normalisées du toluène, en fonction du groupe d'échantillons. Les barres d'erreurs correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. Les \* indiquent que la p-value est significative (p < 0,05). 150 Figure 46: Exemple d'un chromatogramme (TIC) (F, 42 ans, groupe témoins sains). Les étalons internes (Octanoic acid 1-<sup>13</sup>C et Linalool-D<sub>3</sub>) sont indiqués en bleu sur le chromatogramme. 151

Figure 47 : Courbe ROC représentant les résultats du modèle de classification binaire généré à partir de l'ensemble des données. \_\_\_\_\_\_153

Figure 48 : Graphiques des scores de l'analyse par PLS-DA154Figure 49 : Courbe ROC représentant les résultats du modèle de classification binaire généré154avec les échantillons prélevés à partir du 20 août 2021155

### Liste des tableaux

Tableau 1 : Identifiant CAS, Temps de Rétention (TR, en min), nom usuel et formule brute des composés détectés et identifiés par DHS et/ou SPME GC-ToF-MS indiqués par une croix dans les colonnes DHS et/ou SPME. Dans la dernière colonne du tableau, l'origine possible de ces COVs dans la sueur est indiquée (d'après la base de données HMDB (Human Metabolome Database), consultée le 10/10/2024 sur le site https://hmdb.ca/,et les références cités). Les composés identifiés sur les chromatogrammes présentés précédemment sont indiqués en gras \_\_\_\_\_\_71

Tableau 2 : Méthode d'analyse des dispositifs et paramètres analytiques 85 Tableau 3 : Nom des composés organiques volatils (COVs) sélectionnées pour l'étude, famille chimique, valeurs théoriques des LogP des pressions de vapeur saturante des COVs 92 Tableau 4 : Numéro CAS, nom usuel, formule brute, référence et pureté des étalons analytique utilisés ; \*Ces composés font partie d'un mélange commercial (Volatile Free Acid Mix, référence CRM46975, Supelco) 93 Tableau 5 : Volumes de solutions étalons stocks et concentrations finales des COVs dans la 94 solution artificielle Tableau 6 : Numérotation et temps de rétention (TR) en min des COVs du mélange de sueur modèle 96 Tableau 7 : Concentrations en ng/µL des COVs dans les solutions diluées du mélange étalon. nommées solutions S0 à S4 99 Tableau 8 : Limites de quantification (LQs) instrumentales. Les COVs sont classés par ordre d'élution (temps de rétention croissants) 100 Tableau 9 : Volumes des solutions étalons ajoutés dans chaque vial et quantités de COVs correspondantes mises en contact avec les dispositifs 103 Tableau 10 : Concentrations des dilutions par 2, 4, 8 et 16,6 de la solution étalon en ng/µL pour l'ajout de 5 niveaux de gamme supplémentaires ; et quantités de COVs correspondant à ces 5 niveaux d'étalonnages 104 Tableau 11 : lons majoritaires pour chaque COV ; les ions utilisés pour la quantification (ions « Quantifier ») sont indiqués par une police en gras. Le ratio 1 correspond au rapport de l'ion Qualifier 1 / ion Quantifier, et le ratio 2 correspond au rapport de l'ion Qualifier 2 / ion Quantifier : les ratios sont exprimés en %. 105 Tableau 12 : Limites de quantification (LQs) en ng des COVs du mélange artificiel, avec les différents systèmes de prélèvement, et coefficients de détermination R<sup>2</sup> des droites d'étalonnages ; NA : Non Applicable ; les LQs sont en gras dans le tableau pour permettre une meilleure lisibilité ; LD signifie Limites de Détection 111 Tableau 13 : Bilan comparatif des performances de sensibilité et sélectivité des 5 dispositifs 113 étudiés Tableau 14 : Concentration des thiols en solution 119 Tableau 15 : Quantité thiol en nmol dans chaque vial 119 Tableau 16 : Description de la population étudiée 128 Tableau 17 : Numéro CAS, nom usuel, pureté et concentrations des COVs 131 Tableau 18 : Désignation des termes fréquemment employés dans cette partie du rapport 136 Tableau 19 : Potentiels biomarqueurs détectés par DHS GC-ToF-MS, et putativement identifiés par spectrométrie de masse (MS) et indices de rétention (RI), et confirmé par le standard analytique lorsque le laboratoire en dispose (cas unique du styrène), dans les échantillons selon des analyses statistiques par ANOVA, et par t-test 145 Tableau 20 : Comparaison des valeurs moyennes pour le styrène en fonction des groupes d'individus 147 Tableau 21: Comparaison des valeurs moyennes pour l'acétylacétone, en fonction des groupes d'individus 148

 Tableau 22 : Comparaison des valeurs moyennes pour le toluène, en fonction des groupes

 d'individus
 149

 Tableau 23 : Matrice pour le calcul de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives

 152

 Tableau 24 : Echantillons analysés pour tester le modèle prédictif
 156

 Tableau 25 : Biomarqueurs du SARS-CoV-2 identifiés dans d'autres études par l'analyse de la sueur. La police en gras dans le texte correspond aux composés reportés dans plusieurs

études.

\_\_\_\_\_\_ 158

### Liste des abréviations

ACP	Analyse en Composante Principale
ANOVA	Analyse de la variance
AuNP	Nanoparticule d'or
BTEX	Benzène, Toluène, Ethylbenzène, Xylènes
CAR	Carboxène
CAS	Chemical Abstracts Service - Numéro d'enregistrement unique (banque de données du Chemical Abstracts Service)
CIS	Cooled Injection System - Système d'injection à froid
CNN	Convolution Neural Network - Réseaux de neurones convolutifs (algorithme d'intelligence artificielle)
COV	Composé Organique Volatil
COVID-19	Coronavirus Disease 2019 - Maladie du coronavirus 2019
CQI	Contrôle Qualité Interne
DHS	Dynamic Headspace - Extraction par espace de tête dynamique
DTT	Dithiothréitol
DVB	Divinylbenzène
FDA	Food and Drug Administration - Institution américaine chargée de la surveillance des denrées alimentaires et des médicaments
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry - Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GC-ToF-MS	Gas Chromatography-Time of Flight-Mass Spectrometry - Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol
HMDB	Human Metabolome Database - Base de données de l'ensemble des métabolites humain
IA	Intelligence artificielle
LD	Limite de Détection
LogP	Logarithm Partition Coefficient - Aussi appelé Log Kow, coefficient de partage octanol/eau

LQ	Limite de Quantification
MPS	Multi Purpose Sampler - Passeur d'échantillons multifonctions
MS	Mass Spectrometry - Spectrométrie de Masse
NA	Non Applicable
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
R²	Coefficient of détermination linéaire de Pearson
RI	Retention Index - Indice de Rétention
ROC Curve	Receiver Operating Characteristic Curve - Courbe de caractéristique opérationnelle du récepteur
S/N	Signal/Noise - rapport signal/bruit
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 - Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère
SPME	Solid Phase MicroExtraction - Microextraction sur phase solide
TD	Thermal Desorption - Désorption thermique
TDU	Thermal Desorption Unit - Unité de désorption thermique
TR	Temps de Rétention (en chromatographie)

### Introduction

Les composés organiques volatils (COVs), produits par les processus métaboliques de l'organisme, ou d'origines exogènes, définissent l'odeur corporelle d'un individu. L'ensemble de ces molécules volatiles, constitue ce que l'on appelle le « volatilome » humain. Elles sont émises par différentes matrices biologiques telles que la sueur, le sébum, l'air expiré, la salive, ou encore l'urine. L'odeur corporelle varie en fonction de l'âge, du sexe, des parties du corps, de l'utilisation de cosmétiques, de l'alimentation, de la prise de médicaments, de la consommation de tabac, des fluctuations hormonales, notamment durant le cycle menstruel ou la grossesse, ainsi que de l'état de santé.

Dans les années 80', Joy Milne découvrit sa capacité à détecter la maladie de Parkinson par olfaction à travers une expérience personnelle avec son époux, atteint de cette pathologie neurodégénérative. Des années avant que les premiers symptômes n'apparaissent, Joy avait remarqué une odeur distincte chez son époux, différente de son odeur corporelle habituelle. Ce n'est qu'après le diagnostic de son mari et en rencontrant d'autres patients atteints de Parkinson, qu'elle réalisa que cette odeur pourrait être un indicateur de la maladie. L'équipe de recherche de Trivedi *et al.* [1] démarra ensuite une étude visant à déterminer quels COVs spécifiques sont responsables de cette odeur caractéristique [1,2]. Le cas de Joy Milne a ainsi contribué à ouvrir des perspectives de recherche pour développer des outils de diagnostic précoce, basés sur l'odeur corporelle.

Actuellement, le domaine de la volatolomique (étude du volatilome), est en plein essor et suscite de plus en plus d'intérêt pour le diagnostic médical réalisé à partir de prélèvements non invasifs [3]. Plusieurs types de cancers, comme le cancer du poumon [4], de la prostate [5], ou du sein [6], parmi les diverses pathologies pouvant être citées, montrent des signatures volatiles distinctes, avec des COVs marqueurs des tumeurs identifiés dans plusieurs études.

Les avancées instrumentales en chromatographie uni- ou multi-dimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse haute résolution, permettent désormais la détection des COVs à des concentrations très faibles (ppt). Par ailleurs, des dispositifs comme les nez électroniques portatifs permettent d'envisager un usage clinique plus

pratique et moins coûteux. Avec un système olfactif de 10 000 à 100 000 fois plus sensible que le nez humain [7], les chiens de détection sont également considérés comme des détecteurs potentiels pour le dépistage de pathologies. L'usage de l'olfaction canine dans un contexte clinique se développe à grande échelle [8].

Cependant, malgré les avancées instrumentales par GC-MS, et méthodologiques avec les chiens de détection, des défis subsistent, notamment en termes de standardisation des techniques, matériaux et méthodes. Pour être appliquée en clinique, la volatolomique doit répondre à des normes de sensibilité, de spécificité et de reproductibilité équivalentes aux méthodes de référence. Dans ce contexte, l'objectif de notre étude est d'identifier les matériaux de prélèvement des COVs les plus pertinents, ainsi que les techniques d'extraction et d'analyses associés, afin de fournir des recommandations méthodologiques pour les études futures.

Ces travaux de thèse sont présentés en 4 chapitres. Le premier chapitre explore, par une revue de la littérature, les dispositifs de prélèvement utilisés pour collecter les COVs de la sueur et de l'air expiré. La première partie de la revue décrit les matériaux utilisés pour l'entraînement des chiens de détection, tandis que la seconde partie aborde en détail les matériaux et les techniques d'extraction employées pour l'analyse par GC-MS. Le développement d'un dispositif de prélèvement idéal adapté aux besoins de la volatolomique est proposé.

Dans une seconde partie, nous nous intéressons cette fois aux matériaux et méthodes pour l'analyse des COVs dans l'urine, par olfaction canine et par GC-MS. L'impact du protocole de prélèvement de l'urine, ainsi que l'influence des conditions de stockage et de préparation des échantillons sont mis en évidence.

La troisième partie de ces travaux consiste en une étude expérimentale par GC-MS sur le prélèvement de la sueur, réalisée avec les matériaux et techniques d'extraction les plus adéquates, identifiées par la revue de la littérature. Les techniques d'extraction des COVs par espace de tête (*headspace*), telles que la microextraction sur phase solide (*SPME - Solid Phase MicroExtraction*), et l'extraction par espace de tête dynamique (*DHS – Dynamic Headspace*), sont notamment appliquées à l'analyse d'échantillons de sueur axillaire. La sélectivité et la sensibilité de ces deux techniques d'extraction sont comparées. Ensuite, les performances relatives de 5 dispositifs de prélèvement des COVs sont comparées dans des conditions standardisées, à l'aide d'un mélange d'étalons analytiques. A l'issue de cette étude comparative, le

développement de supports innovants nanostructurés pour le piégeage sélectif des thiols volatils, difficilement évalués par les dispositifs testés précédemment, est abordé.

Ces travaux de thèse initiés en 2021, dans un contexte de crise sanitaire mondiale liée au virus du SARS-CoV-2, incluent dans le dernier chapitre, la recherche de biomarqueurs de la COVID-19 dans la sueur. Cette étude est réalisée via l'analyse non ciblée de compresses médicales imprégnées de sueur et de sébum issues d'une cohorte de 160 individus sains ou malades, par DHS GC-MS à temps de vol (ToF-MS).

Pour finir, une conclusion générale résume les éléments clés de ces travaux. Les limites des expériences présentées et les principales perspectives de ce travail sont abordées.

# Chapitre 1

# Chapitre 1 : Etat de l'art des protocoles de prélèvement, d'extraction et d'analyse des COVs de la sueur et de l'air expiré par GC-MS et par olfaction canine

### 1. Composition de la sueur

La sueur est indispensable à la thermorégulation du corps humain, ainsi qu'aux mécanismes de défense immunitaire. Il s'agit d'une matrice biologique composée à 99,9 % d'eau, mais son pH est légèrement acide et varie entre 4,0 et 6,7. En moyenne, sans pratique d'un exercice physique important, un humain à l'âge adulte perd entre 300 et 700 mL d'eau par jour à travers la transpiration [9].

Notre peau est composée de trois couches : l'épiderme, le derme et le tissu souscutané. Les glandes produisant la sueur, appelées eccrines et apocrines, sont situées dans le derme. Les glandes eccrines produisent la majorité de la sueur et se trouvent principalement sur les paumes des mains et les plantes des pieds. La sueur eccrine contient différents éléments comme des électrolytes, acides aminés, et protéines [10]. Le métabolisme microbien à la surface de la peau est à l'origine de la formation de COVs, tels que le décanal, le dodécane, le phénol, le 1-dodécanol, l'acide propanoïque, ou l'acide hexanoïque, parmi les composés identifiés [11]. L'oxydation des lipides à la surface de la peau produit également des COVs, en particulier des aldéhydes et des alcanes [11].

A la différence du conduit de la glande eccrine, qui s'ouvre directement à la surface de la peau, le conduit de la glande apocrine s'ouvre dans les follicules pileux voisins, qui sont également reliés aux glandes sébacées, Figure 1. De ce fait, la sueur apocrine est un mélange de sueur et de sébum.



Figure 1 : Schéma de la peau au niveau de la zone axillaire représentant les glandes sébacées, apocrines et eccrines situées dans le derme, ainsi que leurs conduits vers la surface de la peau. La sueur est excrétée par les pores de la peau et les follicules pileux. Figure réalisée sur https://BioRender.com.

Le sébum est constitué principalement de squalène, une molécule non volatile, dont l'oxydation produit des COVs tels que le 6-méthyl-5-hepten-2-one (connu sous le nom de Sulcatone), ou encore le 6,10-diméthyl-5,9-undecadien-2-one (appelé Geranylacetone) [12]. Les glandes apocrines se trouvent principalement au niveau des aisselles, du cuir chevelu, du visage, des seins, du périnée et de la zone génitale. Elles existent chez l'enfant mais ne deviennent fonctionnelles qu'après la puberté (par activation hormonale). La sueur apocrine contient des protéines, du sucre, de l'ammoniac et des composés volatils odorants (principalement des thiols et des acides gras volatils) [10,13].

D'un point de vue quantitatif, les émissions de COVs par le corps humain ont été mesurées dans plusieurs études récentes [12,14,15]. Dans les travaux de Turner *et al.*[12] notamment, une chambre de prélèvement est utilisée pour quantifier les COVs émis par l'ensemble du corps humain. Les taux d'émissions moyen des COVs détectés vont de 40 ng (acide décanoïque) à 15 µg (Sulcatone) par heure. Pour parvenir à détecter ces composés émis en faibles quantités, le choix des supports de prélèvement de la sueur est un élément clé.

### 2. Composition de l'air expiré

L'air expiré est la matrice la plus étudiée en volatolomique [16]. Les nombreuses études menées jusqu'à présent ont permis la détection de près de 1 000 COVs de diverses familles chimiques dans l'air expiré [12]. De plus, certains biomarqueurs de l'air expiré sont déjà identifiés et utilisés en médecine. Pour commencer, le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et le monoxyde de carbone (CO), produits par les processus respiratoires et métaboliques, permettent de surveiller l'état physiologique général et le stress oxydatif. Puis, les COVs comme l'isoprène et l'acétone, qui sont produits principalement par le métabolisme endogène. L'isoprène, par exemple, est associé à l'activité musculaire et au métabolisme du cholestérol, tandis que l'acétone peut indiquer l'état métabolique (cétose ou glycémie). Le monoxyde d'azote (NO) est également un biomarqueur des inflammations respiratoires et est couramment utilisé pour diagnostiquer et surveiller des maladies telles que l'asthme.

La Figure 2 illustre les COVs typiquement retrouvés dans une expiration, et leurs concentrations typiques lorsqu'elles sont connues. Cela inclut notamment des composés comme le méthane, le méthanol (200-5000 ppb) [17], le disulfure de carbone (CS<sub>2</sub>) et l'éthanol, produits principalement par le métabolisme de l'intestin. Le monoxyde d'azote (NO), est mesuré autour de 4 ppm [17], mais il atteint environ 17 ppm chez les fumeurs. Les niveaux d'acétone varient de 300 à 1000 ppb [17], et des valeurs supérieures à 900 ppb peuvent être indicatives de diabète. Le taux de monoxyde de carbone (CO), se situe autour de 25 ppb [17], mais des concentrations supérieures à 50 ppb peuvent être associées à l'asthme. Enfin, les niveaux d'ammoniac varient de 400 à 1800 ppb [17], et peuvent indiquer des dysfonctionnements rénaux.

En plus d'être présents en faibles concentrations dans l'air expiré, les COVs sont sensibles aux conditions environnementales (température, humidité), ainsi qu'aux contaminations potentielles (polluants de l'air ambiant). Notamment, des composés tels que les BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène et xylène), peuvent être détectés dans l'air expiré.



Figure 2 : Illustration schématique représentant la composition en COVs lors d'une expiration.

Cette illustration met en évidence la complexité de l'air expiré, étant à la fois une source de composés endogènes et exogènes. D'autre part, sa composition varie significativement en fonction de la fraction d'air collectée. Une expiration peut se décomposer en deux ou trois temps, comme illustré sur la Figure 3. On distingue la fraction d'air alvéolaire (ou de fin d'expiration), de l'expiration totale, Figure 3. Cette dernière est un mélange d'air alvéolaire et d'air contenu dans les voies aériennes supérieures (cavités nasales, pharynx, trachée) qui n'a pas été en contact direct avec les alvéoles pulmonaires. En revanche, l'air alvéolaire correspond à la fraction de fin de respiration. Cette fraction est plus concentrée en dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) et en composés volatils endogènes. Cette distinction est importante en volatolomique et dans le domaine clinique.



Figure 3 : Représentation schématique d'une expiration

Un consensus sur les méthodes de prélèvement est indispensable pour pouvoir comparer les résultats entre différentes études et laboratoires. Sans cela, il sera difficile de savoir si les différences observées entre deux ensembles de données sont dues à de véritables variations biologiques ou simplement à des différences de méthodologie.

### 3. Revue de la littérature

Ainsi, la sueur et l'air expiré sont deux matrices biologiques très étudiées, offrant des perspectives intéressantes pour l'identification de biomarqueurs de pathologies et le développement de méthodes diagnostiques. Cependant, la mise en œuvre de protocoles de prélèvement, d'extraction et d'analyse des COVs, non-spécifiques, sensibles et reproductibles, à partir de ces matrices gazeuses reste un défi technique. Cette revue propose un état de l'art des protocoles actuels de prélèvement, d'extraction et d'analyse des COVs dans la sueur et l'air expiré, en examinant les particularités et les performances des approches par GC-MS et par olfaction canine. Il a en effet été prouvé que des chiens de détection entrainés, sont capables de détecter des pathologies chez l'humain [18,19]. Cependant, de nombreuses limitations à l'utilisation des chiens de détection se posent. L'entrainement des chiens de détection, la qualité des échantillons utilisés et leur conservation dans le temps, sont notamment des éléments critiques.

L'objectif est de fournir une vue d'ensemble des avancées et des défis rencontrés dans ce domaine, les contraintes analytiques, ainsi que les perspectives d'amélioration des contextes cliniques.

#### Check for updates

#### **OPEN ACCESS**

EDITED BY Diego Centonze, University of Foggia, Italy

#### REVIEWED BY

Preeti Gupta, Leibniz Institute for Solid State and Materials Research Dresden (IFW Dresden), Germany Gabriele Magna, University of Rome Tor Vergata, Italy

\*CORRESPONDENCE Damien Steyer, I damien.steyer@twistaroma.fr

RECEIVED 24 August 2023 ACCEPTED 16 October 2023 PUBLISHED 01 November 2023

#### CITATION

Maidodou L, Clarot I, Leemans M, Fromantin I, Marchioni E and Steyer D (2023), Unraveling the potential of breath and sweat VOC capture devices for human disease detection: a systematiclike review of canine olfaction and GC-MS analysis. Front. Chem. 11:1282450.

doi: 10.3389/fchem.2023.1282450

#### COPYRIGHT

© 2023 Maidodou, Clarot, Leemans, Fromantin, Marchioni and Steyer. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# Unraveling the potential of breath and sweat VOC capture devices for human disease detection: a systematic-like review of canine olfaction and GC-MS analysis

Laetitia Maidodou<sup>1,2,3</sup>, Igor Clarot<sup>2</sup>, Michelle Leemans<sup>4</sup>, Isabelle Fromantin<sup>4,5</sup>, Eric Marchioni<sup>3</sup> and Damien Steyer<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Twistaroma, Illkirch Graffenstaden, France, <sup>2</sup>CITHEFOR, EA 3452, Université de Lorraine, Nancy, France, <sup>3</sup>DSA, IPHC UMR7178, Université de Strasbourg, Strasbourg, France, <sup>4</sup>Clinical Epidemiology and Ageing, IMRB—Paris Est Créteil University /Inserm U955, Créteil, France, <sup>5</sup>Wound Care and Research Unit, Curie Institute, Paris, France

The development of disease screening methods using biomedical detection dogs relies on the collection and analysis of body odors, particularly volatile organic compounds (VOCs) present in body fluids. To capture and analyze odors produced by the human body, numerous protocols and materials are used in forensics or medical studies. This paper provides an overview of sampling devices used to collect VOCs from sweat and exhaled air, for medical diagnostic purposes using canine olfaction and/or Gas Chromatography-Mass spectrometry (GC-MS). Canine olfaction and GC-MS are regarded as complementary tools, holding immense promise for detecting cancers and infectious diseases. However, existing literature lacks guidelines for selecting materials suitable for both canine olfaction and GC-MS. Hence, this review aims to address this gap and pave the way for efficient body odor sampling materials. The first section of the paper describes the materials utilized in training sniffing dogs, while the second section delves into the details of sampling devices and extraction techniques employed for exhaled air and sweat analysis using GC-MS. Finally, the paper proposes the development of an ideal sampling device tailored for detection purposes in the field of odorology. By bridging the knowledge gap, this study seeks to advance disease detection methodologies, harnessing the unique abilities of both dogs and GC-MS analysis in biomedical research.

KEYWORDS

breath, sweat, VOC, canine olfaction, sampling devices, gas chromatography, mass spectrometry

### 1 Introduction

Human body odors are widely studied to develop non-invasive disease diagnosis methods. A plethora of reviews exist on the subject, encompassing biomedical detection dogs (Gordon et al., 2008; Moser and McCulloch, 2010a; Lippi and Cervellin, 2012a; Pirrone and Albertini, 2017a; Catala et al., 2019) and instrumental analysis (Ligor et al., 2008; Dormont et al., 2013; de Lacy Costello et al., 2014; Monteiro et al., 2014; Prada et al., 2014; Robinson et al., 2018; Lippi and Heaney, 2020; Chai and Chua, 2021; Sinclair et al., 2021). Additionally, alternative systems like electronic noses have emerged since the mid-1980s.



These systems utilize sensors to detect disease-specific biomarkers, offering quick real-time preliminary diagnoses at a lower cost. One of their drawbacks is the lower level of sample discrimination (Wilson and Forse, 2023). Electronic nose systems are less portable than canine olfaction due to potential restrictions posed by power, weight, or space requirements (Wilson and Forse, 2023). Despite this, the use of the dog as a diagnostic tool has not yet been standardized nor validated by health organizations (Bauër et al., 2022a). Therefore, GC-MS is of great interest to identify diseases-specific VOCs, detected by dogs. It can be employed as a complementary tool to validate canine olfaction-based diagnosis methods and to understand how dogs discriminate sick from healthy humans.

The choice of the sampling material plays a critical role in training dogs to recognize a specific pattern of volatile biomarkers. To effectively present the material to the dog, it must be appropriately sized and contained, such as a cloth, cotton gauze, swab, or a facemask capable of absorbing VOCs. The detection of precise odors can be challenging due to the variability in samples and the environment. Therefore, selecting an appropriate material that can collect and diffuse odors efficiently can greatly facilitate the dog's sniffing process, leading to more accurate results during detection exercises.

In the context of instrumental analysis using GC-MS for VOCs detection, it is essential to extract the VOCs from the sampling material and inject them into the analytical system. This paper focuses on discussing specific devices based on adsorbent polymers designed for training detection dogs. Among these devices, the most suitable ones are those that are both dog-compatible and can be directly used with GC-MS systems through thermal desorption, as illustrated in Figure 1.

In addition to the medical context, sniffing dogs find extensive application in forensics. Standardized protocols are used to train these dogs for explosives or illicit substance detection and criminal suspect identification (Lorenzo et al., 2003). Commonly, hands and feet serve as the VOCs sources for suspect identification, and gauze is often employed for sweat sampling (Cuzuel et al., 2017). Notably, The Scent Transfer Unit or STU100 (odor suction tool) plays a pivotal role in concentrating odors on gauze within this context (Curran et al., 2010a; Degreeff and Furton, 2011). This unit comprises a vacuum pump that actively samples VOCs emitted from any object onto a gauze.

The National Institute of Science and Technology (NIST) has developed a polymer-based adsorption canine training device made of polydimethylsiloxane (PDMS). This device, safe for the dog (nontoxic, non-infectious) (MacCrehan et al., 2020), has been employed in training dogs for explosive detection (MacCrehan et al., 2018a; Simon et al., 2021). Additionally, Getxent<sup>®</sup> tubes (Biodesiv, France), consisting of a patented adsorbent polymer, have been developed for detection dog training and are utilized in forensics (Simon, 2022).

This comprehensive bibliographic study delves into a thorough examination of the methodologies utilized for comprehending diverse techniques of odor capture. Specifically, the study focuses on canine olfaction and/or Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) systems within the context of medical odor analysis. By delving into the intricacies of these methodologies, this study aims to shed light on the intricate processes involved in capturing odors, thereby contributing to the advancement of our understanding in the field.

### 2 Materials and methods

#### 2.1 Literature search

In adherence to the widely recognized Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) standards, our search was conducted independently on both Pubmed and Web of Science. PRISMA is the most commonly utilized method for systematic reviews ((Moher et al., 2022).



#### 2.1.1 Canine olfaction

In this study, the research is focused on the different scent collection devices related to the analysis of gaseous non-invasive materials: exhaled air, and sweat/body odor, in a medical context. The subsequent sequence is researched in Web of Science and PubMed databases: ((dog) OR(canine)) AND ((odor)OR(odour)OR(smell)OR(sniff)OR(volatile organic compounds)OR(volatile)) AND ((breath)OR(exhaled air) OR(sweat)) AND ((diagnosis)OR(disease)OR(medical)) AND ((human) OR(patient)OR(subject)). Studies have been selected without date restrictions until March 2023.

#### 2.1.2 GC-MS analysis

The subsequent sequence was researched in Web of Sciences and PubMed databases: ((GC-MS) OR (gas chromatography) OR (volatolomics)) AND ((odor) OR (odour) OR (volatile organic compounds) OR (volatile)) AND ((breath) OR (exhaled air) OR (sweat) OR (body odor)) AND ((diagnosis) OR (disease) OR (medical)) AND ((human) OR (patient) OR (subject)). Studies have been selected without date restrictions until March 2023.

#### 2.2 Study selection and eligibility criteria

Following the PRISMA standards, data obtained from the independent searches on Pubmed and Web of Science were consolidated into a worksheet file, incorporating essential details such as DOI number, title, publication year, authors, journal, and abstracts. For canine olfaction, the initial search yielded a total of 201 records, with 88 from PubMed and 113 from Web of Science. After a comprehensive evaluation of 201 full-text papers, 163 were excluded based on relevance, resulting in the inclusion of 38 papers in the final systematic review. For GC-MS analysis, a total of 197 papers were included with initially 821 articles from Pubmed and 823 from Web of

Science. After the removal of duplicates, the remaining titles and abstracts were carefully reviewed to identify studies relevant to the topic. To ensure thoroughness, two researchers (L.M. and D.S.) independently assessed the studies, resolving any discrepancies through discussion. Articles were considered if they featured a dedicated "material and methods" section that comprehensively delineated the protocol employed for sampling VOCs. A prerequisite was the presence of at least one sampling material being explicitly cited. Furthermore, the study took into account reviews and patents. Importantly, no differentiation was made based on the level of pathologies, ensuring a broad and inclusive scope. Conversely, articles were excluded if they lacked pertinent information concerning VOCs sampling. Additionally, no in vivo studies were included (Figure 2). To ensure a comprehensive overview, reference lists of the included articles were also screened based on their titles and abstracts, enabling the inclusion of further pertinent articles.

#### 2.3 Data extraction

The relevant data were extracted from the selected studies. Standardized tables were designed to abstract the studies of interest. Table 1 highlights instances where PDMS-based sampling devices are employed to capture volatile compounds for medical odor analysis. Table 2 showcases practical scenarios demonstrating the use of fabric-based techniques to capture volatile compounds, contributing to odor analysis. In Table 3, various extraction techniques post-sample collection are illustrated, vital for isolating volatile compounds for subsequent analysis.

In the Supplementary Table S1, a detailed breakdown of sweat analysis using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) is provided. Supplementary Table S2 outlines diverse extraction

TABLE T Application examples of PDIVIS-based sampling device	TABLE	Application	tion examples	of	PDMS-based	sampling	devices
--	-------	-------------	---------------	----	------------	----------	---------

Body area	Sampling device	Sampling method	Desorption method	Sample storage conditions	Analysis system	GC-column	Sensibility	Ref.
wrist and ankle	a 25 cm long tube made of medical grade PDMS (0.64 mm OD × 0.3 mm ID, Sil-Tec <sup>®</sup> ).	passive sampling for 1 h	Thermal desorption at 250°C in a splitless mode for 30 s (PDMS sampler is inserted into a glass inlet liner (Agilent)	stored in aluminum foil at 4°C for 48 h	GCxGC- TOFMS	1D column: Rxi- 5Sil (Restek) 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm. 2D column: Rxi-17Sil (Restek) 1 m × 0.25 μm	not specified	Wooding et al. (2020)
forehead	PDMS patch (5 mm × 15 mm x 0.45 mm)	passive sampling for 30 min	Thermal desorption at 180°C for 10 min. Cryo-focusing at -10°C. Injection splitless at 300°C for 5 min	stored into TD- tubes at -80°C for 21 days	GC-MS	DB-5 MS (Agilent) 60 m × 0.25 mm x 0.25 µm	170 to 200 pg/cm	Martin et al. (2016)
forearms and abdomen	PDMS patches (20 mm × 15 mm × 0.45 mm)	passive sampling for 5–120 min	Thermal desorption at 180°C for 5 min. Cryo-focusing at -10°C. Injection splitless at 300°C for 3 min	stored into TD tubes at 4°C for 24 h	GC-MS	DB-5MS (Agilent) 60 m × 0.25 mm x 0.25 µm	50 pg to 100 ng per sample (relative estimation)	Riazanskaia et al. (2008)
upper back, forearm, and back thigh	PDMS round patches (6, 11 and 17 mm diameter, 0.25 mm, thickness)	passive sampling for 60 min	Thermal desorption at 250°C for 3 min. Cryo-focusing at -120°C. Injection splitless at 280°C	stored no longer than 72 h	GC-MS	RK13870 (Restek) 30 m × 0.32 mm x 1.8 μm	not specified	Jiang et al. (2013)
forearms	Twisters (10 mm,0.5 mm in film thickness, 24 μL PDMS phase volume, Gerstel)	active sampling (Twisters roll on the skin), the sampling time is not specified	Thermal desorption at 280°C for 10 min. Cryo-focusing at -60°C. Injection at 280°C for 10 min	stored at 4°C for 14 days	GC-MS	DB-5MS (Agilent) 20 m × 0.18 mm x 0.18 µm	not specified	Penn et al. (2007)
			Thermal desorption at 250°C for 3 min. Cryo-focusing at -80°C. Injection at 280°C for 10 min	stored at 4°C for 14 days	GC-MS	DB-5MS (Agilent) 20 m × 0.18 mm x 0.18 μm	not specified	Soini et al. (2006)
axilla			Thermal desorption at 250°C for 3 min. Cryo-focusing at -80°C. Injection at 280°C for 10 min	stored at 4°C for 20 days	GC-MS	DB-5MS (Agilent) 20 m × 0.18 mm x 0.18 µm	not specified	Xu et al. (2007)

methods for Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) analysis of breath samples collected. Supplementary Table S3 offers a comprehensive comparison of odor capture systems, applicable to canine olfaction studies and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) analysis.

### **3** Results

#### 3.1 Canine olfaction

In 1989, a first study suggested the potential of dogs to diagnose cancer (Williams and Pembroke, 1989). Over the next 2 decades, the interest in this area grew exponentially, as evidenced by Moser *et al.*'s review in 2010, which identified 531 publications on cancer detection by dogs (Moser and McCulloch, 2010a). Among the various reviews (Moser and McCulloch, 2010b; Lippi and

Cervellin, 2012b; Guest et al., 2019; Jendrny et al., 2021a), Jendrny et al.'s recent review (Jendrny et al., 2021a) stands out as it followed strict selection criteria including peer-reviewed studies with reported detection rate and the diagnostic accuracy (sensitivity/ specificity) of the diseases under investigation. From the pool of studies, they focused on studies, with a substantial overlap between the selection made by Pirrone et al. (Pirrone and Albertini, 2017b) (17 selected publications) and by Moser et al. (Moser and McCulloch, 2010a) (6 publications retained out of 531). Two key aspects were highlighted in the selected studies: the diseases studied and sampling sources. Notably, odor detection by dogs was predominantly explored for hypoglycemia (25%), epilepsy (10%), and prostate cancer (10%). The primary non-invasive matrices studied included urine (20% of publications), sweat (10%), breath and sweat together (10%), and feces (10%) (Jendrny et al., 2021b). However, this review does not delve into the VOCs sampling from urine, leaving it to be explored in future studies.

#### TABLE 2 Application examples of sampling protocols using fabrics.

Body area	Sampling device	Sampling method	Extraction method	Adsorbent phase	Sample storage conditions	Analysis method	Ref.
hand	DUKAL brand, sterile, 2 × 2, 8ply, gauze sponges	active sampling in direct contact with the skin (palm hands)	SPME at room temperature for 21 h	CAR/DVB/ PDMS	stored at room temperature for 24 h	GC-MS	Curran et al. (2010b)
feet	a strip of cotton wool (3.0 g)	sampling in direct contact with the feet skin (cotton placed in the socks) for 6 h	SPME 10 min at 55°C	polyacrylate (85 mm) 100- mm-long fiber	not specified	GC-MS	Caroprese et al. (2009)
genitourinary area	gauze made of cotton and cellulose, of 20 $\times$ 13 cm dimension	sampling in direct skin (genito-urinary area) overnight	Headspace 100°C for 30 min	n/a	not specified	GC-MS	Rodríguez-Esquivel et al. (2018)
palm of hands	gauze	sampling in direct contact with the skin (2 cm square area of the palm is wiped for 1 min with 0.1 g of dry gauze)	SPME at 50°C for 45 min	PDMS/DVB	stored 24 h at 4°C	GC-MS	Saito et al. (2021)
upper back	medical gauze	active sampling by swabbing the gauze on the skin to collect the sebum and the sweat (sampling time not specified)	DHS; incubation for 5 min at 60 °C, trapping by purging 500 mL of the sample headspace at 50 mL/ min with dry nitrogen through an adsorbent tube kept at 40°C	Tenax TA	stored at -80°C in inert plastic bags	GC-MS	Trivedi et al. (2019b)
armpit	absorbent pads	passive sampling (pads are attached via stainless steel poppets in pre-cleaned T-shirts)	HSSE in 250 mL Scott- Duran GLS80 bottles with a PDMS stir bar (1 cm long, 1 mm thickness) at 60°C for 2 h	PDMS	stored in bags and vacuum-sealed at –28°C	GCxGC- TOFMS	Smeets et al. (2020)
hand	Sterile cotton gauze pads (100% cotton) Dukal		SPME; equilibration at 50°C for 24 h, extraction for 15 h	2 cm fiber, 50/ 30 μm DVB/ CAR/PDMS	stored in cleaned 10 mL vials, sealed and secured with parafilm around the screw cap opening	GC-MS	Crespo-Cajigas et al. (2023)
palm of hands	Gauze pads were DUKAL brand, 100% cotton, sterile, 2 × 2, 8-ply, gauze sponges	Subjects hold the gauze between the palms of their hands as they walked outdoors for 10 min	SPME at room temperature for 21 h	50/30 μm DVB/ CAR/PDMS	stored in a sealed 10 mL glass vial for 24 h prior to extraction at ambient temperature	GC-MS	Curran et al. (2007)
armpit	Gauze pads were Dukal brand, sterile, 2 × 2, 8-ply, gauze sponges	Subjects wiped a gauze on their armpit after 30 min of outdoor physical exercised	SPME at room temperature for 15 h	50/30 μm DVB/ CAR/PDMS	stored in a sealed 10 mL glass vial for 24 h prior to extraction at ambient temperature	GC-MS	Curran et al. (2005b)
bust	cotton-shirts	passive sampling: subjects wear the shirt for 3 days; a rectangular piece 20 × 30 cm is cut and stored in a 10 L Tedlar <sup>*</sup> bag	DHS at 23°C for 18 h, using a sampling pump at a flow rate of 1.8 L/ min with purified air	TENAX-TA (GL Science)	stored in a 10 L Tedlar <sup>®</sup> bag at room temperature in a dark place for no longer than 1 day	GC-MS	Haze et al. (2022).

# 3.1.1 Human sweat capture for disease detection by dogs

In the realm of disease detection, an intriguing focus emerges in Section 3.1.1, where we delve into the captivating domain of human

sweat capture for canine olfaction. In the case of malaria diagnosis by detection dogs, researchers conducted a randomized and blinded study where children wore socks overnight before being presented to the dogs (Guest et al., 2019). Encouraging results were obtained from

Source	Sampling device	Extraction method	Adsorbent phase	Protocol	Analysis system	Sensibility	Ref.
Breath	Tedlar <sup>®</sup> bag, 1 L	NTD	PDMS, Carbopack X, Carboxen 1,000	air pump, 30 mL/min	GC-MS	ррb	Monedeiro et al. (2021)
	sampling bag		Carbotrap-B, Carbopack-X	air pump, 30 mL/min	GC-ToF-MS	ррb	Pizzini et al. (2018)
	sampling bag	SPME	Carboxen, PDMS	25 min at room temperature	GC-MS	ppt	Koureas et al. (2020)
	sampling bag		DVB, Carboxen, PDMS	60 min at 22°C	GCxGC- ToF-MS	ppq (pg/L)	Caldeira et al. (2012)
	Tedlar <sup>®</sup> bag, 3 L		Carboxen, PDMS	10 min at 40°C	GC-MS	ррЬ	Mochalski et al. (2014)
	sampling bag	TF-SPME	PDMS Thin film, 5% Carboxen	3 h at 25°C	GC-MS	ррb	Murtada et al. (2021)
	FlexFilm	Trapping in TD	Tenax, Carbograph,	air pump, 200 mL/min	GCxGC	ppq (pg/L)	Berna et al.
	Dag, 5 L	tube	Cardoxen		BenchTOF- MS		(2021)
	sampling bag		Tenax	air pump, 250 mL/min	GC-MS	ррЬ	Brinkman et al. (2017)
	sampling bag		Tenax TA	air pump, 100 mL/min	GC-MS	ррb	Broza et al. (2017)
Sweat	gauze	SPME	PDMS/DVB	45 min at 50°C	GC-MS	LOD for 2-nonenal: 2.4 pg/cm <sup>2</sup> /h	Saito et al. (2021)
	cotton-shirts	DHS	TENAX-TA (GL Science)	at 23°C for 18 h, using a sampling pump at a flow rate of 1.8 L/min with purified air	GC-MS	ppm (concentrations in ng per mg skin surface lipids)	Haze et al. (2022)

TABLE 3 Application examples of extraction techniques after sample collection.

the analysis of 175 samples, with detection dogs showing a sensitivity of 72% and a specificity of 91%. For hypoglycemia detection, sniffing dogs are trained (1-2 weeks) to assist diabetic patients by sniffing their blood glucose status without the need for any specific sampling device (Gonder-Frederick et al., 2017; Rooney et al., 2019). However, in two studies investigating blood glucose level recognition in type I diabetes by dogs, sweat was collected on gauze from the arms (Dehlinger et al., 2013) or neck (Hardin et al., 2015) and stored (the storage time is not mentioned) at  $-18^{\circ}$ C before being analyzed by the dogs (Hardin et al., 2015). So far, the results obtained using hypoglycemia sniffing dogs are not as accurate as standard invasive methods for blood glucose determination (ISO15197:2003 standards prescribe a maximal deviation of 20% in 95% of measurements when blood glucose levels are above 75 mg/dL and a deviation of 15 mg/dL when below 75 mg/dL (Eerdeken et al., 2020)). The sensitivity of hypoglycemia sniffing dogs ranged from 50% to 87.5%, and the specificity from 89.6% to 97.9% (Hardin et al., 2015).

In the context of epilepsy diagnosis, a study by Catala *et al.* (Catala *et al.*, 2019) used a similar protocol to Hardin *et al.* (Hardin et al., 2015), where patients rubbed gauze on their necks and placed it in a zip lock bag (Catala et al., 2019). Dogs detected epileptic with a sensitivity of 87% and a specificity of 98% in this small cohort study (5 patients). Another epilepsy-related study used gauze to collect sweat from different body parts before storing it in an inert sampling bag (Mylar<sup>®</sup>) and presenting it to the sniffing dogs (Maa et al., 2021). In this case, dogs were able to alert the subject before a seizure happened with a probability of 82%.

Several studies focused on the detection of COVID-19 by canine olfaction, including the work of Devillier *et al.* (Grandjean et al., 2020; Devillier et al., 2022). These studies used gauze (no brand name specified, 20 mins of contact to recover up to 76 mg of sweat) and Getxent<sup>®</sup> tubes to collect sweat from underarms, and the sampling devices were stored at 18°C and 6°C in separate laboratories before being presented to the dogs. Lately, Jendrny *et al.* conducted a review of 22 studies related to SARS-CoV-2 detection by canine olfaction (Jendrny et al., 2021b), with sweat being the most commonly used VOCs source (11 of 22 studies). Dogs' performances in terms of sensitivity range from 65% to 100% and in specificity from 76% to 99% in these studies (Jendrny et al., 2021b).

Furthermore, one study evaluates the effect of freezing sweat samples collected on gauze between collection and usage (Lenochova et al., 2009), with human panelists evaluating the odors. Interestingly, no differences were observed between fresh and 6 months frozen samples.

# 3.1.2 Human exhaled air capture for disease detection by dogs

Several systems have been developed to capture VOCs from exhaled air and present them to dogs for evaluation. However, there is currently no standardized method, and different teams employ their approaches to collect odorant compounds. Two main methods are commonly used for collecting odors for dog evaluation: breath sampling tubes and sampling bags. Breath sampling tubes, often custom-made, are used in some studies on the analysis of exhaled air. These tubes can range from 15 cm tubes (Montes et al., 2017) to 20 cm long (Reeve et al., 2020) and are equipped with materials like cotton balls or two layers of glass wool (one hydrophobic and hydrophilic) to trap the breath samples (McCulloch et al., 2006; Ehmann et al., 2012; Walczak et al., 2012; Montes et al., 2017).

Sampling bags are another approach used to collect exhaled air for dog evaluation. In this method, subjects exhale air into special bags, which are then presented to the dogs for the detection of various conditions, such as colorectal cancer (Sonoda et al., 2011).

More recently, researchers have explored the use of surgical facemasks for COVID-19 detection through canine olfaction (Devillier et al., 2022; Mendel et al., 2021). Mendel *et al.* (Mendel et al., 2021) pre-tested patients at a healthcare facility for COVID-19 and then asked to wear masks for 30–45 mins. These facemasks were then collected in special bags and transported to the testing laboratory. Masks were exposed to UV light to inactivate the potential virus particles. UV treatment of the facemasks has been tested and does not affect the nature of VOCs (Martin et al., 2020). After, the facemasks were cut into small squares for presentation to the dogs for sniffing tests and instrumental analysis. The study demonstrated promising results, with canine olfaction achieving an accuracy greater than 90% ((Mendel et al., 2021).

However, it is worth noting that using surgical facemasks for breath sampling may introduce additional VOCs from sweat and sebum present on the patient's facial skin. Despite, this potential confounding factor, the study achieved impressive sensitivity and specificity values after 1 month of training dogs for COVID-19 detection (Mendel et al., 2021; Devillier et al., 2022).

Regarding storage of breath samples, different studies have employed varying temperatures, such as in cold storage at 4°C (Sonoda et al., 2011; Devillier et al., 2022) or at room temperature (McCulloch et al., 2006; Ehmann et al., 2012; Walczak et al., 2012; Reeve et al., 2018; Reeve et al., 2020), for varying lengths of time, which strongly depend on the study length. However, justification for these specific storage conditions is not always provided in the literature.

#### 3.2 GC-MS analysis

The analysis of human sweat and breath is highly diverse and varies significantly among different research teams. Each team tends to use distinct odor sampling systems tailored to the specific objectives of their studies. In the subsequent section, we will delve into the description of sweat sampling devices concerning disease diagnosis through GC-MS analysis.

# 3.2.1 Sweat sampling devices for GC-MS analysis 3.2.1.1 Use of PDMS for body odor sampling

Several devices based on polydimethylsiloxane (PDMS) have been developed to collect sweat from human skin for analysis (Soini et al., 2006; Bicchi et al., 2007; Xu et al., 2007; Riazanskaia et al., 2008; Sgorbini et al., 2010; Jiang et al., 2013; Martin et al., 2016; Roodt et al., 2018; Wooding et al., 2020; Wooding et al., 2021). These Medical-grade PDMS-based materials are often fashioned into small pieces known as "patches" or "skin patches", which can be placed in direct contact with the skin to allow passive sampling. After sweat collection, these patches are subjected to a thermal desorption process to desorb VOCs. The analytes are then cryo-focused into a cold trap before being injected into the gas chromatography column in a splitless mode for further analysis (details are provided in Table 1).

Researchers choose the size and shape of the PDMS-based skin patch based on the sampling area and specific study requirements. For example, Martin *et al.* (Martin *et al.*, 2016) used rectangular patches measuring 5 mm  $\times$  15 mm patches with a thickness of 0.45 mm, to collect sebum and sweat from the whole forehead of volunteers. Round patches of various diameters (6,11, and 17 mm) and a thickness of 0.25 mm were employed to collect sweat from the upper back, forearm, and back tight (Jiang et al., 2013). The signal intensity obtained through TD-GC-MS increases with the size of the patch (Jiang et al., 2013), indicating its influence on sensitivity. Additionally, Wooding *et al.* (Wooding et al., 2020) utilized PDMS patches to sample VOCs from the arm and abdomen skin surface for durations ranging from 5 to 120 mins. The results demonstrated a sensitivity increase proportional to the sampling time for most compounds, except for highly volatile ones like 2,4,6-trimethylcarbazole.

In some cases, to prevent the PDMS patch from getting impregnated with skin sweat and sebum, it is placed in a "sandwich" between two stainless steel meshes (Jiang et al., 2013), which additionally aids in reducing background noise. For certain research involving mosquito attractants emitted from the skin of healthy subjects, PDMS-based samplers in the form of bracelets and wristbands have been developed (Wooding et al., 2020). These samplers are made of medical-grade PDMS tubing and are enclosed by Mylar<sup>®</sup> sheeting (Hydroponic) to avoid contamination from surrounding air. It is recommended to store PDMS-based samplers at 4°C (Riazanskaia et al., 2008; Wooding et al., 2020) for no longer than 24 h (Riazanskaia et al., 2008).

PDMS-based Twisters, commonly used for Stir Bars Sorptive Extraction (SBSE), have also been employed as sampling materials to collect VOCs from skin regions like the arms (Soini et al., 2006; Penn et al., 2007; Xu et al., 2007) and axilla (Xu et al., 2007). These twisters can be rolled on specific areas of the skin, enabling researchers to identify individuals and gender-volatile markers in human body odor (Penn et al., 2007). About 400 compounds are detected and 100 are identified. Twisters were stored for up to 14 or 20 days at 4°C before analysis (Penn et al., 2007; Xu et al., 2007).

PDMS-based samplers offer numerous advantages, including ease of use and reproducibility in the sampling procedure, selfadministrability, and portability. These devices can be stored in empty stainless steel thermal desorption tubes, making transportation and storage convenient. Moreover, the size and shape of the patch can be customized for different applications, making them suitable for canine olfaction. In forensics, PDMS has shown relevance in capturing and releasing explosives' odorants for dog sniffing applications (MacCrehan et al., 2018b).

While quantification of VOCs in sweat is infrequently reported. Two studies (Riazanskaia et al., 2008; Martin et al., 2016), shown in Table 1, utilized PDMS skin patches and provided detected and identified VOCs concentration range values.

Overall, PDMS-based sweat sampling devices offer a valuable and versatile tool for capturing volatile compounds from the skin, with potential applications in various scientific fields and canine olfaction studies.

#### 3.2.1.2 Use of Sorbstar<sup>®</sup> tubes for body odors sampling

In the thesis work of V. Cuzuel, Sorbstar<sup>®</sup> tubes demonstrated good efficiency in capturing and releasing VOCs from the palms of hands (Cuzuel, 2022). This sampling approach is akin to SBSE, and active sampling can be holding and rolling the Sorbstar<sup>®</sup> tubes in the palms of the hands. Despite its promising performance, Sorbstar<sup>®</sup> tubes are not widely utilized in research studies, as only one paper implementing this sampling device has been identified.

# 3.2.1.3 Use of gauze, clothes, or cotton for body odors sampling

In numerous experimental studies, gauzes have been utilized for body odor sampling (Curran et al., 2005a; Curran et al., 2010b; Rodríguez-Esquivel et al., 2018; Crespo-Cajigas et al., 2023) (protocols detailed in Table 2). However, the brand and type of gauze used are often not explicitly specified. A comprehensive comparison of nine commercially available gauzes (Dukal, J&J, Nexcare, IMCO, Eckerds, Cotton Roll, King's Cotton, Polish Absorbers, and Hungarian Cotton) was conducted by Furton and Curran in 2006, as published in a patent (The Patent Cooperation Treaty, 2007). Among these gauzes, Nexcare was found to release the highest number of volatile compounds (58 VOCs), while Dukal released the least VOCs (12 VOCs). This variation implies that the choice of gauze can significantly influence GC-MS analysis and dog sniffing results. Proper cleaning of the gauze before sweat sampling is crucial to ensure accurate and reliable sampling. The patent suggests cleaning vials and septa with acetone and then heating them at 210°C for 48 h to remove any residual VOCs traces before SPME GC-MS analysis ((The Patent Cooperation Treaty, 2007)).

In the context of studying the primary odor of subjects and differentiating between volunteers based on their body odor, gauzes have been used (Curran et al., 2010b). A protocol involving a pump and a supercritical fluid extractor is employed to clean the gauze before sweat sampling (Curran et al., 2010b). Cleaned gauze were placed on the subject's hands for 5 mins following a hand-washing protocol and then stored at room temperature for 24 h. VOCs are subsequently extracted using SPME for an extended duration (21 h) at room temperature and analyzed by GC-MS. This study, conducted in 2009, provided the first evidence of the possibility of individual discrimination based on the analysis of VOCs from hands (Curran et al., 2010b).

Trivedi *et al.* (Trivedi et al., 2019a) conducted a study prompted by the discovery of a "super smeller" named Joy Milne who detects a distinct odor in her Parkinson's disease-afflicted husband. They investigated healthy and Parkinson's disease patients, totaling 64 subjects. Sweat and sebum were collected from their upper backs using gauze which were then stored at  $-80^{\circ}$ C for analysis. The researchers employed DHS (Dynamic Headspace) extraction to extract VOCs from the gauze, followed by GC-MS coupled with an olfactometer. Results revealed that Perillic aldehyde tended to decrease for Parkinson's disease patients, while three other components (Hippuric acid, Eicosan, and Octadecanal) increased. The peer-reviewed publication, originally an application note (Anatune, 2019), presented a solution to analyze the volatile compounds captured on gauze. In a subsequent study in 2021 (Sinclair et al., 2021) the research team failed to replicate the same biomarkers as in their 2019 study (Trivedi et al., 2019a).

Haze *et al.* (Haze et al., 2022) conducted a study on the evolution of t-2-nonenal during aging, utilizing T-shirts as sampling devices. Participants wore the T-shirt for 3 days, and a portion of the cloth was placed in a 10 L Tedlar<sup>®</sup> bag. VOCs were extracted using a sampling pump to mimic dynamic headspace extraction (DHS), with a constant flow rate of 1.8 L/min. To maintain the 10 L capacity in the bag, deodorized air was supplied, and DHS collection was performed at 23°C for 18 h. VOCs were trapped into a Tenax<sup>®</sup> TA cartridge and later subjected to liquid desorption using 10 mL of diethyl ether. In contrast, results from an American study contradicted these findings, suggesting that trans-2-nonenal is not a volatile biomarker of aging in a non-Japanese population (Gallagher et al., 2008).

More details on analytical methods, including desorption parameters, GC-MS system, and chromatographic columns are provided in Supplementary Table S1.

# 3.2.2 Exhaled air sampling devices for GC-MS analysis

Diverse sampling systems have been developed with differences in parameters like sample volume and the fraction of exhaled air collected. In adults, each breath typically consists of around 500 mL of air. The initial 150 mL corresponds to the dead space, comprising air from the mouth and the surrounding environment, which is not involved in blood gas exchange. The subsequent 350 mL constitutes the alveolar portion, where the air has come into contact with the blood in the lungs. Capturing the alveolar breath, obtained at the end of exhalation, is more advantageous as it avoids dilution by dead space air (White and Fowler, 2018).

#### 3.2.2.1 Sampling bags

Sampling bags are widely used to collect exhaled air for studying VOCs. Patients are asked to fast for at least 6 h and rest for 10 mins before breathing normally through a filter to purify inhaled air or medical air. Sometimes, patients wear a nose clip to ensure that only oral cavity air is collected. Consistency in respiratory parameters, such as the breathing route, is crucial to avoid bias in the clinical interpretation of exhaled VOCs patterns (Sukul et al., 2017).

Subjects are often asked to hold their breath for 10–30 s and then exhale deeply to fill the sampling bag (Koureas et al., 2020). Different types of bags, including Tedlar<sup>®</sup> (made of polyvinyl fluoride), Flexfilm<sup>®</sup> (unknown polymer), and Kynar<sup>®</sup> (made of polyvinylidene difluoride) have been compared (Mochalski et al., 2013a). A study by Mochalski *et al.* (Mochalski et al., 2013a) found that Tedlar<sup>®</sup> bags provide the least background emission, while Flexfilm<sup>®</sup> bags provide the highest. The authors recommend storing breath samples for up to 6 h at a cold temperature (4°C), in pre-conditioned Tedlar<sup>®</sup> bags (flushed with an inert gas).

Cleaning the sampling bags with pure nitrogen, (Caldeira et al., 2012; Mochalski et al., 2013a; Amal et al., 2016; Gashimova et al., 2019; Koureas et al., 2020), helium (Murtada et al., 2021) or humidified zero-air (Be et al., 2008). the main drawback of sampling bags is their storage time, with Mochalski *et al.* (Mochalski et al., 2013a) recommending storing the bags at  $4^{\circ}$ C and to not extract VOCs from the bags beyond 6 h after sampling.

#### 3.2.2.2 Commercial devices

The Breath Collection Apparatus (BCA, Menssana Research) is a tube-based device where patients blow for 2 min, wearing a nose clip to collect only oral cavity air. Volatile compounds are trapped on activated carbon sorbents inside the tube (Phillips et al., 2019). To our knowledge, published VOCs limits of detection and GC-MS analysis for this system are lacking in the literature.

The Bio-VOC Sampler<sup>®</sup> (Markes) is designed to collect endtidal breath, mainly composed of endogenous compounds. The patient blows through a disposable mouthpiece into an inert plastic container with a volume of 175 mL. It samples 88 mL of alveolar air, making it suitable for detecting high-concentration VOCs in the ppm range (Kwak et al., 2014). It has been used for the determining of nitric oxide levels in exhaled air (Henderson and Matthews, 2002). Yet, it is not recommended for identifying unknown biomarkers in low concentrations (<ppb) in breath samples.

The ReCIVA<sup>®</sup> facemask by Olwstone Medical is an end-tidal breath collection device with an infrared CO<sub>2</sub> sensor and Tenax<sup>®</sup> adsorbent cartridges. This commercial device has been well thought out for medical research applications (De Vi et al., 2020; Holden et al., 2020). It allows reproducible and precise breath sampling with reduced potential loss of compounds. However, it is an expensive device, and the same facemask cannot be used for multiple patients. One study using a very small cohort (three patients) suggests that the device may be less sensitive than Tedlar<sup>®</sup> bags (Gilio et al., 2020).

In summary, each commercial device has its advantages and limitations in breath sampling, making them suitable for specific research applications.

#### 3.2.3 Extraction methods for GC-MS analysis

In this section, the main techniques for preparing gaseous samples for VOCs analysis by GC-MS are presented.

#### 3.2.3.1 Solid phase Micro extraction (SPME)

SPME is a well-established technique developed in 1990 by Pawliszyn *et al.* (Catherine and Janusz, 1990). It is widely used for VOCs analysis. This extraction technique relies on specific polymers like PDMS, Carboxen, and Polyacrylate, which are incorporated into a 1–2 cm long fiber (Reyes-Garcés et al., 2018) with an adsorbent phase ranging from 7 to 100  $\mu$ m.

SPME protocols involve exposing the fiber to the sample either through immersion for liquid samples or in the headspace of the sample container. After extraction, the VOCs are thermally desorbed from the fiber in the GC-MS inlet for analysis.

A more recent advancement is Thin-Film Solid Phase Microextraction (TF-SPME), developed in 2003 by Bruheim *et al.* (Bruheim et al., 2003). This technique operates on the same principle as classical SPME but utilizes a thin-film surface, about 200 mm<sup>2</sup> in size, which is approximately 20 times that of a conventional 100  $\mu$ m SPME fiber.

Murtada *et al.* (Murtada *et al.*, 2021), combined TF-SPME with Tedlar<sup>®</sup> bags for collecting volatile compounds from exhaled air. They introduced a Carboxen/PDMS film into a 1 L Tedlar bag, which was cleaned with helium to eliminate contamination prior to the sample collection. The filled bag was kept for 3 h at 25°C. Subsequently, the fiber was removed and analyzed by thermal desorption and GC-MS.

#### 3.2.3.2 Trapping in the adsorbent phase

Trapping in sorbent phases is a commonly used method for samples collected in sampling bags. A recent review by Westphal et al., 2023 (Westphal et al., 2022) offers valuable guidelines on using sampling bags and adsorbent phase for thermal desorption and GC-MS analysis. These guidelines encompass essential instrumental parameters, ensuring effective and efficient analysis.

#### 3.2.3.3 Needle Trap Device

Needle Trap Device (NTD) is an extraction trap consisting of a sorbent material packed inside a needle, used as an extraction trap (Pizzini et al., 2018; Monedeiro et al., 2021). This principle closely resembles trapping in sorbent phases. VOCs from the sampling bag or device are transferred to the NTD using a sampling pump. Once extracted, the needle is inserted into a thermal desorption unit, such as a thermal desorption tube, for further analysis.

#### 3.2.3.4 Dynamic headspace

Dynamic Headspace (DHS) is a dynamic extraction technique employed for analyzing volatile compounds in a liquid or a solid sample. In this method, the volatile compounds are thermally extracted and trapped in a sorbent phase. The key advantage of DHS is the continuous renewal of analytes to the sorbent phase through an inert gas flow during the extraction process. This ensures that the equilibrium of volatile compounds between the sample and the gas phase (headspace) is never reached.

DHS can be automated or remote and is suitable for various sample types, particularly solid samples with minimal moisture content. For instance, gauze or a Getxent<sup>®</sup> tubes are suitable sorbent materials for DHS. Notably, DHS was utilized in a volatolomic study to analyze the sebum of patients with Parkinson's disease (Sinclair et al., 2021). Sterile cotton medical gauze was used to collect sebum from patients' upper back. The collected volatile compounds on the gauzes were then extracted by DHS at 80°C for 10 min under nitrogen flow and trapped on a Tenax TA adsorbent cartridge maintained at 40°C. Subsequently, the thermal desorption of the Tenax trap and GC-MS analysis differentiated samples from patients and healthy volunteers.

In a recent systematic review by Mitra et al., 2022 (Mitra et al., 2022), 29 papers were selected, covering diverse sampling devices and extraction techniques for body odor analysis. The number of VOCs detected by GC-MS varied also on the study design, the number of participants, and the analytical instrument used. The sensitivity of the different materials and techniques is challenging to evaluate due to the limited availability of quantification of the VOCs in sweat samples. However, studies providing concentration values demonstrated that 2D-GC with SPME (Caldeira et al., 2012) or Trapping in TD tubes (Berna et al., 2021) allow VOCs detection at very low concentrations (pg/L).

In comparing similar sampling protocols, the sensitivity of the analysis appears to be more influenced by the analytical instrument than the extraction method used.

#### 4 Discussion

Compared to classical extraction methods discussed in this paper (Section 3.2.3), the canine nose is a natural highly efficient


extraction system. The airflow dynamics around a dogs' nostrils are such that the air is inhaled from the front and exhaled to the side resulting in an impressive volume of approximately 30 mL/s/nostril or an approximate airflow of 3,600 mL/min (Kenneth et al., 2017; Kokocińska-Kusiak et al., 2021). This flow rate is over 7 times higher than the typical values used for human exhaled air extraction from sampling bags or gas purge flow used in dynamic headspace to extract sweat-VOCs from materials (ranging from 20 to 500 mL/ min) before thermal desorption GC-MS analysis. To better replicate the accuracy of a dog's sniffing process, it is recommended to employ dynamic headspace techniques for VOCs collection instead of using static headspace methods. For instance, using DHS to simulate a 15 s dog sniffing in one nostril, a sample volume of 450 mL has to be extracted at a flow rate of 30 mL/s. Figure 3 illustrates the similarities between dog sniffing and dynamic headspace techniques used in GC-MS analysis.

### 4.1 Use of the dog as an analytical tool

Canine olfaction as a diagnostic tool offers many advantages. Firstly, it provides a non-invasive, painless, and potentially inexpensive procedure. The use of canine olfaction as a diagnostic tool has shown promise in detecting specific VOCs patterns in sweat or exhaled air associated with infectious diseases like COVID-19, or cancers. Since domestic dogs are familiar with human odors, they need to be trained to differentiate between body odors from multiple healthy subjects and those combined with disease-specific VOCs. The training process for detection dogs typically involves two steps: generalization, where they are trained to detect specific stimuli, and discrimination: where they learn to differentiate between target odors and distracting samples.

Once properly trained, sniffing dogs, selected based on breed and aptitudes, exhibit remarkable abilities in detecting VOCs at extremely low concentrations, often in the parts per trillion range. Interestingly, the sensitivity of the dog's olfactive system appears to be on par with, if not greater than, the analytical instrument. For instance, when comparing Limit of Detection (LOD) values, butanethiol is estimated to have an LOD of 0.0003 ppb for canine olfaction (Wackermannová et al., 2016) versus 0.03 ppb for GC- MS (Muir et al., 2005). On the other hand, certain VOC like Pyrazine are detected at lower LOD by GC-MS (0.4 ppb) (Mochalski et al., 2013b) compared to dog sniffing, which achieves an LOD of 28 ppb (Wackermannová et al., 2016). However, canine olfaction cannot be compared to analytical instruments such as GC-MS systems since these two detection tools are very different. Indeed, canine olfaction is believed to depend on broadly selective receptors and combinatorial signal processing. One crucial factor to consider is that dogs are living beings and exhibit variability in their responses. Interpretation of canine olfaction analyzes must account for the variability among individual animals and among dog's breeds (Bauër et al., 2022b).

Moreover, the complexity of the training exercise can increase this variability. Properly training detection dogs to recognize these disease-specific odorants remain a significant challenge. It is essential to ensure that the dogs do not confuse these odors with unrelated stimuli, such as contaminants, hospital odors, or even the sampling device or storage conditions.

Therefore, attention must be given to the experimental study's design and the collection and storage of training and test samples. Unfortunately, there is a lack of standardization of canine olfaction training, which is evident in many studies. To address this, a well-defined training protocol should be developed, drawing from experiences acquired in forensic sciences (National Institute of Standards and Technology, 2009).

In a medical context, additional considerations come into play. A study conducted by Elliker *et al.* (Elliker *et al.*, 2014) offers valuable recommendations for experimental studies related to cancer diagnosis using canine olfaction. One of the challenges is that detection dogs can identify samples used in previous training sessions based on individuals' odors or contaminants' odors. To mitigate this issue, it is recommended not to reuse several times training samples from the same individuals but instead to use pooled samples from different donors to create a variety of odor profiles (unfamiliar samples) (Elliker *et al.*, 2014).

The control of VOCs released from the odor capture devices during dog training is also a critical aspect to consider. Forensic experts have developed a standardized procedure called Controlled Odor Mimic Permeation Systems (COMPS) to address this (Kenneth et al., 2008; Kenneth et al., 2017). The diffusion time of a compound within an odor collection material depends on its chemical properties such as vapor pressure and structure, as well as its affinity with the sorbent material. This process involves two distinct physical mechanisms: adsorption, where molecules adhere to the surface of a solid surface, and absorption, where molecules permeate into a porous surface.

Quantifying the amount of VOCs released from odor collection materials under controlled temperature and humidity conditions is essential to determine their suitable usage time based on the nature of the VOCs being studied. For instance, in a study by Simon *et al.* (Simon *et al.*, 2019), headspace concentrations of 12 VOCs were determined using SPME GC-MS. Analytical standards were doped onto cotton gauze (Dukal brand) and placed onto open containers used for dog training. After 1 hour (the estimated time of a canine training session), the diffusion of VOCs from gauze to the surrounding air was measured. SPME fibers (DVB/CAR/PDMS) were placed 5 cm above the gauze, were exposed for 15 s to the odor source, and subsequently analyzed by TD GC-MS. This process was repeated daily for 9 days. The concentrations of VOCs did not significantly decrease for 7 h, allowing the gauzes to be used for up to 7 training sessions (Simon *et al.*, 2019).

# 4.2 Use of GC-MS as a complementary tool to identify specific-diseases induced VOCs

The analysis of human odor samples by GC-MS applied using untargeted methods allows for the identification of a broad range of volatile molecules. In a first place, to improve the sensibility and the specificity of the analysis, the most relevant materials for sampling and extracting VOCs must be chosen. Commonly used materials like gauze, clothes, and cotton balls cannot be directly used with GC-MS systems and require a preliminary extraction step. The choice of the extraction protocol among various existing headspace techniques does not significantly impact the analysis's sensitivity. However, it does influence the analysis's selectivity. For example, bipolar sorbents like Tenax TA or Carboxen are capable of trapping both hydrophile and lipophile VOCs, while PDMS favors the extraction of lipophile compounds. To achieve untargeted analyses, essential for detecting and identifying unknown disease biomarkers, it is recommended to use multiple sorbent phases with different properties. This approach allows for the trapping of a wide range of analytes, enhancing the chances of detecting and characterizing diverse compounds during the analysis. Using PDMS-based devices or Sorbstar® tubes for body odors eliminated the need for an extraction step. These materials can be directly used with a GC-MS system through thermal desorption. By applying optimal thermal desorption parameters, a significant portion of the collected analytes on the sorbent surface can be injected for analysis.

After optimizing the parameters for VOCs sampling and extraction, the later step is the analysis. In the field of metabolomics, untargeted GC-MS methods are prevalent. Then the data analysis can be carried out using various methods. The criteria for selecting peak (quality of peak height or range of m/z value), the variables values (peak area, peak height, intensity value of MS or abundance value of TIC) and the choice of data preprocessing method, are key parameters in the data treatment (Md Ghazi et al., 2022). Data preprocessing includes peak detection, baseline correction, chromatographic alignment, deconvolution, feature filtration, missing value replacement, normalization, ratio selection and classification. Typically, when applying metabolomics to disease diagnosis, the primary objective is to predict specific disease classes through the use of multivariate methods (Feizi et al., 2021).

Principal Component Analysis (PCA) is commonly applied in a first place to provide an overview of the data, detect outliers, groups, and patterns. Subsequently, classification can be performed using linear methods such as Partial Least Squares (PLS) and Orthogonal Partial Least-Squares (OPLS), or non-linear methods like Support Vector Machine (SVM) (Feizi et al., 2021). Linear methods are preferred for the analysis of a small sample size relative to a high number of variables, whereas non-linear methods are dedicated to large datasets. For instance, Caldeira et al. (Caldeira et al., 2012), applied of GC×GC-ToFMS (Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography coupled with Time-of-Flight Mass Spectrometry) to the analysis of exhaled air samples from 32 children with allergic asthma (of which 10 also presented with allergic rhinitis) and 27 control children. Subsequently, PLS-Discriminant Analysis in conjunction with Cross Validation, was conducted to identify compounds that might be associated with oxidative stress, inflammatory processes, or other cellular phenomena characteristic of asthma. Following this process, a robust model with a classification rate of 96% is obtained. Within the asthmatic population, a distinctive profile of six VOCs was identified: nonane, 2,2,4,6,6-pentamethylheptane, decane, 3,6-dimethyldecane, dodecane, and tetradecane.

In order to explore potential future clinical applications, targeted methods have also to be developed to reduce the data processing time and enhances the method's suitability for diagnosis purposes. Monedeiro *et al.* (Monedeiro *et al.*, 2021) went in that direction by quantifying 29 target VOCs that have been previously reported as potential biomarkers of lung diseases in breath (lung cancer, chronic



obstructive pulmonary disease, and asthma). Multinomial logistic regression (MLR) has been utilized to assess the relationship between the concentrations of the nine most discriminative targets (2-propanol, 3-methylpentane, (E)-ocimene, limonene, m-cymene, benzonitrile, undecane, terpineol, and phenol) as input variables. This analysis yielded an average overall accuracy of 95.5% for the prediction of multiple classes.

As discussed in Section 3.1, canine olfaction can be employed for simple binary classification of samples. Indeed, it would be intriguing to use GC-MS as an assessment tool for the dog. However, in the current state of our knowledge, we cannot assure what stimuli the dogs are actually responding to. The biomarkers identified by GC-MS might not be the same as those detected by the dogs. Furthermore, it is possible that the LODs of even the most advanced analytical instruments may not allow for the detection of molecules perceived by the dogs.

Nevertheless, studies in the field of analytical chemistry on the olfactory characteristics of pathologies serves as a valuable complement and may contribute to a more comprehensive understanding and standardization of experiments involving detection dogs (Bauër et al., 2022b).

# 4.3 Design of an ideal device compatible with both canine olfaction and GC-MS analysis

The design of an innovative, ideal device should consider several key elements, as resumed in Figure 4. These elements should be considered as recommendations for future research in the field of medical odor analysis.

 Practical aspects: To ensure consistency and minimize variability in experimental studies involving numerous subjects, the device should have a user-friendly sampling protocol. An ideal device would come pre-conditioned to be free of contaminants and single-use to avoid cross-contamination. It should be packed in an inert vacuum-sealed individual bag before and after sampling.

- 2. Sampling selectivity: To improve dogs' performances, the sampling device must be capable of collecting volatile compounds from diverse chemical families with different physicochemical properties. Balancing the ability to trap both apolar and polar compounds is essential, as valuable information could be lost if the collection device favors only one type of compound. Preserving highly reactive compounds like thiol molecules before analysis would be a significant advancement in medical diagnosis applications involving body odors (Schroeder, 2015).
- 3. Sample stability: Care must be taken when using absorbing materials like cellulose fibers (gauze, surgical facemasks) as they can absorb VOCs, humidity, and non-volatile compounds. Cold storage prior to analysis is necessary to prevent molecule degradation. In contrast, sorbent materials like adsorbent polymers are inert and do not require freezing but should be stored in a cold place to avoid the desorption of volatile compounds prior to analysis. The ideal device should allow long-time storage (several months) to accommodate experimental studies involving patients recruited and sampled over an extended period. Analyzing all samples in the same batch at the end of the study can help reduce instrumental variability.
- 4. Compatibility with thermal desorption: An ideal material would be compatible with direct thermal desorption prior to GC-MS analysis to enhance the analysis's sensitivity by minimizing VOCs loss from extraction steps.
- 5. Reproducibility of odor release: Consistency in the amount of odor released from the sampling material throughout the training session or the test time is essential for accurate canine olfaction and GC-MS analysis.

## 5 Conclusion and perspectives

This bibliographic study explores the tools to comprehend odor capture techniques for both canine olfaction and GC-MS systems. The analysis of odors in a medical context is a relatively recent and diverse field, with numerous proofs of concept utilizing detection dogs or GC-MS. Interestingly, none of the studies reviewed have been replicated in other laboratories, and their results vary significantly. Notably, the only study on Parkinson's disease was repeated with an increased patient cohort and yielded contradictory results compared to the initial study, serving as a crucial proof of concept odor (Trivedi et al., 2019a; Sinclair et al., 2021).

A key observation is the lack of standardization in sample collection protocols for both dogs and GC-MS studies. Training sniffing dogs necessitates an odor capture device, which can take the form of a sampling bag for patients to blow into, a gauze for sweat collection, or a passive/active polymer-based device to adsorb human VOCs. However, questions arise concerning the preservation and potential reuse of these odor-capturing devices, under specific conditions. Although this review does not offer a definitive answer to this question, it does provide valuable guidelines for consideration in future studies.

To potentially identify volatile biomarkers of pathologies detected by dogs, conducting GC-MS analysis alongside canine olfaction, using replicate samples and direct thermal desorption or multi-sorbent extraction may prove instrumental. This approach could eventually pave the way for significant advancements in the field of medical odor analysis.

Perhaps one of the most conceivable field applications utilizing sniffing dogs, would be the detection of infectious diseases during a pandemic. Indeed, in an observational study related to SARS-CoV-2, Guest *et al.* (Guest et al., 2022), reported that 2 dogs could screen 300 people in 30 min. This hypothesis makes it possible to imagine using canine olfaction in airports before embarking in a plane. In this scenario, only individuals marked as positive by the dogs would be tested afterwards by PCR tests.

In isolated settings, where access to gold standards diagnosis instruments is difficult, bringing detection dogs appears to be a promising solution for early and rapid detection of pathologies. In our knowledge, there are no established applications using detection dogs in this context. The limitations of this approach are well outlined in the review by Bauer *et al.* (Bauër et al., 2022b). These drawbacks notably include the associated high costs of employing qualified personnel for such applications, and the challenge of consistently sourcing samples for dogs' trainings, to maintain their performances over time (Bauër et al., 2022b).

## Author contributions

LM: Conceptualization, Investigation, Methodology, Validation, Writing-original draft, Writing-review and editing, Data curation.

## References

Amal, H., Leja, M., Funka, K., Skapars, R., Sivins, A., Ancans, G., et al. (2016). Detection of precancerous gastric lesions and gastric cancer through exhaled breath. *Gut* 65 (3), 400–407. doi:10.1136/gutjnl-2014-308536

Anatune, (2019). AS184\_Sniffing-out-Parkinson-Disease-using-GERSTEL-Dynamic-Headspace-DHS-and-Olfactory-Detection-Port-ODP. https://anatune.co.uk/ application-notes/sniffing-out-parkinson-disease-using-gerstel-dynamic-headspace-dhsand-olfactory-detection-port-odp/.

Bauër, P., Leemans, M., Audureau, E., Gilbert, C., Armal, C., and Fromantin, I. (2022a). Remote medical scent detection of cancer and infectious diseases with dogs and rats: a systematic review. *Integr. Cancer Ther.* 21, 15347354221140516. doi:10.1177/ 15347354221140516 IC: Validation, Writing-review and editing, Formal Analysis. ML: Formal Analysis, Validation, Methodology, Writing-review and editing. IF: Formal Analysis, Writing-review and editing, Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision. EM: Formal Analysis, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Writing-review and editing. DS: Project administration, Supervision, Validation, Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Writing-original draft, Writing-review and editing.

## Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This work was supported by the Royal Canin Foundation (KDOG project, 2021 project cycle), Laetitia Maïdodou has received a PhD grant ("Bourse Cifre") funded by Association Nationale de la Recherche Technique. Twistaroma has received a financial support for this work provided by Fonds Européen de Développement Régional (FEDER).

## **Conflict of interest**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2023.1282450/ full#supplementary-material

Beauchamp, J., Herbig, J., Gutmann, R., and Hansel, A. (2008). On the use of Tedlar® bags for breath-gas sampling and analysis. *J. Breath. Res.* 2 (4), 046001. doi:10.1088/1752-7155/2/4/046001

Berna, A. Z., Akaho, E. H., Harris, R. M., Congdon, M., Korn, E., Neher, S., et al. (2021). Reproducible breath metabolite changes in children with SARS-CoV-2 infection. *ACS Infect. Dis.* 7 (9), 2596–2603. doi:10.1021/acsinfecdis. 1c00248

Bauër, P., Leemans, M., Audureau, E., Gilbert, C., Armal, C., and Fromantin, I. (2022b). Remote medical scent detection of cancer and infectious diseases with dogs and rats: a systematic review. *Integr. Cancer Ther.* 21, 15347354221140516. doi:10.1177/ 15347354221140516

Bicchi, C., Cordero, C., Liberto, E., Rubiolo, P., Sgorbini, B., and Sandra, P. (2007). Sorptive tape extraction in the analysis of the volatile fraction emitted from biological solid matrices. *J. Chromatogr. A* 1148 (2), 137–144. doi:10.1016/j. chroma.2007.03.007

Brinkman, P., van de Pol, M. A., Gerritsen, M. G., Bos, L. D., Dekker, T., Smids, B. S., et al. (2017). Exhaled breath profiles in the monitoring of loss of control and clinical recovery in asthma. *Clin. Exp. Allergy* 47 (9), 1159–1169. doi:10.1111/cea. 12965

Broza, Y. Y., Har-Shai, L., Jeries, R., Cancilla, J. C., Glass-Marmor, L., Lejbkowicz, I., et al. (2017). Exhaled breath markers for nonimaging and noninvasive Measures for detection of multiple Sclerosis. ACS Chem. Neurosci. 8 (11), 2402–2413. doi:10.1021/ acschemneuro.7b00181

Bruheim, I., Liu, X., and Pawliszyn, J. (2003). Thin-film microextraction. Anal. Chem. 75 (4), 1002–1010. doi:10.1021/ac026162q

Caldeira, M., Perestrelo, R., Barros, A. S., Bilelo, M. J., Morête, A., Câmara, J. S., et al. (2012). Allergic asthma exhaled breath metabolome: a challenge for comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 1254, 87–97. doi:10.1016/j. chroma.2012.07.023

Caroprese, A., Gabbanini, S., Beltramini, C., Lucchi, E., and Valgimigli, L. (2009). HS-SPME-GC-MS analysis of body odor to test the efficacy of foot deodorant formulations. *Skin Res. Technol.* 15 (4), 503–510. doi:10.1111/j.1600-0846.2009.00399.x

Catala, A., Grandgeorge, M., Schaff, J. L., Cousillas, H., Hausberger, M., and Cattet, J. (2019). Dogs demonstrate the existence of an epileptic seizure odour in humans. *Sci. Rep.* 9 (1), 4103. doi:10.1038/s41598-019-40721-4

Catherine, L. A., and Janusz, P. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* 62 (19), 2145–2148. doi:10. 1021/ac00218a019

Chai, H. C., and Chua, K. H. (2021). The potential use of volatile biomarkers for malaria diagnosis. *Diagnostics* 11, 2244. doi:10.3390/diagnostics11122244

Crespo-Cajigas, J., Gokool, V. A., Ramírez Torres, A., Forsythe, L., Abella, B. S., Holness, H. K., et al. (2023). Investigating the use of SARS-CoV-2 (COVID-19) odor expression as a non-invasive diagnostic tool—pilot study. *Diagnostics* 13 (4), 707. doi:10.3390/diagnostics13040707

Curran, A. M., Prada, P. A., and Furton, K. G. (2010a). Canine human scent identifications with post-blast debris collected from improvised explosive devices. *Forensic Sci. Int.* 199 (1–3), 103–108. doi:10.1016/j.forsciint.2010.03.021

Curran, A. M., Prada, P. A., and Furton, K. G. (2010b). The differentiation of the volatile organic signatures of individuals through SPME-GC/ms of characteristic human scent compounds. *J. Forensic Sci.* 55 (1), 50–57. doi:10.1111/j.1556-4029.2009.01236.x

Curran, A. M., Rabin, S. I., Prada, P. A., and Furton, K. G. (2005a). Comparison of the volatile organic compounds present in human odor using SPME-GC/MS. *J. Chem. Ecol.* 31 (7), 1607–1619. doi:10.1007/s10886-005-5801-4

Curran, A. M., Rabin, S. I., Prada, P. A., and Furton, K. G. (2005b). Comparison of the volatile organic compounds present in human odor using SPME-GC/MS. *J. Chem. Ecol.* 31 (7), 1607–1619. doi:10.1007/s10886-005-5801-4

Curran, A. M., Ramirez, C. F., Schoon, A. A., and Furton, K. G. (2007). The frequency of occurrence and discriminatory power of compounds found in human scent across a population determined by SPME-GC/MS. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 846 (1–2), 86–97. doi:10.1016/j.jchromb.2006.08.039

Cuzuel, V. (2022). Développement d'une stratégie de caractérisation chimique de la signature odorante d'individus par l'analyse chimiométrique de données issues de méthodes séparatives multidimensionnelles. Available from: https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01680821v2.

Cuzuel, V., Cognon, G., Rivals, I., Sauleau, C., Heulard, F., Thiébaut, D., et al. (2017). Origin, analytical characterization, and use of human odor in forensics. *J. Forensic Sci.* 62 (2), 330–350. doi:10.1111/1556-4029.13394

De Vietro, N., Aresta, A., Rotelli, M. T., Zambonin, C., Lippolis, C., Picciariello, A., et al. (2020). Relationship between cancer tissue derived and exhaled volatile organic compound from colorectal cancer patients. Preliminary results. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 180, 113055. doi:10.1016/j.jpba.2019.113055

Degreeff, L. E., and Furton, K. G. (2011). Collection and identification of human remains volatiles by non-contact, dynamic airflow sampling and SPME-GC/MS using various sorbent materials. *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (4), 1295–1307. doi:10.1007/s00216-011-5167-0

Dehlinger, K., Tarnowski, K., House, J. L., Los, E., Hanavan, K., Bustamante, B., et al. (2013). Can trained dogs detect a hypoglycemic scent in patients with type 1 diabetes? *Diabetes Care* 36, e98–e99. doi:10.2337/dc12-2342

de Lacy Costello, B., Amann, A., Al-Kateb, H., Flynn, C., Filipiak, W., Khalid, T., et al. (2014). A review of the volatiles from the healthy human body. *J. Breath Res.* 8, 014001. doi:10.1088/1752-7155/8/1/014001

Devillier, P., Gallet, C., Salvator, H., Lecoq-Julien, C., Naline, E., Roisse, D., et al. (2022). Biomedical detection dogs for the identification of SARS-CoV-2 infections from axillary sweat and breath samples. *J. Breath. Res.* 16 (3), 037101. doi:10.1088/1752-7163/ac5d8c

Dormont, L., Bessière, J. M., and Cohuet, A. (2013). Human skin volatiles: a review. J. Chem. Ecol. 39, 569-578. doi:10.1007/s10886-013-0286-z Eerdekens, G. J., Rex, S., and Mesotten, D. (2020). Accuracy of blood glucose measurement and blood glucose targets. J. Diabetes Sci. Technol. 14 (3), 553–559. doi:10.1177/1932296820905581

Ehmann, R., Boedeker, E., Friedrich, U., Sagert, J., Dippon, J., Friedel, G., et al. (2012). Canine scent detection in the diagnosis of lung cancer: revisiting a puzzling phenomenon. *Eur. Respir. J.* 39 (3), 669–676. doi:10.1183/09031936.00051711

Elliker, K. R., Sommerville, B. A., Broom, D. M., Neal, D. E., Armstrong, S., and Williams, H. C. (2014). Key considerations for the experimental training and evaluation of cancer odour detection dogs: lessons learnt from a double-blind, controlled trial of prostate cancer detection. *BMC Urol.* 14 (1), 22. doi:10.1186/1471-2490-14-22

Feizi, N., Hashemi-Nasab, F. S., Golpelichi, F., Sabouruh, N., and Parastar, H. (2021). Recent trends in application of chemometric methods for GC-MS and GC×GC-MSbased metabolomic studies. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 138, 116239. doi:10.1016/j.trac. 2021.116239

Gallagher, M., Wysocki, C. J., Leyden, J. J., Spielman, A. I., Sun, X., and Preti, G. (2008). Analyses of volatile organic compounds from human skin. *Br. J. Dermatology* 159 (4), 780–791. doi:10.1111/j.1365-2133.2008.08748.x

Gashimova, E. M., Temerdashev, A. Z., Porkhanov, V. A., Polyakov, I. S., Perunov, D. v., Azaryan, A. A., et al. (2019). Evaluation of the possibility of volatile organic compounds determination in exhaled air by gas chromatography for the noninvasive diagnostics of lung cancer. *J. Anal. Chem.* 74 (5), 472–479. doi:10.1134/s1061934819050034

Gilio, A. D., Palmisani, J., Ventrella, G., Facchini, L., Catino, A., Varesano, N., et al. (2020). Breath analysis: comparison among methodological approaches for breath sampling. *Molecules* 25 (24), 5823. doi:10.3390/molecules25245823

Gonder-Frederick, L. A., Grabman, J. H., Shepard, J. A., Tripathi, A. v., Ducar, D. M., and McElgunn, Z. R. (2017). Variability of diabetes alert dog accuracy in a real-world setting. *J. Diabetes Sci. Technol.* 11 (4), 714–719. doi:10.1177/1932296816685580

Gordon, R. T., Schatz, C. B., Myers, L. J., Kosty, M., Gonczy, C., Kroener, J., et al. (2008). The use of canines in the detection of human cancers. *J. Altern. Complementary Med.* 14 (1), 61–67. doi:10.1089/acm.2006.6408

Grandjean, D., Sarkis, R., Lecoq-Julien, C., Benard, A., Roger, V., Levesque, E., et al. (2020). Can the detection dog alert on COVID-19 positive persons by sniffing axillary sweat samples? A proof-of-concept study. *PLoS One* 15 (12), e0243122. doi:10.1371/ journal.pone.0243122

Guest, C., Dewhirst, S. Y., Lindsay, S. W., Allen, D. J., Aziz, S., Baerenbold, O., et al. (2022). Using trained dogs and organic semi-conducting sensors to identify asymptomatic and mild SARS-CoV-2 infections: an observational study. *J. Travel Med.* 29 (3), taac043. doi:10.1093/jttn/taac043

Guest, C., Pinder, M., Doggett, M., Squires, C., Affara, M., Kandeh, B., et al. (2019). Trained dogs identify people with malaria parasites by their odour. *Lancet Infect. Dis.* 19, 578–580. doi:10.1016/s1473-3099(19)30220-8

Hardin, D. S., Anderson, W., and Cattet, J. (2015). Dogs can Be successfully trained to alert to hypoglycemia samples from patients with type 1 diabetes. *Diabetes Ther.* 6 (4), 509–517. doi:10.1007/s13300-015-0135-x

Haze, S., Gozu, Y., Nakamura, S., Kohno, Y., Sawano, K., Ohta, H., et al. (2022). 2-Nonenal newly found in human body odor tends to increase with aging. *J. Investigative Dermatology* 116, 520–524. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01287.x

Henderson, K. A., and Matthews, I. P. (2002). Biological monitoring of midwives' exposure to N2O using the Bio-VOC breath sampler. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 12 (5), 309–312. doi:10.1038/sj.jea.7500231

Holden, K. A., Ibrahim, W., Salman, D., Cordell, R., McNally, T., Patel, B., et al. (2020). Use of the ReCIVA device in breath sampling of patients with acute breathlessness: a feasibility study. *ERJ Open Res.* 6 (4), 00119-02020. doi:10.1183/23120541.00119-2020

Jendrny, P., Twele, F., Meller, S., Osterhaus, ADME, Schalke, E., and Volk, H. A. (2021a). Canine olfactory detection and its relevance to medical detection. *BMC Infect. Dis.* 21, 838. doi:10.1186/s12879-021-06523-8

Jendrny, P., Twele, F., Meller, S., Osterhaus, ADME, Schalke, E., and Volk, H. A. (2021b). Canine olfactory detection and its relevance to medical detection. *BMC Infect. Dis.* 21, 838. doi:10.1186/s12879-021-06523-8

Jiang, R., Cudjoe, E., Bojko, B., Abaffy, T., and Pawliszyn, J. (2013). A non-invasive method for *in vivo* skin volatile compounds sampling. *Anal. Chim. Acta* 804, 111–119. doi:10.1016/j.aca.2013.09.056

Kenneth, G., Furton, M. F., Ross, J., and Harper, S. O. (2008). Controlled odor mimic permeation system. US20080295783A1. United States Patent Application Publication.

Kenneth, G., Furton, M. F., Ross, J., and Harper, S. O. (2017). Controlled odor mimic permeation system. US20080295783A1. United States Patent Application Publication.

Kokocińska-Kusiak, A., Woszczyło, M., Zybala, M., Maciocha, J., Barłowska, K., and Dzięcioł, M. (2021). Canine olfaction: physiology, behavior, and possibilities for practical applications. *Animals* 11 (8), 2463. doi:10.3390/ani11082463

Koureas, M., Kirgou, P., Amoutzias, G., Hadjichristodoulou, C., Gourgoulianis, K., and Tsakalof, A. (2020). Target analysis of volatile organic compounds in exhaled breath for lung cancer discrimination from other pulmonary diseases and healthy persons. *Metabolites* 10 (8), 317–318. doi:10.3390/metabo10080317 Kwak, J., Fan, M., Harshman, S. W., Garrison, C. E., Dershem, V. L., Phillips, J. B., et al. (2014). Evaluation of Bio-VOC sampler for analysis of volatile organic compounds in exhaled breath. *Metabolites* 4 (4), 879–888. doi:10.3390/metabo4040879

Lenochova, P., Roberts, S. C., and Havlicek, J. (2009). Methods of human body odor sampling: the effect of freezing. *Chem. Senses* 34 (2), 127–138. doi:10.1093/chemse/bjn067

Ligor, T., Ligor, M., Amann, A., Ager, C., Bachler, M., Dzien, A., et al. (2008). The analysis of healthy volunteers' exhaled breath by the use of solid-phase microextraction and GC-MS. J. Breath. Res. 2 (4), 046006. doi:10.1088/1752-7155/2/4/046006

Lippi, G., and Cervellin, G. (2012a). Canine olfactory detection of cancer versus laboratory testing: myth or opportunity. *Clin. Chem. Laboratory Med.* 50, 435–439. doi:10.1515/cclm.2011.672

Lippi, G., and Cervellin, G. (2012b). Canine olfactory detection of cancer versus laboratory testing: myth or opportunity. *Clin. Chem. Laboratory Med.* 50, 435–439. doi:10.1515/cclm.2011.672

Lippi, G., and Heaney, L. M. (2020). The "olfactory fingerprint": can diagnostics be improved by combining canine and digital noses? *Clin. Chem. Lab. Med.* 58 (6), 958–967. doi:10.1515/cclm-2019-1269

Lorenzo, N., Wan, T., Harper, R. J., Hsu, Y. L., Chow, M., Rose, S., et al. (2003). Laboratory and field experiments used to identify *Canis lupus* var. familiaris active odor signature chemicals from drugs, explosives, and humans. *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (8), 1212–1224. doi:10.1007/s00216-003-2018-7

Maa, E., Arnold, J., Ninedorf, K., and Olsen, H. (2021). Canine detection of volatile organic compounds unique to human epileptic seizure. *Epilepsy Behav.* 115, 107690. doi:10.1016/j.yebeh.2020.107690

MacCrehan, W., Young, M., Schantz, M., Craig Angle, T., Waggoner, P., and Fischer, T. (2020). Two-temperature preparation method for PDMS-based canine training aids for explosives. *Forensic Chem.* 21, 100290. doi:10.1016/j.forc.2020.100290

MacCrehan, W. A., Young, M., and Schantz, M. M. (2018a). Measurements of vapor capture-and-release behavior of PDMS-based canine training aids for explosive odorants. *Forensic Chem.* 11, 58–64. doi:10.1016/j.forc.2018.09.002

MacCrehan, W. A., Young, M., and Schantz, M. M. (2018b). Measurements of vapor capture-and-release behavior of PDMS-based canine training aids for explosive odorants. *Forensic Chem.* 11, 58–64. doi:10.1016/j.forc.2018.09.002

Martin, H., Katharina, H., Petra, V., and Christian, L. (2020). Ultraviolet irradiation doses for coronavirus inactivation-review and analysis of coronavirus photoinactivation studies. *GMS Hyg. Infect. Control* 15, Doc08. doi:10.3205/dgkh000343

Martin, H. J., Turner, M. A., Bandelow, S., Edwards, L., Riazanskaia, S., and Thomas, C. L. P. (2016). Volatile organic compound markers of psychological stress in skin: a pilot study. *J. Breath. Res.* 10 (4), 046012. doi:10.1088/1752-7155/10/4/046012

McCulloch, M., Jezierski, T., Broffman, M., Hubbard, A., Turner, K., and Janecki, T. (2006). Diagnostic accuracy of canine scent detection in early- and late-stage lung and breast cancers. *Integr. Cancer Ther.* 5 (1), 30–39. doi:10.1177/1534735405285096

Md Ghazi, M. G., Lee, L. C., Sino, H., and Abdul Halim, M. I. (2022). Review of contemporary chemometric strategies applied on preparing GC–MS data in forensic analysis. *Microchem. J.* 181, 107732. doi:10.1016/j.microc.2022.107732

Mendel, J., Frank, K., Edlin, L., Hall, K., Webb, D., Mills, J., et al. (2021). Preliminary accuracy of COVID-19 odor detection by canines and HS-SPME-GC-MS using exhaled breath samples. *Forensic Sci. Int.* 3, 100155. doi:10.1016/j.fsisyn.2021.100155

Mitra, A., Choi, S., Boshier, P. R., Razumovskaya-Hough, A., Belluomo, I., Spanel, P., et al. (2022). The human skin volatolome: a systematic review of untargeted mass spectrometry analysis. *Metabolites* 12, 824. doi:10.3390/metabo12090824

Mochalski, P., King, J., Haas, M., Unterkofler, K., Amann, A., and Mayer, G. (2014). Blood and breath profiles of volatile organic compounds in patients with end-stage renal disease. *BMC Nephrol.* 15 (1), 43–14. doi:10.1186/1471-2369-15-43

Mochalski, P., King, J., Klieber, M., Unterkofler, K., Hinterhuber, H., Baumann, M., et al. (2013b). Blood and breath levels of selected volatile organic compounds in healthy volunteers. *Analyst* 138 (7), 2134–2145. doi:10.1039/c3an36756h

Mochalski, P., King, J., Unterkofler, K., and Amann, A. (2013a). Stability of selected volatile breath constituents in Tedlar, Kynar and Flexfilm sampling bags. *Analyst* 138 (5), 1405–1418. doi:10.1039/c2an36193k

Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D. G., and Group, P. (2022). Preferred reporting Items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. Available from: www.annals.org.

Monedeiro, F., Monedeiro-Milanowski, M., Ratiu, I. A., Brożek, B., Ligor, T., and Buszewski, B. (2021). Needle trap device-gc-ms for characterization of lung diseases based on breath voc profiles. *Molecules* 26 (6), 1789. doi:10.3390/molecules26061789

Monteiro, M., Carvalho, M., Henrique, R., Jerónimo, C., Moreira, N., de Lourdes Bastos, M., et al. (2014). Analysis of volatile human urinary metabolome by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry for biomarker discovery: application in a pilot study to discriminate patients with renal cell carcinoma. *Eur. J. Cancer* 50 (11), 1993–2002. doi:10.1016/j.ejca.2014.04.011

Montes, Á. G., López-Rodó, L. M., Rodríguez, I. R., Dequigiovanni, G. S., Segarra, N. V., Sicart, R. M. M., et al. (2017). Lung cancer diagnosis by trained dogs. *Eur. J. Cardiothoracic Surg.* 52 (6), 1206–1210. doi:10.1093/ejcts/ezx152

Moser, E., and McCulloch, M. (2010a). Canine scent detection of human cancers: a review of methods and accuracy. *J. Veterinary Behav.* 5, 145–152. doi:10.1016/j.jveb. 2010.01.002

Moser, E., and McCulloch, M. (2010b). Canine scent detection of human cancers: a review of methods and accuracy. *J. Veterinary Behav.* 5, 145–152. doi:10.1016/j.jveb. 2010.01.002

Muir, B., Quick, S., Slater, B. J., Cooper, D. B., Moran, M. C., Timperley, C. M., et al. (2005). Analysis of chemical warfare agents: II. Use of thiols and statistical experimental design for the trace level determination of vesicant compounds in air samples. *J. Chromatogr. A* 1068 (2), 315–326. doi:10.1016/j.chroma.2005.01.094

Murtada, K., Galpin, V., Grandy, J. J., Singh, V., Sanchez, F., and Pawliszyn, J. (2021). Development of porous carbon/polydimethylsiloxane thin-film solidphase microextraction membranes to facilitate on-site sampling of volatile organic compounds. *Sustain Chem. Pharm.* 21, 100435. doi:10.1016/j.scp.2021. 100435

National Institute of Standards and Technology, (2009). SWGDOG SC2-GENERAL GUIDELINES. https://www.nist.gov/system/files/documents/2018/04/25/swgdog\_general\_guidelines.pdf.

Penn, D. J., Oberzaucher, E., Grammer, K., Fischer, G., Soini, H. A., Wiesler, D., et al. (2007). Individual and gender fingerprints in human body odour. J. R. Soc. Interface 4 (13), 331–340. doi:10.1098/rsif.2006.0182

Phillips, M., Bauer, T. L., and Pass, H. I. (2019). A volatile biomarker in breath predicts lung cancer and pulmonary nodules. *J. Breath. Res.* 13 (3), 036013. doi:10.1088/1752-7163/ab21aa

Pirrone, F., and Albertini, M. (2017a). Olfactory detection of cancer by trained sniffer dogs: a systematic review of the literature. *J. Veterinary Behav. Clin. Appl. Res.* 19, 105–117. doi:10.1016/j.jveb.2017.03.004

Pirrone, F., and Albertini, M. (2017b). Olfactory detection of cancer by trained sniffer dogs: a systematic review of the literature. *J. Veterinary Behav. Clin. Appl. Res.* 19, 105–117. doi:10.1016/j.jveb.2017.03.004

Pizzini, A., Filipiak, W., Wille, J., Ager, C., Wiesenhofer, H., Kubinec, R., et al. (2018). Analysis of volatile organic compounds in the breath of patients with stable or acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *J. Breath. Res.* 12 (3), 036002. doi:10.1088/1752-7163/aaa4c5

Prada, P., Curran, A., and Furton, K. (2014). Characteristic human scent compounds trapped on natural and synthetic fabrics as analyzed by SPME-GC/MS. *J. Forensic Sci. Criminol.* 1 (1). doi:10.15744/2348-9804.1.s101

Reeve, C., Cummings, E., McLaughlin, E., Smith, S., and Gadbois, S. (2020). An idiographic investigation of diabetic alert dogs' ability to learn from a small sample of breath samples from people with type 1 diabetes. *Can. J. Diabetes* 44 (1), 37–43.e1. doi:10.1016/j.icid.2019.04.020

Reeve, C., Wentzell, P., Wielens, B., Jones, C., Stehouwer, K., and Gadbois, S. (2018). Assessing individual performance and maintaining breath sample integrity in biomedical detection dogs. *Behav. Process.* 155, 8–18. doi:10.1016/j.beproc.2017.08.008

Reyes-Garcés, N., Gionfriddo, E., Gómez-Ríos, G. A., Alam, M. N., Boyacl, E., Bojko, B., et al. (2018). Advances in solid phase microextraction and perspective on future directions. *Anal. Chem.* 90, 302–360. doi:10.1021/acs.analchem.7b04502

Riazanskaia, S., Blackburn, G., Harker, M., Taylor, D., and Thomas, C. L. P. (2008). The analytical utility of thermally desorbed polydimethylsilicone membranes for *in-vivo* sampling of volatile organic compounds in and on human skin. *Analyst* 133 (8), 1020–1027. doi:10.1039/b802515k

Robinson, A., Busula, A. O., Voets, M. A., Beshir, K. B., Caulfield, J. C., Powers, S. J., et al. (2018). Plasmodium-associated changes in human odor attract mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (18), E4209-E4218–18. doi:10.1073/pnas.1721610115

Rodríguez-Esquivel, M., Rosales, J., Castro, R., Apresa-García, T., Garay, Ó., Romero-Morelos, P., et al. (2018). Volatolome of the Female genitourinary area: toward the metabolome of cervical cancer. *Arch. Med. Res.* 49 (1), 27–35. doi:10.1016/j.arcmed. 2018.04.004

Roodt, A. P., Naudé, Y., Stoltz, A., and Rohwer, E. (2018). Human skin volatiles: passive sampling and GC  $\times$  GC-ToFMS analysis as a tool to investigate the skin microbiome and interactions with anthropophilic mosquito disease vectors. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1097–1098, 83–93. doi:10.1016/j. jchromb.2018.09.002

Rooney, N. J., Guest, C. M., Swanson, L. C. M., and Morant, S. (2019). How effective are trained dogs at alerting their owners to changes in blood glycaemic levels? variations in performance of glycaemia alert dogs. *PLoS One* 14 (1), e0210092. doi:10.1371/journal. pone.0210092

Saito, K., Tokorodani, Y., Sakamoto, C., and Kataoka, H. (2021). Headspace solidphase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry for the determination of 2-nonenal and its application to body odor analysis. *Molecules* 26 (19), 5739. doi:10. 3390/molecules26195739

Schroeder, W. (2015). Volatile S-nitrosothiols and the typical smell of cancer. J. Breath. Res. 9 (1), 016010. doi:10.1088/1752-7155/9/1/016010

Sgorbini, B., Ruosi, M. R., Cordero, C., Liberto, E., Rubiolo, P., and Bicchi, C. (2010). Quantitative determination of some volatile suspected allergens in cosmetic creams spread on skin by direct contact sorptive tape extraction-gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1217 (16), 2599-2605. doi:10.1016/j.chroma.2009. 12.052

Simon, A. G. (2022). Analysis of non-hazardous canine training aids for triacetone triperoxide (TATP). Forensic Chem. 30, 100440. doi:10.1016/j.forc.2022.100440

Simon, A. G., De Greeff, L. E., Frank, K., Peranich, K., Holness, H., and Furton, K. G. (2019). A method for controlled odor delivery in olfactory field-testing. *Chem. Senses* 44 (6), 399–408. doi:10.1093/chemse/bjz031

Simon, A. G., Van Arsdale, K., Barrow, J., and Wagner, J. (2021). Real-time monitoring of TATP released from PDMS-based canine training aids versus bulk TATP using DART-MS. *Forensic Chem.* 23, 100315. doi:10.1016/j.forc.2021.100315

Sinclair, E., Walton-Doyle, C., Sarkar, D., Hollywood, K. A., Milne, J., Lim, S. H., et al. (2021). Validating differential volatilome profiles in Parkinson's disease. *ACS Cent. Sci.* 7 (2), 300–306. doi:10.1021/acscentsci.0c01028

Smeets, M. A. M., Rosing, E. A. E., Jacobs, D. M., van Velzen, E., Koek, J. H., Blonk, C., et al. (2020). Chemical fingerprints of emotional body odor. *Metabolites* 10 (3), 84. doi:10.3390/metabo10030084

Soini, H. A., Bruce, K. E., Klouckova, I., Brereton, R. G., Penn, D. J., and Novotny, M. (2006). *In situ* surface sampling of biological objects and preconcentration of their volatiles for chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 78 (20), 7161–7168. doi:10.1021/ ac0606204

Sonoda, H., Kohnoe, S., Yamazato, T., Satoh, Y., Morizono, G., Shikata, K., et al. (2011). Colorectal cancer screening with odour material by canine scent detection. *Gut* 60 (6), 814–819. doi:10.1136/gut.2010.218305

Sukul, P., Oertel, P., Kamysek, S., and Trefz, P. (2017). Oral or nasal breathing? Realtime effects of switching sampling route onto exhaled VOC concentrations. *J. Breath. Res.* 11 (2), 027101. doi:10.1088/1752-7163/aa6368

The Patent Cooperation Treaty, (2007). Identification of humans through characteristic compounds detected in human scent. Washington, D C, United States: The Patent Cooperation Treaty.

Trivedi, D. K., Sinclair, E., Xu, Y., Sarkar, D., Walton-Doyle, C., Liscio, C., et al. (2019a). Discovery of volatile biomarkers of Parkinson's disease from sebum. *ACS Cent. Sci.* 5 (4), 599–606. doi:10.1021/acscentsci.8b00879

Trivedi, D. K., Sinclair, E., Xu, Y., Sarkar, D., Walton-Doyle, C., Liscio, C., et al. (2019b). Discovery of volatile biomarkers of Parkinson's disease from sebum. *ACS Cent. Sci.* 5 (4), 599–606. doi:10.1021/acscentsci.8b00879

Wackermannová, M., Pinc, L., and Jebavý, L. (2016). Olfactory sensitivity in mammalian species. *Physiol. Res.* 65 (3), 369–390. doi:10.33549/physiolres.932955

Walczak, M., Jezierski, T., Górecka-Bruzda, A., Sobczyńska, M., and Ensminger, J. (2012). Impact of individual training parameters and manner of taking breath odor samples on the reliability of canines as cancer screeners. *J. Veterinary Behav. Clin. Appl. Res.* 7 (5), 283–294. doi:10.1016/j.jveb.2012.01.001

Westphal, K., Dudzik, D., Waszczuk-Jankowska, M., Graff, B., Narkiewicz, K., and Markuszewski, M. J. (2022). Common strategies and factors affecting off-line breath sampling and volatile organic compounds analysis using thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry (TD-GC-MS). *Metabolites* 13, 8. doi:10.3390/metabol3010008

White, I. R., and Fowler, S. J. (2018). "Capturing and storing exhaled breath for offline analysis," in *Breath analysis* (Amsterdam, Netherlands: Elsevier), 13–31.

Williams, H., and Pembroke, A. (1989). Sniffer dogs in the melanoma clinic? *Lancet* 1, 734. doi:10.1016/s0140-6736(89)92257-5

Wilson, A. D., and Forse, L. B. (2023). Potential for early noninvasive COVID-19 detection using electronic-nose technologies and disease-specific VOC metabolic biomarkers. *Sensors* 23 (6), 2887. doi:10.3390/s23062887

Wooding, M., Dodgen, T., Rohwer, E. R., and Naudé, Y. (2021). Mass spectral studies on the human skin surface for mosquito vector control applications. *J. Mass Spectrom.* 56 (2), e4686. doi:10.1002/jms.4686

Wooding, M., Rohwer, E. R., and Naudé, Y. (2020). Chemical profiling of the human skin surface for malaria vector control via a non-invasive sorptive sampler with GC×GC-TOFMS. *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (23), 5759–5777. doi:10.1007/s00216-020-02799-y

Xu, Y., Dixon, S. J., Brereton, R. G., Soini, H. A., Novotny, M. V., Trebesius, K., et al. (2007). Comparison of human axillary odour profiles obtained by gas chromatography/ mass spectrometry and skin microbial profiles obtained by denaturing gradient gel electrophoresis using multivariate pattern recognition. *Metabolomics* 3 (4), 427–437. doi:10.1007/s11306-007-0054-6 Cette étude nous a permis une meilleure compréhension des problématiques et des enjeux de la volatolomique appliquée au domaine clinique, plus particulièrement concernant l'analyse de l'air expiré et de la sueur. L'analyse de ces matrices biologiques gazeuses est complexe, et le choix des matériaux et méthodes utilisés influence significativement les résultats. Parmi les matrices pouvant être prélevées de manière non invasive, l'urine nous semble intéressante notamment pour l'analyse par olfaction canine, puisque l'échantillon d'urine peut être présenté directement aux chiens de détection, sans avoir recours à un dispositif de prélèvement particulier. Les caractéristiques de l'urine humaine, ainsi que son analyse par GC-MS et par olfaction canine, sont traitées dans le chapitre suivant.

# Chapitre 2

# Chapitre 2 : Etat de l'art des protocoles de prélèvement, extraction et analyse des COVs de l'urine par GC-MS et par olfaction canine

## 1. Composition de l'urine

L'analyse de l'urine est essentielle dans le domaine biomédical. Cette matrice biologique composée majoritairement d'eau (95%) et d'urée (2%), est un produit final du processus métabolique, et contient une large gamme de composés excrétés par l'organisme (électrolytes, protéines, enzymes, COVs...). De ce fait, son analyse peut être un outil diagnostique pertinent pour détecter diverses pathologies. Actuellement, l'analyse urinaire est utilisée pour diagnostiquer les infections (concentration élevée de globules blancs, ou par exemple, de nitrites [20]), surveiller la santé rénale (taux de protéines ou de sang dans l'urine [20]), ou encore pour surveiller le taux de glucose des patients diabétiques [21]

L'étude des composés volatils dans l'urine constitue une nouvelle voie pour le diagnostic. On retrouve diverses familles chimiques dans l'urine, notamment des cétones, des phénols, des alcènes, des thiols, des furanes et des aldéhydes. L'un des métabolites typiquement retrouvé dans l'urine est le p-crésol (environ 50 mg / jour). Ce composé est produit de manière endogène à partir de la tyrosine, par des bactéries anaérobies dans l'intestin. Il s'agit d'un produit final de la dégradation des protéines, de ce fait, il peut aussi être retrouvé en quantité plus importante dans l'urine d'individus ayant un régime alimentaire riche en protéines [22]. Par ailleurs, les cétones sont les métabolites volatils les plus souvent détectés dans l'urine [23]. Ces molécules ne sont pas facilement métabolisées par le corps humain, et peuvent être éliminées intactes dans l'urine [24].

## 2. Revue de la littérature

L'analyse de l'urine peut sembler à priori plus aisée que l'analyse des matrices gazeuse telles que l'air expiré ou la sueur. Or, la préparation des échantillons d'urine pour l'analyse par GC-MS ou par olfaction canine, est une étape clé. En effet, les différentes étapes de préparation (ajustement du pH, méthodes d'extraction, étalonnage interne) sont des éléments influençant significativement la détection des COVs urinaires.

Cette revue vise à présenter les matériaux et méthodes retrouvés dans la littérature, allant du prélèvement à l'analyse de l'échantillon d'urine, pour la détection et/ou la quantification des COVs dans un contexte clinique. L'emploi des chiens de détection, et de la GC-MS sont abordés. Les avantages et les limites des protocoles existants dans la littérature sont discutés. De plus, des suggestions concernant la préparation d'échantillon pour l'olfaction canine sont proposées.



Contents lists available at ScienceDirect

## Microchemical Journal



journal homepage: www.elsevier.com/locate/microc

**Review Article** 

## Harnessing the potential of sniffing dogs and GC–MS in analyzing human urine: A comprehensive review of sample preparation and extraction techniques

Laetitia Maidodou<sup>a,b,c</sup>, Damien Steyer<sup>a</sup>, Marie-Anaïs Monat<sup>d</sup>, Michelle Leemans<sup>e</sup>, Isabelle Fromantin<sup>e,f</sup>, Eric Marchioni<sup>b</sup>, Igor Clarot<sup>c,\*</sup>

<sup>b</sup> Université de Strasbourg, IPHC, UMR7178, Strasbourg, France <sup>c</sup> Université de Lorraine, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés UMR 7274, Nancy, France

<sup>d</sup> Inserm U1258, CNRS UMR7104, IGBMC, Université de Strasbourg, France

e Clinical Epidemiology and Ageing, IMRB—Paris Est Créteil University, Inserm U955, Créteil, France

#### ABSTRACT

Pathologies such as cancers or infectious diseases can induce modifications in the concentrations of urinary volatile metabolites. Indeed, urine is a large source of Volatile Organic Compounds (VOCs) from the human body. Canine olfaction and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) systems are promising tools for the development of non-invasive diagnosis methods based on the analysis of urine. This review paper aims to provide an overview of materials and methods found in the literature for urinary VOCs analysis by detection dogs and GC-MS instruments. It highlights the impact of urine collection procedures and storage conditions. Then, sample preparation protocols for canine olfaction are discussed, as well as for GC-MS analysis, focusing on headspace-based extraction techniques. In the case of instrumental analysis, a significant variability of volatile profiles can be observed depending on the sample preparation (urine pH, extraction methods), and analytical parameters. Lastly, limitations of urinary VOCs analysis for medical diagnosis purposes are considered.

#### 1. Introduction

The field of volatolomics has emerged as a promising tool for medical diagnosis [1], as well as for assessing exposure to environmental pollutants [2]. Over the last decades, urine has been one of the most analyzed body fluids [3]. This tendency is due to the numerous advantages offered by this biological matrix. Human urine can be noninvasively collected, allowing for frequent sampling without causing discomfort or pain to the patient. Moreover, the overall concentrations of VOCs are higher in urine than in other body fluids [4]. More than 750 VOCs have been identified in human urine [5-11]. The most commonly found chemical family in urine is ketones [2,6,9–18]. These molecules are not easily metabolized by the human body and are wasted in urine [9]. While ketones may be considered urinary metabolites and potential disease biomarkers, they could also stem from external sources of contamination. For instance, Alonso et al.[2] suggest that 2-heptanone and 4-heptanone found in human urine may result from exposure to plasticizers.

Since the middle-age, urine has been used for health diagnosis [19].

The sweet and honey taste of urine with a fruity odor was the main indicator in the diagnosis of diabetes [20]. Later, the fruity odor of urine was attributed to an increased concentration of acetone in urine of patients with diabetes mellitus [20]. Increased levels of acetone in urine are also observed after fasting for 24 h [21], or among subjects with diarrhea [22]. Nowadays, pathologies such as cancers (prostate [23-32], lung [12,33,34], breast [17,35-37], colorectal [38-40], bladder [41-44] or lymphoma [45]) are studied based on patients urine volatile profiles.

To detect VOCs, several analytical instruments can be employed, involving one or two-dimensional GC-MS, GC coupled to Ion Mobility Spectrometry (GC-IMS), Selected-Ion Flow-Tube Mass Spectrometry (SIFT-MS), Proton-Transfer-Reaction Mass Spectrometry (PTR- MS), Field Asymmetric Ion Mobility Spectrometry (FAIMS) or sensor-based techniques including electronic-noses [46,47]. For instance, Spanel et al. [48], utilized SIFT-MS to quantify a targeted COV (formaldehyde) in urine headspace of patients with bladder and prostate cancer. In the case of prostate cancer, Asimakopoulos et al. [25] found a specific pattern of VOCs in the urine of 14 patients compared to 27 healthy

https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.111907

Received 14 May 2024; Received in revised form 8 October 2024; Accepted 10 October 2024 Available online 11 October 2024 0026-265X/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Twistaroma, Illkirch-Graffenstaden, France

f Wound Care and Research Unit, Curie Institute, Paris, France

<sup>\*</sup> Corresponding author. E-mail address: igor.clarot@univ-lorraine.fr (I. Clarot).

individuals that was revealed by an electronic nose. Despite the various alternatives to (one or two-dimensional) GC–MS, it remains the golden tool for VOCs identification and quantification. The urine composition is complex and low limits of detection (< 1 ppb) for VOCs are required for clinical applications. A high sensitivity of detection relies on the separative resolution and detector performances, but also the optimization of the sample preparation.

Canine olfaction has also been employed as a detection tool. The dog's olfactory system allows the detection of odors at a threshold from ten thousand to one million times below the detection threshold of humans. Detection dogs' limits of detection achieve concentrations < 0.001 ppb (amyl acetate) [49], lower than electronic nose (ppb) [49], and similar to high resolution GC–MS systems. Dogs have a large portion of their brains devoted to olfaction and a very high number of olfactory sensors in their nasal cavity [50]. Their potential use for early detection of pathologies such as infectious diseases or cancers is very promising. To succeed, detection dogs have to be trained properly to be able to identify specific patterns of VOCs. The collection, storage conditions, and sample preparation are key points to ensure the quality of urine samples that are presented to the dog. One of the obstacles that remains to be overcome is the lack of guidelines and standardization for sample collection, storage, and preparation [32,51].

To begin, this review study places particular emphasis on urine sampling and storage prior to analysis. Key elements such as the choice of storage containers, storage conditions including time and temperature, and the impact of freeze–thaw cycles on urine are discussed. Then, sample preparation protocols for canine olfaction are reported, emphasizing the choice of suitable containers, virus inactivation methods, and sample volume and temperature. Furthermore, the sample preparation for GC–MS analysis is detailed, highlighting the impact of urine pH and extraction techniques. The discussion section delves into the importance of standardizing dogs' training for consistent results, proposes improvements in sample preparation for canine olfaction, evaluates extraction methods for GC–MS analysis, and lastly explain limitations of urinary VOCs analysis for medical diagnosis applications. Finally, key recommendations for urine handling to enhance analytical accuracy and reliability are resumed.

#### 2. Methods

In adherence to the widely recognized Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) standards, our search was conducted independently on both Pubmed and Web of Science. PRISMA is the most commonly utilized method for systematic reviews [52].

#### 2.1. Literature search

#### 2.1.1. Canine olfaction

The subsequent sequence was researched in Web of Sciences and PubMed databases: ((canine olfaction) OR (detection dog)) AND ((odor) OR (odour) OR (volatile organic compounds) OR (volatile)) AND (urine) AND ((diagnosis) OR (disease) OR (medical)) AND ((human) OR (patient) OR (subject)). Studies have been selected without date restriction until 29 February 2024.

#### 2.1.2. GC-MS analysis

The subsequent sequence was researched in Web of Sciences and PubMed databases: ((GC–MS) OR (gas chromatography coupled to mass spectrometry)) AND ((odor) OR (odour) OR (volatile organic compounds) OR (VOC)) AND (urine) AND ((diagnosis) OR (disease) OR (medical)) AND ((human) OR (patient) OR (subject)). Studies have been selected without date restrictions until 29 of February 2024.

#### 2.2. Study selection and eligibility criteria

Following the PRISMA standards, data obtained from two independent searches on Pubmed and Web of Science were consolidated into a worksheet file, incorporating essential details such as DOI number, title, publication year, authors, journal, and abstracts.

For canine olfaction, Web of Sciences provided 56 results and PubMed 34 results. Eighteen duplicate results were removed. The titles and abstracts were reviewed to identify and exclude off-subject studies (related to sweat analysis, canine cancers, breath analysis, or sniffer mice). Fifteen studies were considered relevant for this section.

For GC–MS analysis, Web of Sciences provided 117 results and PubMed 138 results. The titles and abstracts were reviewed to identify off-subject studies (related to sweat or breath analysis or to the detection of non-volatile compounds). Articles in duplicates, or not relevant to the topic were excluded (in vitro studies or experiments with others analytical instruments than one- or two-dimensional GC–MS). Finally, 46 papers were considered relevant for this section Fig. 1.

To ensure a comprehensive overview, reference lists of the included articles were screened based on their titles and abstracts, enabling the inclusion of further pertinent articles.

#### 2.3. Data extraction

The required elements were extracted from the included studies, and tables were created to summarize the studies of interest. The Table 1 outlines the presentation of samples to biomedical detection dogs to shed light on the experimental setup under which the detection dogs were exposed to urine samples. Solid Phase Microextraction (SPME) and Headspace (HS) extractions are highly preferred techniques for analyzing volatile compounds in urine samples by GC-MS. Table 2 delves into the analytical sensitivity obtained with these extraction methods prior to GC-MS analysis. The type of mass spectrometer (MS) coupled to GC is reported in this table, as it plays a significant role in the analytical performances. In Table 3, Limits of Quantification (LOQs) of compounds reported in at least two papers and achieved with diverse sample preparation techniques are reported. In Table 4, sensitivity and specificity results achieved through the collaboration of detection dogs are reported. These data serve as indicators of the dog's performance in accurately detecting diverse pathologies. Finally, Supplementary Table S1 offers a more detailed overview of the experimental parameters used for headspace-based analysis of urinary volatile compounds. As well, Supplementary Table S2 provides a specified examination of the experimental parameters utilized for SPME-based analysis of urine for the identification of biomarkers associated with various diseases.

#### 3. Results

The process from sampling to analysis is resumed in Fig. 2. Overall, sampling and storage protocols present similarities in the papers reviewed. Major disparities in materials and methods are observed in the sample preparation, both for the sample presentation to detection dogs and for GC–MS analysis.

#### 3.1. Urine sampling and storage

Urine is a biological fluid containing numerous volatile and nonvolatile compounds within broad structural types and physicochemical properties. The composition of urine varies according to factors such as gender [53], hormonal cycles [54], smoking [55], diet [56], and fluid intake [57], to name a few. To reduce the diet-induced and the urine dilution variability, patients are often requested to sample morning urine after overnight fasting, or to perform a 24 h collection [58,59]. It is also common in the scientific community to express levels of metabolites and VOCs as a ratio to creatinine concentration [60,61], or to measure the urine specific gravity [62], to consider variations in urine



Fig. 1. Prisma flowchart.

Table 1

Sample presentation to the detection dogs.

Type of container used to present samples to the dogs	Urine volume presented to dogs	Ref.
New open-top, polypropylene test tube	1 mL	[16]
Test tubes placed in wooden storage containers; each box is covered by a metal mesh	1 mL	[75]
A screw-top 20-mL scintillation vial	1 mL	[71]
Polypropylene specimen containers (60 ml, 40 mm diameter)	0.5 mL	[77]
Circular perforated metal containers	2 mL	[10]
Metallic casing, protected by a perforated metal cover, for the dogs to sniff through six 20 mm diameter scent holes	0.5 mL	[81]
Training Aid Delivery Device (TADD)	0.4 mL	[83]
Training Aid Delivery Device (TADD)	0.1 mL	[49]
Samples are pipetted onto filter paper in Petri dishes (58 x 15 mm)	not specified	[32]
Not specified	1 mL	[15]
Not specified	1 mL	[74]
Not specified	1-2 droplets	[18]

dilution. Creatinine excretion rate in human urine is quite stable but depends on factors such as age, gender, and physical activity [58,63]. There is no consensus on the most efficient normalization method [64], but it is still highly recommended to choose one to reduce confounding effects of overly dilute or hyper-concentrated urine samples [60,65].

The microbial growth in urine can also play a significant role in its chemical composition [66]. A sampling method that reduces the risk of external contamination is crucial. Patients have to be informed of contamination risks and requested to follow a detailed protocol to collect a clean urine sample [67]. The protocol should particularly include guidance on pre-cleaning of the genital area before urine collection [67]. Indeed, bacteria present on the skin and mucus surfaces in the genital area, constitute a major source of sample contamination [68]. Also, studies have demonstrated that the mid-stream urine is the most suitable sample, since contaminant bacteria are minimized in comparison to the first stream of urine [68,69]. Moreover, to ensure that patients have no infection that could cause a change in urine composition, dipstick urine analysis is sometimes performed [27,42,70].

#### 3.1.1. Storage containers

As there is no universal container for urine collection, researchers are seeking for the most suitable container which has to be free of contaminants and composed of non-absorbing materials. In most of the studies, researchers opt for sterile containers. Samples are collected in polypropylene tubes [32,33,71], PVC [5,72], glass [35,73], or paper cups [74,75]. In one of the reviewed studies [76], researchers chose to transfer the samples into heparinized vials and performed the analysis by GC–MS within 2 h after the collection. The heparin coating aids in maintaining the integrity of the urine sample by preventing the formation of clots or sediments.

#### 3.1.2. Storage time and temperature

Most of the time, samples cannot be analyzed directly after their collection. To avoid biochemical reactions in urine during the storage time, researchers choose to freeze the samples at -20 °C or -80 °C before their use for canine olfaction or GC–MS analysis. The storage time is not always reported in the reviewed papers. Samples are stored for 4 weeks in the study of Amundsen *et al.* [33], and up to 6 months for Elliker *et al.* [32] and Willis *et al.* [77]. According to Banday *et al.* [78], no differences are observed in the urinary volatile profile of samples stored for up to one month at -80 °C. Overall, the recommended storage temperature for biological samples is -80 °C for an undefined time. However, if freezing at -80 °C is not accessible, storing samples at -20 °C for up to 6 months does not compromise the integrity of VOCs in urine [79].

#### 3.1.3. Time interval from sampling to freezing

Kwak *et al.* [10] analyzed fresh and 24 h aged human urine samples by SPME GC–MS. They observed modifications in the volatile profile of human urine samples after a 24-hour storage at room temperature in an uncapped glass jar. They found a decrease in concentration of certain VOCs due to the urine evaporation (Acetone, 2-Butanone, Ethanol, 2-Pentanone, 2-Methyl-3-pentanone, 2-Hexanone, 3-Hexanone, 3-Heptanone, 3-Ethyl-2-pentanone, 3-Methyl-2-hexanone, 4-Heptanone, 2-Heptanone, 3-Methyl-2-heptanone, 6-Methyl-3-heptanone, 3-Methylcyclopentanone, 2-Methyl-4-heptanone, 4-Nonanone, 3-Ethylcyclopentanone, 3,5-Dimethyl-2-octanone, 2-Nonanone, p-Menthan-3one, 3,6-Dimethylbenzofuran, p-Menth-1-en-3-one, a-Terpene and p-

#### Table 2

Sensitivity of VOCs detection with SPME or HS extraction prior to GC-MS analysis (SQD: Simple Quadrupole, SIM: Single Ion Monitoring, ToF: Time of Flight).

Cohort	Extraction	GC-Column	MS	Targeted VOCs	LOQ	Ref.
10 healthy adults on an unrestricted diet	SPME (CAR/PDMS fiber)	Carbowax (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 $\mu m$ )	SQD, SIM mode	trimethylamine	47.3 μg/L (0.8 μmol/L)	[92]
30 healthy subjects, 101 patients with B-cell Non-Hodgkin's Lymphoma	SPME (CAR/ PDMS)	HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	SQD, scan mode 40–350 m/z	4-heptanone, 2-methylpyrazine, 2-methylbutanal, 2,6-dimethyl-7-octen-2-ol, decanoic acid	From 2.5 to 9.5 $\mu$ g/L	[45]
18 healthy smokers and 18 healthy non-smokers	SPME (DVB/ PDMS) with a prior derivatization step with PFBHA	VF-5 ms (30 m x0.25 mm x0.25 mm)	Ion Trap (IT/ MS)	44 carbonyl volatile compounds	from 0.029 to 1.66 µg/L, except for butanal, 2- butanone, 4-heptanone, and 4-hydroxy-2-nonenal (respectively 2.78, 2.67, 3.14, 50.0 µg/L)	[55]
19 healthy individuals	SPME (CAR/ PDMS)	Rt-Q-BOND column (30 m $\times$ 0.25 mm x 8 $\mu$ m, 100 % divinylbenzene phase)	Selective Reagent Ionization (SRI)-ToF-MS	10 ketones, 3 volatile thiols and 3 heterocyclic compounds	from 0.02 to 0.17 µg/L	[6]
25 Healthy subjects and 10 lung cancer patients	SPME (PDMS/ DVB)	CP-PoraBOND Q (25 mm $\times$ 0.25 mm $\times$ 3 $\mu$ m)	SQD, SIM mode	hexanal, heptanal	Respectively 0.23 µg/L and 0.21 µg/L	[93]
400 patients with diverse metabolic disorder (acute neurological disturbances, hypoglycaemia, ketosis, metabolic acidosis)	SPME (CAR/ PDMS)	Rt-BetaDEXse chiral (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)	SQD, scan mode 33–400 <i>m/z</i>	3-penten-2-one, acetaldehyde	semi-quantification in ppb	[72]
19 patients of solid tumors or hematologic diseases	SPME (CW/DVB)	DB-WAX (30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.5 $\mu$ m)	SQD, SIM mode	acrolein	0.056 µg/L	[94,95]
3 patients with solid tumors, treated by a large dose of cyclophosphamide	Headspace	DB-1 (60 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 $\mu m)$	SQD, SIM mode	acrolein	0.056 µg/L	[96]
12 lung cancer patients, 12 healthy subjects	Headspace	DB-VRX (20 m $\times$ 0.18 mm $\times$ 1 $\mu m)$	SQD, SIM and Scan mode	acetone, 2-butanone, ethyl acetate, 2- pentanone, 4-methyl-2-pentanone, 2- hexanone, 3-heptanone, 2-heptanone, 3-octanone, 2-nonanone	from 0.004 to 0.465 µg/L	[59]
5 healthy subjects, 5 patients with lung cancer	Headspace	DB-VRX (20 m $\times$ 0.18 mm $\times$ 1 $\mu m)$	SQD, SIM/ Scan mode	2-butanone, 2-pentanone, pyrrole, 2- heptanone, 2-ethyl-1-hexanol	From 0.16 to 21 $\mu g/L$	[34]
29 healthy individuals	Dynamic Headspace	DB-5MS capillary column (60 m x 0.25 mm x 1 µm)	SQD, scan mode 47–300 <i>m/z</i>	dichloromethane, chloroform, benzene, trichloroethylene, toluene, tetrachloroethylene, ethylbenzene, m- xylene, p-xylene, styrene, o-xylene	From 0.010 to 0.015 µg/L (except for styrene, 0.050 µg/L)	[97]

#### Table 3

LOQs for five carbonyl compounds frequently reported in urinary VOCs-related papers.

Sample preparation	Extraction	Analysis	LOQs (µg/L) <b>2-</b> pentanone	2- butanone	4-heptanone	2- hexanone	2-nonanone	Ref
5 mL of urine, 3 g of NaCl 1 mL of urine, derivatization with PFBHA (300	Headspace SPME	GC–MS SQD GC-IT/MS	0.022 0.043	0.087 2.670	not quantified 3.140	0.011 0.055	0.004 0.129	[59] [55]
4 mL of urine, 2 g of NaCl	SPME	GC-SRI-ToF- MS	0.044	0.065	0.120	0.126	not quantified	[6]

Cresol). On the contrary, the concentrations of some highly watersoluble compounds such as Trimethylamine, 4-Hydroxy-2-pentanone, Acetic acid, Propylene glycol, 2-Methylbutyric acid, 3-Methylbutyric acid, Acetamide, Caprolactone, Dimethyl sulfone and Pentolactone, increased. Indeed, delayed freezing can lead to the formation of artifacts or secondary products that are not representative of the original urine. Minimizing the time interval between sampling and freezing is therefore crucial. As well, McFarlane *et al.* [80] carried out experiments with urine samples from healthy subjects, stored in sealed containers at different times and room temperature. Field Asymmetric Ion Mobility Spectrometry was used to study the effects of urine sample storage on VOCs profiles. Results demonstrate that a longer storage time at room temperature increased the analytical variability and the total ion counts. The authors finally recommend a 12 h maximum interval at room temperature prior to the samples freezing.

#### 3.1.4. Effects of repeated freeze-thaw cycles of urine

Gordon *et al.* [71] trained and tested dogs for the study of both prostate cancer (57 patients with prostate cancer and 186 controls) and breast cancer (62 female patients with breast cancer and 188 controls). The results of the study were not relevant since the dogs were not able to identify urine from cancer patients in a statistically significant way. In their protocol, frozen samples were thawed to room temperature, aliquots were prepared for the dog's training, and then the remaining samples were refrozen again for further utilization. The authors suspect that repeated freeze–thaw cycles of urine may have led to the loss of VOCs, potentially being one of the factors in the inconclusive results. Lately, Holbrook *et al.* [79] confirmed this hypothesis. They evaluated the effects of multiple factors such as storage temperature, storage duration, sample amount, collection times, fast/no-fast, and freeze–thaw cycles on human urine, analyzed by Stir Bar Sorptive Extraction

#### Table 4

Sensitivity and specificity results with canine olfaction.

Disease	Cohort	Sensitivity results	Specificity results	Ref.
Prostate cancer	117 subjects (50 patients with prostate cancer and 67 control)	not specified	not specified	[32]
Breast cancer and prostate cancer	493 subjects (62 patients with breast cancers and 188 controls; 57 patients with prostate cancers and 186 controls)	no significant results: authors concludes that the effect of the storage time should be evaluated in further studies	not specified	[71]
Lung cancer	432 subjects (77 lung cancer patients and 355 healthy controls)	87.8 %	not specified	[104]
Bladder cancer	36 patients with bladder cancer (27 samples used for training; 9 used for formal testing); 108 controls (diseased and healthy, 54 samples used in training; 54 used for testing)	41 %	not specified	[44]
Prostate cancer	902 subjects (362 with prostate cancer, 540 healthy)	97.7 - 98.7 %	98.6–100 %	[26]
Lung cancer	334 subjects (140 patients lung cancer, 55 patients with other lung diseases, and 139 controls)	45–73 %	89–91 %	[81]
Cervical cancer	195 patients (83 with cervical cancer, 49 with benign uterine diseases, 63 healthy controls)	100 %	100 %	[75]
Breast cancer	200 subjects (40 patients with primary breast cancer, 142 patients with non- breast malignancies, and 18 healthy individuals)	100 %	100 %	[74]
SARS- CoV-2	93 subjects (46 SARS-CoV-2 positives subjects and 47 controls)	95 %	98 %	[49,105]
Prostate cancer	108 patients (59 cancers and 49 controls for the training phase; 33 cancers and 33 controls for the testing phase)	91 %	91 %	[29]
Bladder cancer	210 subjects (30 patients with bladder cancer and 180 healthy controls)	73 %	56–91 %	[77]
Prostate cancer	50 subjects (12 with prostate cancer, 38 controls)	71.40 %	70 - 76.2 %	[31]
SARS- CoV-2	25 children (11 SARS-CoV-2	71 %	99 %	[83]

Table 4 (continued)

Disease	Cohort	Sensitivity results	Specificity results	Ref.
Lung cancer	positives and 14 controls) and 9 adults (5 SARS- CoV-2 positives and 4 controls) 93 subjects (63 with lung cancer and 30 controls)	60 %	29.20 %	[33]

(SBSE) GC–MS. Results of the study [79] show that freeze–thaw cycles cause the most significant changes in urinary VOCs concentrations. Therefore, it is recommended to prepare aliquots of the samples prior to freezing.

#### 3.2. Sample preparation for canine olfaction

#### 3.2.1. Sample container for canine olfaction

Diverse materials, of different shapes and sizes are used to train and test the detection dogs (Table 1). Some researchers used polypropylene devices (test tubes [32,75] or larger containers (up to 60 mL [77]). Other teams used metal containers [26,81], or the Training Aid Delivery Device (TADD) [82]. It has been developed to safely train sniffing dogs to recognize hazardous material (toxic liquid, hazmat, or fine powder) while allowing volatile compounds to emanate freely out of the device so dogs can smell odors without a risk of injury. It consists of a jar, capped with a gas-permeable membrane. The main advantage of this device is that the membrane protects the dogs from exposure to potential pathogens present in patients' samples.

TADD has been used for the detection of SARS-CoV-2 in the urine of patients by Jendrny *et al.* [49] and Essler *et al.* [83]. Both of these two studies present high detection sensitivity (true positive rate) and specificity (true negative rate) results (reported in section 4.2 Table 4).

#### 3.2.2. Virus inactivation

In addition to the use of TADD, Essler *et al.* [83] applied virus inactivation treatment to their samples. The treatment is made either with a detergent NP-40 or by heat inactivation. One milliliter of urine aliquot in a 10 mL glass vial is heated in a dry block heater. Children's samples are heated at 56 °C for 60 min and adults' samples at 95 °C for 5 min. The authors did not explain why they utilize different temperatures for children and adult' samples. After the inactivation step, samples are stored at -20 °C until aliquoting 400 µL in TADD. The dogs were first trained with detergent- treated samples (n = 13) and then tested with heat-inactivated samples (n = 21). After the training step, dogs were asked to sniff unknown samples treated with heat-inactivation. They did not succeed in identifying SARS-CoV-2 positive samples.

#### 3.2.3. Sample volume and temperature

The volume of urine presented to detection dogs varies from 1 to 2 droplets [33] to 2 mL [26] (reported in Table 1). In most of the studies, 1 mL is used [31,32,71,74,75]. Samples are defrosted in their containers and presented to dogs at room temperature. For instance, in the study of Amundsen *et al.*[33], samples are thawed to room temperature in cryotubes for 1 h and then put into sealed glass containers for dog sniffing. In two studies [29,32], urine samples are heated to 37 °C in a water bath (in polypropylene screw-cap tubes [32]), before the dog sniffing. Unfortunately, experiments using the same protocol at room temperature versus at 37 °C have not been conducted to evaluate the effect of heating the samples.

Recently, Urbanová *et al.* [84], studied the effect of urine sample temperature on the efficacity of olfactory detection of prostate cancer by a specifically trained dog. No correlation was found between the efficacy of prostate cancer detection and the temperature of the samples from 2



Fig. 2. Flowchart illustrating the process from sampling to analysis.

#### to 23 $^\circ\text{C}.$

#### 3.3. Sample preparation for GC-MS analysis

Since urine is mostly made of water, injecting it directly into the GC would damage the column (incompatible with highly polar compounds like water) and affect its performance, finally causing inconsistent results. The direct injection of urine would also result in the formation of water droplets in the injector and transfer lines, and corrosion of sensitive components (detector). Thus, GC–MS analysis of urine requires a sample preparation. In this paper, only the sample preparation to analyze the VOCs of intact urine will be discussed. However, it is also common to perform derivatization [39,85], or deconjugation by  $\beta$ -glucuronidase [86–88], to analyze non-volatile compounds in urine by GC–MS.

Both liquid–liquid extraction techniques (for instance Solvent Assisted Flavor Evaporation [88]), and headspace-based techniques, are suitable for the analysis of VOCs. Headspace-based techniques are more environmental-friendly (solvent-free) and less time-consuming [35,89]. The sample preparation usually consists of adding salts to have a saltingout effect during the extraction, allowing a better extraction of the polar compounds [90]. Still, parameters like pH and the chemical structure of urinary compounds have to be considered [4,14].

#### 3.3.1. Impact of urine pH

In the quest for odors, it is crucial to ensure that volatile compounds are effectively released from urine. The volatile profile varies depending on the urine pH, as only non-ionized compounds are volatile. The normal pH of urine ranges from 4.5 to 8 [91]. At pH > 10, amines become volatile and thus can be detected by GC–MS, whereas at pH < 2, organic acids are volatile [4]. Additionally, ester compounds undergo hydrolysis under basic conditions [4]. Hua *et al.* [45] observed a more efficient extraction of acids and sulfur compounds at an acidic pH, while extraction of alcohols and heterocyclic compounds is favored by a basic pH. Banday *et al.* [78] identified a greater number (+ 37 %) of VOCs in urine in acidic conditions (pH = 3.0) than in basic conditions (pH = 8.0) [78]. Thus, two extractions (one in acidic conditions and another in basic conditions) are necessary to detect urinary VOCs without selection.

#### 3.3.2. Extraction techniques

The concentrations of VOCs in urine are very variable depending on the compounds [4]. For instance, p-cresol is highly concentrated in urine (about 50 mg of p-cresol is excreted in urine per day for a healthy adult individual [9]). Conversely, some volatile metabolites are found at trace levels in the range of ng/L to low  $\mu$ g/L. Therefore, efficient extraction methods prior to GC–MS are essential. Both Headspace (HS) and Solid Phase Microextraction (SPME) allow for the selective extraction of volatile compounds without the interference of non-volatile molecules present in urine. These methods can be automatized and offer high sensitivity (examples in Table 2) and reproducibility, making them ideal for analyzing complex matrices like urine.

#### Headspace (HS) extraction

HS extraction involves evaporating volatile compounds from the sample into the gas phase by heating the sample and collecting the volatile compounds in the headspace above the sample.

Static HS extraction of urinary volatile organic compounds is usually performed between 80 and 100 °C. Once the equilibrium is reached, depending on the sample volume and the headspace volume (from 5 to 50 min), headspace is extracted using a syringe heated at  $\geq$  10 °C hotter than the sample (to avoid condensation). The injection is carried out either in split mode (during the sample injection, the carrier gas is split to reduce the sample volume injected), or in a programmed temperature vaporizer (PTV). Application examples included extraction, desorption, and analytical parameters are detailed in *Supplementary materials Table S1: Experimental parameters for headspace-based analysis of urinary volatile compounds for disease biomarkers identification.* 

Alternative headspace techniques like purge and trap and Dynamic HeadSpace (DHS) extraction have also been employed for urine analysis. These methods are based on the principle of purging volatile compounds from the sample and trapping them onto an adsorbent material for subsequent analysis. An inert gas (usually nitrogen or helium) is used to purge the volatile compounds from the sample. This gas flow carries the VOCs into a trap filled with an adsorbent (such as a porous polymer) that retains the VOCs. After the trapping, the adsorbent trap is heated in the injector to release the VOCs into the GC–MS system. For instance, Erb *et al.* [97] employed DHS GC–MS to analyze aromatic and chlorinated molecules in the urine of exposed workers. Low limits of quantification (LOQ) from 10 to 15 ng/L (except styrene at 50 ng/L) are reported.

Both purge and trap and DHS techniques are commonly used in the analysis of VOCs traces in various liquid matrices (beverages, water...), but have not been widely employed for urine analysis. Yet sensitivity obtained with dynamic headspace techniques (typically in the ng/L) is often more than 10 times better than those achieved with static headspace techniques in an aqueous matrix [98].

#### Solid Phase Micro Extraction (SPME).

SPME involves extracting volatile compounds from a sample by exposing a fiber coated with one ore multiple adsorbent polymers, to the sample's headspace or directly immersing it into the sample. The volatile compounds are adsorbed onto the fiber, extracting, and concentrating them for subsequent analysis. This technique is widely utilized for the analysis of urine.

Parameters such as pH, amount of salt, extraction temperature and duration can be optimized using a central composite design [3699]. Recently, Li X et al. [99], studied the effects of sample volume, vial size, salt addition, incubation temperature, incubation time, extraction temperature, and extraction time. The design of experiment results indicates that incubation temperature, and extraction temperature and time are the key factors influencing extraction efficiency. The optimum temperature for incubation and extraction appears to be 60 °C, and extraction time longer than 45 min is required to reach equilibrium [36,90,99]. The final optimal method proposed by Li X et al. [99] is the following: incubation of 1 mL urine with 0.6 g NaCl in a 20 mL headspace vial at 60 °C for 30 min, and lastly extraction at 60 °C for 47 min. The favored adsorption phases are DVB/PDMS, CAR/PDMS, and the combination of these three phases: DVB/CAR/PDMS. Applications examples included extraction, desorption, and analytical parameters are proposed in Supplementary materials Table S2: Experimental parameters for SPMEbased analysis of urinary volatile compounds for disease biomarkers identification.

Cauchi *et al.* [42] analyzed randomly, by SPME (in acidic conditions) prior GC-ToF-MS analysis, 832 samples from patients with bladder cancer or a non-cancerous urological disease or infection, and from healthy controls. They opted for the addition of an internal standard (deuterated (d6-) phenol) before extraction. Reproducible data were collected and processed. Then, a statistical approach based on a pattern recognition algorithm was developed and yielded to an 89 % overall accuracy detection test. Support Vector Machine (SVM)-derived models provided diagnostic sensitivity of 90 % and specificity of 88 %, which is very close to conventional urine cytology performances (> 90 % specificity and 80–90 % sensitivity for high-grade tumors) [42]. Further research needs to be carried out to confirm this model. Nonetheless this study highlights the potential and the robustness of SPME GC-ToF-MS for bladder cancer detection.

#### Other extraction techniques.

A "long time" (24 h) passive headspace sampling method has been used by O'Lenick *et al.* [100] to analyze the volatile compounds in urine. In a 75 mL closed glass bulb, 1.5 mL urine is introduced. The glass bulb is placed on an inclined sampling rack in order to make the urine flow to one side. Then, a sorbent tube filled with Tenax-TA® is placed horizontally into the glass bulb above the urine without immerging it. After 24 h of headspace sampling, the sorbent tube is removed from the glass bulb and thermally desorbed for GC–MS analysis. This protocol yielded in the identification of 28 VOCs in 120 samples from 28 healthy individuals. The limits of detection ranged from 0.024 (Allyl isocyanate) to 8.34  $\mu$ g/L (Hexanal).

Porto-Figueira *et al.* [101,102] used Needle Trap MicroExtraction (NTME) which is a needle filled with sorbent polymers (in their case, DVB/Car1000/CarX) that combines the advantages of Solid Phase Extraction (SPE) and SPME being both robust and sensitive. Using a syringe connected on the NTME needle, the headspace of the sample is drawn in and the volatile compounds are adsorbed. The needle is then injected into the GC inlet and the compounds of interest are thermally desorbed. Jobu *et al.* [41] used a similar device called NeedlEx®. The urine is stored in a sealed sampling bag. The headspace (air from the sampling bag) is then extracted using a needle filled with a sorbent connected to a pump. Finally, the needle is desorbed in the injection port of the GC. The limits of detection have not been reported in these studies.

Stir Bars Sorptive Extraction (SBSE) coupled to GC-MS has been employed by Gao et al. [27] to study urinary biomarkers of prostate cancer. A stir bar coated with PDMS is immerged in a 20 mL amber vial filled with 1 mL of urine sample, 19 mL of deionized water, 600  $\mu$ L of HCl (2 M), and 300 µL of internal standard (Mirex solution at 100 ppm) for 2 h at 1000 rpm. They first used this technique on a training cohort with 55 prostate cancer patients and 53 healthy subjects for model development. The protocol was then reproduced on a testing cohort with 53 prostate cancer patients and 22 healthy subjects. In this study [27], a very high number of VOCs (9144) are detected in urine from 108 subjects. Among these compounds, 254 VOCs were found to be significantly associated with prostate cancer-positive samples, while 282 VOCs were associated with negative samples (Wilcoxon test, p-value < 0.05). A predictive model for prostate cancer prevalence was then constructed using regularized logistic regression. The performance of the diagnostic model was tested using an external cohort of 75 patients (53 patients with prostate cancer and 22 controls) and yielded a ROC curve of 0.86 with an 87 % sensitivity and a 77 % specificity. In conclusion, this experimental study underscores the potential of a urinary VOC-based approach for improved prostate cancer detection. It also proves that one mL of urine (at acidic pH) extraction by SBSE and analysis by GC–MS is a powerful protocol.

#### 4. Discussion

#### 4.1. Assessing the analytical sensitivity for GC-MS analysis

In the literature, diverse methods have been developed to quantify volatile compounds in urine. Notably, LOQs of five ketones in urine are determined in three studies [6,55,59]. These values have been reported in Table 3.

Results obtained with headspace, SPME, or SPME with a prior derivatization step with PFBHA, are of the same order of magnitude. Headspace extraction is the most sensitive technique for 2-pentanone, 2-hexanone, and 2-nonanone, while SPME without derivatization shows better results for 2-butanone and 4-heptanone. The derivatization of these molecules does not seem to be necessary since lower LOQs are obtained with SPME on intact urine samples.

Depending on the type of SPME fibers, the volume of adsorbent phase to extract VOCs ranged from 0.5 to 7  $\mu$ L and thus the analytical sensitivity might be limited by these phase volumes. In comparison, PDMS-coated stir bars used for SBSE, present a greater phase volume, up to 126  $\mu$ L (for 20 mm length and 1 mm phase thickness type of stir bars). SBSE methods have not yet been widely developed for the analysis of volatile compounds in urine. Gao *et al.* [27], reported relevant results for prostate cancer diagnosis employing SBSE GC–MS (detailed in section 3.3.2). Therefore, it would be interesting to optimize the extraction of VOCs from urine with this technique in further studies.

Moreover, purge and trap or dynamic headspace techniques are more sensitive than static headspace in aqueous matrix [98], and are however less employed. The extraction of VOCs from urine using these techniques could offer a significant improvement in analytical sensitivity.

#### 4.2. Standardizing the dogs' training

For canine olfaction, to succeed in the detection of specific stimuli, dogs have to be trained to optimize discrimination between specific COVs and background odors. Standardizing the dogs' training is the first step to achieve better results [103]. Indeed, the lecture on articles related to the analysis of urine using sniffing dogs offers advice to improve the dogs' training process.

The dogs are generally first trained to recognize a characteristic odor. Then, the dogs learn how to discriminate a positive sample from a negative one. This part of the training is called the discrimination. After the discrimination, the dog is tested on its ability to recognize the characteristic odor learned earlier to identify positive samples from new participants. This final step is named the generalization. The accuracy of a diagnostic is evaluated through the specificity and sensitivity of the test (examples in Table 4). The sensitivity refers to the test's ability to correctly detect positive samples, and the specificity refers to the dog's capacity to detect negative samples.

Essler *et al.* [83], used urine samples from 25 children (11 SARS-CoV-2 positives and 14 controls) and 9 adults (5 SARS-CoV-2 positives and 4 controls). They obtained promising results during the discrimination tests (71 % sensitivity and 99 % specificity) with 9 dogs. However, the generalization to new samples failed. With unfamiliar samples from unknown participants, the sensitivity and specificity decrease to around 11 %. The authors conclude that dogs used different odors to find the positive samples in the discrimination step. Thus, the olfactory memory of the dogs is such that they manage to remember the odors of each individual (34 individuals in total) and has not generalized the olfactory signature of SARS-CoV-2 to all the positive samples.

The number of samples utilized is critical. New samples, unfamiliar to dogs, should be introduced at each training. Otherwise, dogs might be able to differentiate between positive and negative samples by recognizing the scent of individuals. The same observation was made by Elliker *et al.* [32]. Ten dogs were trained to find urine samples from prostate cancer patients. They were then tested on their ability to discriminate between control samples (67 individuals) versus patients with prostate cancer (50 individuals). Only 3 dogs out of 10 passed this step. These 3 dogs did not pass the generalization test with new samples.

The study design of Taverna *et al.* [26] appears to be the most robust since a large cohort of patients is employed. They studied prostate cancer with 902 subjects (362 prostate cancer patients and 540 controls). They did not re-use samples for multiple training sessions. High sensitivity (97.7 – 98.7 %) and specificity (98.6–100 %) results were obtained with 2 detection dogs.

Regarding canine olfaction, to our knowledge, the sensitivity of detection with accurate concentrations of VOCs in urine has not been evaluated yet.

#### 4.3. Towards a better sample preparation for canine olfaction?

As described in section 3.3, for GC–MS, samples are prepared and extracted before analysis. Sample extraction techniques help reduce background noise and improve the selectivity of the analysis. It also preconcentrates the analytes of interest. On the other hand, for canine olfaction, urine is presented to the dog without previous preparation or extraction. To go further, the sample preparation for canine olfaction might be improved. This perspective would be pertinent particularly for targeted analysis, to make the dogs detect known biomarkers of pathologies. Ideally, these biomarkers could be selectively extracted in the gas phase for canine olfaction. Based on pH adjustment, a first selection of VOCs can be easily made. Indeed, (as explained in the section 3.3.1) esters, acids, and sulfur compounds are more volatile in acidic conditions whereas alcohols and heterocyclic compounds are more volatile in a basic solution.

In the case of prostate cancer, the effect of urine samples temperature for canine olfaction has been evaluated from 2  $^\circ$ C to 23  $^\circ$ C and was not

significant [84]. It would be interesting for further studies to evaluate the effect of temperature with a higher and larger interval, for instance from 20 °C to 60 °C (after 60 °C, some volatile compounds are degraded [99]). Indeed, adding salts and heating the sample at a temperature similar to HS and SPME optimum parameters (60 °C) would increase the concentration of VOCs in the headspace above the urine sample.

## 4.4. Limitations of urinary VOCs analysis for medical diagnosis applications

Urinary VOCs analysis present numerous advantages, however, some limitations have to be considered. The presence of confounding factors represents a critical issue in urine analysis. The urine volatile profile varies significantly among individuals (gender, age) [106], and environmental factors such as contaminants exposure [107], diet [56], drug therapy [106] or smoking [55,60]. The presence of many exogenous VOCs in urine constitutes a bias in the quest of disease biomarkers. Nevertheless, data generated instrumentally can be treated including metadata. Statistical models that include multiple factors, such as linear models are efficient tools to avoid false discoveries [108,109].

In contrast, for canine olfaction, results are binary and cannot include confounding factors. If some patients are smokers, detection dogs may easily detect tobacco markers rather than disease specific VOCs. The only way to reduce these biases would be to conduct studies on specific populations (for instance: non-smoking, same gender, and age, following a restricted diet). It is also probable that infectious diseases are easier detected by dogs than non-infectious pathologies such as cancers [49]. This involves a risk of bias if many subjects are infected by a same pathogen (for instance, during health crisis related to COVID-19).

Another critical element to consider is the patient abilities for urine collection. As explained in section 3.1, it is recommended to request patients to follow a specific protocol to collect a clean mid-stream urine sample. However, this is not conceivable for urinary incontinent subjects, or individuals with renal damages. Also, it would be difficult to collect urine samples from subjects with neurological disorders (for instance due to tremors). One potential solution could be the use of a urinary catheter, but then it would not more be considered as a non-invasive method.

#### 4.5. Emerging technologies

In the last decade, advancements in Artificial Intelligence (AI) have contributed significantly to enhance the accuracy of VOCs-based diagnosis methods [110]. Machine learning algorithms such as decision trees, support vector machines, or ensemble methods such as (boosted) random forests are widely applied to GC–MS data to find specific patterns of metabolites associated with cancers [12,111,112] or infectious diseases [113].

The future of volatilome-based diagnosis might rely on AI classification methods like convolutional Neural Networks (cNN). Artificial neural networks mimic the learning process of the dog's brain, responding to an olfactory stimulus. Indeed, cNN are made of multiple, back-propagating layers of neurons that finally generate a single classification result. Therefore, the association of electronic noses (e-noses) with cNN machine learning becomes an alternative to the use of detection dogs. For instance, Giró Benet *et al.*[17], utilized GC–MS and developed an e-nose to target breast cancer biomarkers in urine, combined with cNN machine learning. Promising performances for the sample classification are achieved via GC–MS data treated with cNN machine learning (100 % sensitivity and 85,1 % specificity (N = 90)), and further improvements of the e-nose technology are ongoing.

Still, as with the training of detection dogs, the development of these types of classification models requires large cohorts with control groups and a randomized sampling to avoid batch effects, to balance confounders and to ensure the reproducibility of experiments. Moreover, these AI methods also operate mostly as black boxes, providing

#### L. Maidodou et al.

classification results without a clear explanation as to why this result was obtained.

#### 5. Conclusion

To ensure the integrity of urine samples, adherence to standardized protocols is essential. The following guidelines outline the recommended procedures for optimal urine sample collection for both canine olfaction and instrumental analysis. The collection of first voided urine, after overnight fasting, allows the obtention of a representative sample. Overnight fasting allows the body to metabolize and excrete substances accumulated during the previous day, resulting in higher concentrations of metabolites in the first voided urine. Dietary intake can significantly influence the composition of urine, as foods contain metabolites that can be excreted in urine. By fasting overnight, the influence of recent dietary intake on urine composition is minimized. To reduce the variability due to the urine dilution, standardization by creatinine or urine specific gravity, is recommended. To prevent microbial contamination and maintain the stability of urinary components, it is imperative to employ sterile inert containers, to clean the genital area prior to collection and to collect midstream urine. It is recommended to freeze collected samples at – 80 °C as soon as possible and within 12 h of collection. Freezing inhibits enzymatic activity, and microbial growth and minimizes alterations in the chemical profile, thereby preserving the sample for subsequent analysis. To avoid the damaging effects of multiple freeze-thaw cycles on sample integrity, it is also advisable to prepare aliquots from the collected urine. Indeed, aliquoting allows for convenient storage and repeated analyses without compromising the overall quality of the sample.

The use of dogs as an analytical tool requires particular attention to their safety, especially for the sniffing of samples from patients with infectious diseases. Specific containers like the TADD have been developed to protect the dogs from hazardous samples during sniffing tests. A volume of 2 mL of urine presented to detection dogs at room temperature is sufficient to provide high sensitivity (97.7 - 98.7 %) and specificity (98.6–100 %) results [26]. The training process appears to be a critical point, and a large number of samples is required. Otherwise, the dogs would easily memorize the training samples and would not learn specific patterns of VOCs induced by diseases. Also, samples should not be used more than one time for the dogs' training. To make the dog's work easier, it would be interesting to improve the sample preparation for canine olfaction. As well as for instrumental analysis, by adjusting the pH, ionic strength (addition of salts), and temperature (> 37  $^{\circ}$ C), the concentrations of targeted VOCs could be selectively increased in the gas phase above of the urine samples. Detection dogs would then be asked to sniff a concentrate of urinary odors.

The analysis of urine compounds by GC–MS to identify candidate biomarkers of diseases is widely developed. The sample preparation is mainly based on pH adjustment and the salting-out effect. Urine pH is a critical parameter influencing the volatility of urinary compounds. The extraction by SPME is currently the most favored technique to identify disease biomarkers in urine samples. It is indeed a reproducible, sensitive, and automatable method. As well, SBSE appears to be an exhaustive and sensitive method, even if it has been employed only by a few research teams. For untargeted studies, headspace extractions are recommended to overcome the limitation of the adsorbent phase selectivity encountered with SPME or SBSE techniques. Ideally, the use of twodimensional GC separation, and high-resolution MS detectors, combined with dynamic headspace extraction techniques would maximize the analytical sensitivity and specificity, and ease the way for clinical applications.

#### CRediT authorship contribution statement

Laetitia Maidodou: Writing – original draft, Methodology, Investigation. Damien Steyer: Writing – review & editing, Supervision,

Funding acquisition, Formal analysis. **Marie-Anaïs Monat:** Writing – original draft, Investigation. **Michelle Leemans:** Writing – review & editing, Methodology. **Isabelle Fromantin:** Writing – review & editing, Funding acquisition, Formal analysis. **Eric Marchioni:** Writing – review & editing, Validation, Resources, Project administration, Formal analysis. **Igor Clarot:** Writing – review & editing, Validation, Formal analysis, Conceptualization.

#### Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This work was supported by the Royal Canin Foundation (KDOG project, 2021 project cycle), Laetitia Maïdodou has received a PhD grant ("Bourse Cifre") funded by Association Nationale de la Recherche Technique. Twistaroma has received a financial support for this work provided by Fonds Européen de Développement Régional (FEDER).

#### Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Laetitia Maidodou reports financial support was provided by Royal Canin Foundation. Damien Steyer reports financial support was provided by Fonds Européen de Développement Régional. Laetitia Maidodou reports financial support was provided by National Association of Technical Research. If there are other authors, they declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank Prof. Lennart Martens from Ghent University (Belgium) for his help with emerging technologies.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.111907.

#### Data availability

No data was used for the research described in the article.

#### References

- S. Giannoukos, A. Agapiou, B. Brkić, S. Taylor, Volatolomics: A broad area of experimentation, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 1105 (2019) 136–147, https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.12.015.
- [2] M.L. Alonso, I. San Román, L. Bartolomé, N. Monfort, R.M. Alonso, R. Ventura, Multiple headspace solid-phase microextraction (MHS-SPME) methodology applied to the determination of volatile metabolites of plasticizers in human urine, Microchemical Journal 180 (2022), https://doi.org/10.1016/j. microc.2022.107567.
- [3] F. Gouzerh, J.M. Bessière, B. Ujvari, F. Thomas, A.M. Dujon, L. Dormont, Odors and cancer: Current status and future directions, Biochim Biophys Acta Rev Cancer 1877 (2022), https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188644.
- [4] J. Kwak, G. Preti, Chapter 21 Challenges in the Investigation of Volatile Disease Biomarkers in Urine, in: A. Amann, D. Smith (Eds.), Volatile Biomarkers Non-Invasive Diagnosis in Physiology and Medicine, Elsevier, 2013, pp. 394–404, https://doi.org/10.1016/B978-0-44-462613-4.00021-0.
- [5] G.A. Mills, V. Walker, Headspace solid-phase microextraction profiling of volatile compounds in urine: application to metabolic investigations, Journal of Chromatography B 753 (2001) 259–268, https://doi.org/10.1016/s0378-4347 (00)00554-5.
- [6] P. Mochalski, K. Unterkofler, Quantification of selected volatile organic compounds in human urine by gas chromatography selective reagent ionization time of flight mass spectrometry (GC-SRI-TOF-MS) coupled with head-space solid-phase microextraction (HS-SPME), Analyst 141 (2016) 4796–4803, https:// doi.org/10.1039/c6an00825a.

- [7] B. De Lacy Costello, A. Amann, H. Al-Kateb, C. Flynn, W. Filipiak, T. Khalid, D. Osborne, N.M. Ratcliffe, A review of the volatiles from the healthy human body, J Breath Res 8 (2014), https://doi.org/10.1088/1752-7155/8/1/014001.
- [8] N. Drabińska, C. Flynn, N. Ratcliffe, I. Belluomo, A. Myridakis, O. Gould, M. Fois, A. Smart, T. Devine, B.D.L. Costello, A literature survey of all volatiles from healthy human breath and bodily fluids: The human volatilome, J Breath Res 15 (2021), https://doi.org/10.1088/1752-7163/abf1d0.
- [9] S. Bouatra, F. Aziat, R. Mandal, A.C. Guo, M.R. Wilson, C. Knox, T.C. Bjorndahl, R. Krishnamurthy, F. Saleem, P. Liu, Z.T. Dame, J. Poelzer, J. Huynh, F.S. Yallou, N. Psychogios, E. Dong, R. Bogumil, C. Roehring, D.S. Wishart, The Human Urine Metabolome, PLoS One 8 (2013), https://doi.org/10.1371/journal. pone.0073076.
- [10] J. Kwak, C.C. Grigsby, B.R. Smith, M.M. Rizki, G. Preti, Changes in volatile compounds of human urine as it ages: Their interaction with water, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 941 (2013) 50–53, https://doi.org/10.1016/j. jchromb.2013.09.040.
- [11] P. Mochalski, K. Krapf, C. Ager, H. Wiesenhofer, A. Agapiou, M. Statheropoulos, D. Fuchs, E. Ellmerer, B. Buszewski, A. Amann, Temporal profiling of human urine VOCs and its potential role under the ruins of collapsed buildings, Toxicol Mech, Methods 22 (2012) 502–511, https://doi.org/10.3109/ 15376516 2012 682664
- [12] K. Taunk, P. Porto-Figueira, J.A.M. Pereira, R. Taware, N.L. da Costa, R. Barbosa, S. Rapole, J.S. Câmara, Urinary Volatomic Expression Pattern: Paving the Way for Identification of Potential Candidate Biosignatures for Lung Cancer, Metabolites 12 (2022), https://doi.org/10.3390/metabo12010036.
- [13] M. Shirasu, K. Touhara, The scent of disease: Volatile organic compounds of the human body related to disease and disorder, J Biochem 150 (2011) 257–266, https://doi.org/10.1093/jb/mvr090.
- [14] S. Smith, H. Burden, R. Persad, K. Whittington, B. De Lacy Costello, N. M. Ratcliffe, C.S. Probert, A comparative study of the analysis of human urine headspace using gas chromatography-mass spectrometry, J Breath Res 2 (2008), https://doi.org/10.1088/1752-7155/2/3/037022.
- [15] T. Krämer Alkalde, M. Do Carmo Ruaro Peralba, C. Alcaraz Zini, E. Bastos Caramão, Quantitative analysis of benzene, toluene, and xylenes in urine by means of headspace solid-phase microextraction, in: J Chromatogr A, Elsevier, 2004: pp. 37–40. 10.1016/j.chroma.2003.09.007.
- [16] H.G. Wahl, A. Hoffmann, D. Luft, H.M. Liebich, Analysis of volatile organic compounds in human urine by headspace gas chromatography-mass spectrometry with a multipurpose sampler, J Chromatogr A 847 (1999) 117–125, https://doi. org/10.1016/s0021-9673(99)00017-5.
- [17] J. Giró Benet, M. Seo, M. Khine, J. Gumà Padró, A. Pardo Martnez, F. Kurdahi, Breast cancer detection by analyzing the volatile organic compound (VOC) signature in human urine, Sci Rep 12 (2022), https://doi.org/10.1038/s41598-022-17795-8.
- [18] V. Walker, G.A. Mills, Urine 4-heptanone: a b-oxidation product of 2-ethylhexanoic acid from plasticisers, Clinica Chimica Acta 306 (2001) 51–61, https://doi. org/10.1016/S0009-8981(01)00390-4.
- [19] G. Eknoyan, Looking at the Urine: The Renaissance of an Unbroken Tradition, American Journal of Kidney Diseases 49 (2007) 865–872, https://doi.org/ 10.1053/j.ajkd.2007.04.003.
- [20] P. Starr, R. Fitz, The excretion of organic acids in the urine of patients with diabetes mellitus, (1924). 10.1001/archinte.1924.00110250100009.
- [21] K. Yamada, K. Ohishi, A. Gilbert, M. Akasaka, N. Yoshida, R. Yoshimura, Measurement of natural carbon isotopic composition of acetone in human urine, Anal Bioanal Chem 408 (2016) 1597–1607, https://doi.org/10.1007/s00216-015-9268-z.
- [22] J. HOWLAND, Acetone body production in infancy and childhood, Arch Pediatr Adolesc Med XII (1916) 459. 10.1001/archpedi.1916.04110170037003.
- [23] T. Khalid, R. Aggio, P. White, B. De Lacy Costello, R. Persad, H. Al-Kateb, P. Jones, C.S. Probert, N. Ratcliffe, Urinary volatile organic compounds for the detection of prostate cancer, PLoS One 10 (2015), https://doi.org/10.1371/ journal.pone.0143283.
- [24] A. Jiménez-Pacheco, M. Salinero-Bachiller, M.C. Iribar, A. López-Luque, J. L. Miján-Ortiz, J.M. Peinado, Furan and p-xylene as candidate biomarkers for prostate cancer, Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 36 (243) (2018) e21–243.e27, https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2017.12.026.
- [25] A.D. Asimakopoulos, D. Del Fabbro, R. Miano, M. Santonico, R. Capuano, G. Pennazza, A. D'Amico, E. Finazzi-Agrò, Prostate cancer diagnosis through electronic nose in the urine headspace setting: A pilot study, Prostate Cancer Prostatic Dis 17 (2014) 206–211, https://doi.org/10.1038/pcan.2014.11.
- [26] G. Taverna, L. Tidu, F. Grizzi, V. Torri, A. Mandressi, P. Sardella, G. La Torre, G. Cocciolone, M. Seveso, G. Giusti, R. Hurle, A. Santoro, P. Graziotti, Olfactory system of highly trained dogs detects prostate cancer in urine samples, Journal of Urology 193 (2015) 1382–1387, https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.09.099.
- [27] Q. Gao, X. Su, M.H. Annabi, B.R. Schreiter, T. Prince, A. Ackerman, S. Morgas, V. Mata, H. Williams, W.Y. Lee, Application of Urinary Volatile Organic Compounds (VOCs) for the Diagnosis of Prostate Cancer, Clin Genitourin Cancer 17 (2019) 183–190, https://doi.org/10.1016/j.clgc.2019.02.003.
- [28] L. Urbanová, V. Vyhnánková, Š. Krisová, D. Pacík, A. Nečas, Intensive training technique utilizing the dog's olfactory abilities to diagnose prostate cancer in men, Acta Veterinaria Brno 84 (2015) 77–82, https://doi.org/10.2754/ avb201585010077.
- [29] J.N. Cornu, G. Cancel-Tassin, V. Ondet, C. Girardet, O. Cussenot, Olfactory detection of prostate cancer by dogs sniffing urine: A step forward in early diagnosis, Eur Urol 59 (2011) 197–201, https://doi.org/10.1016/j. eururo.2010.10.006.

- [30] A.R. Lima, J. Pinto, A.I. Azevedo, D. Barros-Silva, C. Jerónimo, R. Henrique, M. de Lourdes Bastos, P. Guedes de Pinho, M. Carvalho, Identification of a biomarker panel for improvement of prostate cancer diagnosis by volatile metabolic profiling of urine, Br J Cancer 121 (2019) 857–868, https://doi.org/10.1038/ s41416-019-0585-4.
- [31] C. Guest, R. Harris, K.S. Sfanos, E. Shrestha, A.W. Partin, B. Trock, L. Mangold, R. Bader, A. Kozak, S. McLean, J. Simons, H. Soule, T. Johnson, W.Y. Lee, Q. Gao, S. Aziz, P.M. Stathatou, S. Thaler, S. Foster, A. Mershin, Feasibility of integrating canine olfaction with chemical and microbial profiling of urine to detect lethal prostate cancer, PLoS One 16 (2021), https://doi.org/10.1371/journal. pone 0245530
- [32] K.R. Elliker, B.A. Sommerville, D.M. Broom, D.E. Neal, S. Armstrong, H. C. Williams, Key considerations for the experimental training and evaluation of cancer odour detection dogs: Lessons learnt from a double-blind, controlled trial of prostate cancer detection, BMC Urol 14 (2014), https://doi.org/10.1186/ 1471-2490-14-22.
- [33] T. Amundsen, S. Sundstrom, T. Buvik, O.A. Gederaas, R. Haaverstad, Can dogs smell lung cancer? First study using exhaled breath and urine screening in unselected patients with suspected lung cancer, Acta Oncol (madr) 53 (2014) 307–315, https://doi.org/10.3109/0284186X.2013.819996.
- [34] A. Pérez Antón, Á.G. Ramos, M. del Nogal Sánchez, J.L.P. Pavón, B.M. Cordero, Á. P.C. Pozas, Headspace-programmed temperature vaporization-mass spectrometry for the rapid determination of possible volatile biomarkers of lung cancer in urine, Anal Bioanal Chem 408 (2016) 5239–5246, https://doi.org/10.1007/s00216-016-9618-5.
- [35] C.L. Silva, M. Passos, J.S. Câmara, Solid phase microextraction, mass spectrometry and metabolomic approaches for detection of potential urinary cancer biomarkers - A powerful strategy for breast cancer diagnosis, Talanta 89 (2012) 360–368, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.041.
- [36] C.L. Silva, R. Perestrelo, P. Silva, H. Tomás, J.S. Câmara, Implementing a central composite design for the optimization of solid phase microextraction to establish the urinary volatomic expression: a first approach for breast cancer, Metabolomics 15 (2019). https://doi.org/10.1007/s11306-019-1525-2.
- [37] M. Woollam, M. Teli, P. Angarita-Rivera, S. Liu, A.P. Siegel, H. Yokota, M. Agarwal, Detection of Volatile Organic Compounds (VOCs) in Urine via Gas Chromatography-Mass Spectrometry QTOF to Differentiate Between Localized and Metastatic Models of Breast Cancer, Sci Rep 9 (2019), https://doi.org/ 10.1038/s41598-019-38920-0.
- [38] M. McFarlane, A. Millard, H. Hall, R. Savage, C. Constantinidou, R. Arasaradnam, C. Nwokolo, Urinary volatile organic compounds and faecal microbiome profiles in colorectal cancer, Colorectal Disease 21 (2019) 1259–1269, https://doi.org/ 10.1111/codi.14739.
- [39] Y. Cheng, G. Xie, T. Chen, Y. Qiu, X. Zou, M. Zheng, B. Tan, B. Feng, T. Dong, P. He, L. Zhao, A. Zhao, L.X. Xu, Y. Zhang, W. Jia, Distinct urinary metabolic profile of human colorectal cancer, J Proteome Res 11 (2012) 1354–1363, https://doi.org/10.1021/or201001a.
- [40] R.P. Arasaradnam, M.J. Mcfarlane, C. Ryan-Fisher, E. Westenbrink, P. Hodges, M. G. Thomas, S. Chambers, N. O'Connell, C. Bailey, C. Harmston, C.U. Nwokolo, K. D. Bardhan, J.A. Covington, Detection of colorectal cancer (CRC) by urinary volatile organic compound analysis, PLoS One 9 (2014), https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108750.
- [41] K. Jobu, C. Sun, S. Yoshioka, J. Yokota, M. Onogawa, C. Kawada, K. Inoue, T. Shuin, T. Sendo, M. Miyamura, Metabolomics Study on the Biochemical Profiles of Odor Elements in Urine of Human with Bladder Cancer, Biol. Pharm. Bull 35 (2012) 639–642, https://doi.org/10.1248/bpb.35.639.
- [42] M. Cauchi, C.M. Weber, B.J. Bolt, P.B. Spratt, C. Bessant, D.C. Turner, C.M. Willis, L.E. Britton, C. Turner, G. Morgan, Evaluation of gas chromatography mass spectrometry and pattern recognition for the identification of bladder cancer from urine headspace, Analytical Methods 8 (2016) 4037–4046, https://doi.org/ 10.1039/c6av00400h.
- [43] T. Ligor, P. Adamczyk, T. Kowalkowski, I.A. Ratiu, A. Wenda-Piesik, B. Buszewski, Analysis of VOCs in Urine Samples Directed towards of Bladder Cancer Detection, Molecules 27 (2022), https://doi.org/10.3390/ molecules27155023.
- [44] C.M. Willis, S.M. Church, C.M. Guest, A. Cook, N. Mccarthy, A.J. Bransbury, M.R. T. Church, J.C.T. Church, Olfactory detection of human bladder cancer by dogs: proof of principle study, n.d.
- [45] Q. Hua, L. Wang, C. Liu, L. Han, Y. Zhang, H. Liu, Volatile metabonomic profiling in urine to detect novel biomarkers for B-cell non-Hodgkin's lymphoma, Oncol Lett 15 (2018) 7806–7816, https://doi.org/10.3892/ol.2018.8352.
  [46] M. Oxner, A. Trang, J. Mehta, C. Forsyth, B. Swanson, A. Keshavarzian, A.
- [46] M. Oxner, A. Trang, J. Mehta, C. Forsyth, B. Swanson, A. Keshavarzian, A. Bhushan, The Versatility and Diagnostic Potential of VOC Profiling for Noninfectious Diseases, BME Front 4 (2023). 10.34133/bmef.0002.
- [47] S.W. Brooks, D.R. Moore, E.B. Marzouk, F.R. Glenn, R.M. Hallock, Canine Olfaction and Electronic Nose Detection of Volatile Organic Compounds in the Detection of Cancer: A Review, Cancer Invest 33 (2015) 411–419, https://doi. org/10.3109/07357907.2015.1047510.
- [48] P. Spaněl, D. Smith, T.A. Holland, W. Al Singary, J.B. Elder, J. Heyrovskýinstituteheyrovský, Analysis of Formaldehyde in the Headspace of Urine from Bladder and Prostate Cancer Patients Using Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry, 1999.
- [49] P. Jendrny, F. Twele, S. Meller, A.D.M.E. Osterhaus, E. Schalke, H.A. Volk, Canine olfactory detection and its relevance to medical detection, BMC Infect Dis 21 (2021), https://doi.org/10.1186/s12879-021-06523-8.
- [50] M.F. (US) Kenneth G. Furton, S.O. (US) Ross J. Harper, Controlled odor mimic permeation system, 2008. US 2008/0295783 A1.

- [51] A.E. Juge, M.F. Foster, C.L. Daigle, Canine olfaction as a disease detection technology: A systematic review, Appl Anim Behav Sci 253 (2022), https://doi. org/10.1016/j.applanim.2022.105664.
- [52] D. Moher, A. Liberati, J. Tetzlaff, D.G. Altman, P. Group, Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement, PLoS Med. (2009). 10.1371/journal.pmed.1000097.
- [53] S. Zhang, L. Liu, D. Steffen, T. Ye, D. Raftery, Metabolic profiling of gender: Headspace-SPME/GC-MS and 1H NMR analysis of urine, Metabolomics 8 (2012) 323–334, https://doi.org/10.1007/s11306-011-0315-2.
- [54] D. Smith, K. Ismail, A. Diskin, G. Chapman, J. Magnay, P. Španěl, S. O'Brien, Increase of acetone emitted by urine in relation to ovulation, Acta Obstet Gynecol Scand 85 (2006) 1008–1011, https://doi.org/10.1080/00016340600590535.
- [55] I. Calejo, N. Moreira, A.M. Araújo, M. Carvalho, M. De Lourdes Bastos, P.G. De Pinho, Optimisation and validation of a HS-SPME-GC-IT/MS method for analysis of carbonyl volatile compounds as biomarkers in human urine: Application in a pilot study to discriminate individuals with smoking habits, Talanta 148 (2016) 486–493. 10.1016/j.talanta.2015.09.070.
- [56] C.I. Mack, B. Egert, E. Liberto, C.H. Weinert, A. Bub, I. Hoffmann, C. Bicchi, S. E. Kulling, C. Cordero, Robust Markers of Coffee Consumption Identified Among the Volatile Organic Compounds in Human Urine, Mol Nutr Food Res 63 (2019), https://doi.org/10.1002/mnfr.201801060.
- [57] R.G. Hahn, Effects of diet, habitual water intake and increased hydration on body fluid volumes and urinary analysis of renal fluid retention in healthy volunteers, Eur J Nutr 60 (2021) 691–702, https://doi.org/10.1007/s00394-020-02275-4.
- [58] A.J. Li, M.P. Martinez-Moral, K. Kannan, Temporal variability in urinary pesticide concentrations in repeated-spot and first-morning-void samples and its association with oxidative stress in healthy individuals, Environ Int 130 (2019), https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104904.
- [59] P.M. Santos, M. del Nogal Sánchez, Á.P.C. Pozas, J.L.P. Pavón, B.M. Cordero, Determination of ketones and ethyl acetate—a preliminary study for the discrimination of patients with lung cancer, Anal Bioanal Chem 409 (2017) 5689–5696, https://doi.org/10.1007/s00216-017-0508-2.
- [60] V.R. De Jesús, D. Bhandari, L. Zhang, C. Reese, K. Capella, D. Tevis, W. Zhu, A. Y. Del Valle-Pinero, G. Lagaud, J.T. Chang, D. van Bemmel, H.L. Kimmel, E. Sharma, M.L. Goniewicz, A. Hyland, B.C. Blount, Urinary biomarkers of exposure to volatile organic compounds from the population assessment of tobacco and health study wave 1 (2013–2014), Int J Environ Res Public Health 17 (2020) 1–12, https://doi.org/10.3390/ijeroh17155408.
- [61] M.P. Martinez-Moral, K. Kannan, How stable is oxidative stress level? An observational study of intra- and inter-individual variability in urinary oxidative stress biomarkers of DNA, proteins, and lipids in healthy individuals, Environ Int 123 (2019) 382–389. 10.1016/j.envint.2018.12.009.
- [62] W.M.B. Edmands, P. Ferrari, A. Scalbert, Normalization to specific gravity prior to analysis improves information recovery from high resolution mass spectrometry metabolomic profiles of human urine, Anal Chem 86 (2014) 10925–10931, https://doi.org/10.1021/ac503190m.
- [63] D.B. Barr, L.C. Wilder, S.P. Caudill, A.J. Gonzalez, L.L. Needham, J.L. Pirkle, Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: Implications for urinary biologic monitoring measurements, Environ Health Perspect 113 (2005) 192–200, https://doi.org/10.1289/ehp.7337.
- [64] I. Meister, P. Zhang, A. Sinha, C.M. Sköld, Å.M. Wheelock, T. Izumi, R. Chaleckis, C.E. Wheelock, High-Precision Automated Workflow for Urinary Untargeted Metabolomic Epidemiology, Anal Chem 93 (2021) 5248–5258, https://doi.org/ 10.1021/acs.analchem.1c00203.
- [65] Y. Chen, G. Shen, R. Zhang, J. He, Y. Zhang, J. Xu, W. Yang, X. Chen, Y. Song, Z. Abliz, Combination of injection volume calibration by creatinine and MS signals' normalization to overcome urine variability in LC-MS-based metabolomics studies, Anal Chem 85 (2013) 7659–7665, https://doi.org/ 10.1021/ac401400b.
- [66] M.K. Storer, K. Hibbard-Melles, B. Davis, J. Scotter, Detection of volatile compounds produced by microbial growth in urine by selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS), J Microbiol Methods 87 (2011) 111–113, https://doi. org/10.1016/j.mimet.2011.06.012.
- [67] M.E. Lough, E. Shradar, C. Hsieh, H. Hedlin, Contamination in Adult Midstream Clean-Catch Urine Cultures in the Emergency Department: A Randomized Controlled Trial, J Emerg Nurs 45 (2019) 488–501, https://doi.org/10.1016/j. jen.2019.06.001.
- [68] F. Manoni, G. Gessoni, M.G. Alessio, A. Caleffi, G. Saccani, M.G. Silvestri, D. Poz, M. Ercolin, A. Tinello, S. Valverde, C. Ottomano, G. Lippi, Mid-stream vs. firstvoided urine collection by using automated analyzers for particle examination in healthy subjects: An Italian multicenter study, Clin Chem Lab Med 50 (2012) 679–684, https://doi.org/10.1515/cclm.2011.823.
- [69] H. Pernille, B. Lars, M. Marjukka, S. Volkert, H. Anne, Sampling of urine for diagnosing urinary tract infection in general practice–First-void or mid-stream urine? Scand J Prim Health Care 37 (2019) 113–119, https://doi.org/10.1080/ 02813432.2019.1568708.
- [70] D. Ryan, K. Robards, P.D. Prenzler, M. Kendall, Recent and potential developments in the analysis of urine: A review, Anal Chim Acta 684 (2011) 17–29, https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.10.035.
- [71] R.T. Gordon, C.B. Schatz, L.J. Myers, M. Kosty, C. Gonczy, J. Kroener, M. Tran, P. Kurtzhals, S. Heath, J.A. Koziol, N. Arthur, M. Gabriel, J. Hemping, G. Hemping, S. Nesbitt, L. Tucker-Clark, J. Zaayer, The use of canines in the detection of human cancers, Journal of Alternative and Complementary Medicine 14 (2008) 61–67, https://doi.org/10.1089/acm.2006.6408.
- [72] V. Walker, G.A. Mills, E.M. Stansbridge, 3-Penten-2-one, a novel aldehyde adduct, is a biomarker for increased acetaldehyde in urine, J Chromatogr B Analyt

Technol Biomed Life Sci 877 (2009) 784–790, https://doi.org/10.1016/j. jchromb.2009.02.017.

- [73] C.L. Silva, M. Passos, J.S. Cmara, Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry, Br J Cancer 105 (2011) 1894–1904, https://doi.org/10.1038/bjc.2011.437.
- [74] S. Kure, S. Iida, M. Yamada, H. Takei, N. Yamashita, Y. Sato, M. Miyashita, Breast cancer detection from a urine sample by dog sniffing: A preliminary study for the development of a new screening device, and a literature review, Biology (basel) 10 (2021), https://doi.org/10.3390/biology10060517.
- [75] A. Yamamoto, S. Kamoi, K. Kurose, M. Ito, T. Takeshita, S. Kure, K. Sakamoto, Y. Sato, M. Miyashita, The trained sniffer dog could accurately detect the urine samples from the patients with cervical cancer, and even cervical intraepithelial neoplasia grade 3: A pilot study, Cancers (basel) 12 (2020) 1–12, https://doi.org/ 10.3390/cancers12113291.
- [76] D. Wang, C. Wang, X. Pi, L. Guo, Y. Wang, M. Li, Y. Feng, Z. Lin, W. Hou, E. Li, Urinary volatile organic compounds as potential biomarkers for renal cell carcinoma, Biomed Rep 5 (2016) 68–72, https://doi.org/10.3892/br.2016.686.
- [77] C.M. Willis, L.E. Britton, R. Harris, J. Wallace, C.M. Guest, Volatile organic compounds as biomarkers of bladder cancer: Sensitivity and specificity using trained sniffer dogs, Cancer Biomarkers 8 (2010) 145–153, https://doi.org/ 10.3233/CBM-2011-0208.
- [78] K.M. Banday, K.K. Pasikanti, E.C.Y. Chan, R. Singla, K.V.S. Rao, V.S. Chauhan, R. K. Nanda, Use of urine volatile organic compounds to discriminate tuberculosis patients from healthy subjects, Anal Chem 83 (2011) 5526–5534, https://doi.org/10.1021/ac200265g.
- [79] K.L. Holbrook, S. Badmos, A. Habib, E.N. Landa, G.E. Quaye, M. Pokojovy, X. Su, W.-Y. Lee, Investigating the effects of storage conditions on urinary volatilomes for their reliability in disease diagnosis, Am J Clin Exp Urol 11 (2023) 481–499, www.ajceu.us/.
- [80] M. McFarlane, E. Mozdiak, E. Daulton, R. Arasaradnam, J. Covington, C. Nwokolo, Pre-analytical and analytical variables that influence urinary volatile organic compound measurements, PLoS One 15 (2020), https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0236591.
- [81] S.M. Mazzola, F. Pirrone, G. Sedda, R. Gasparri, R. Romano, L. Spaggiari, A. Mariangela, Two-step investigation of lung cancer detection by sniffer dogs, J Breath Res 14 (2020), https://doi.org/10.1088/1752-7163/ab716e.
- [82] Michele Nancy Maughan, Methods of using training aid delivery devices (tadd), US20170367298A1, 2017.
- [83] J.L. Essler, S.A. Kane, P. Nolan, E.H. Akaho, A.Z. Berna, A. DeAngelo, R.A. Berk, P. Kaynaroglu, V.L. Plymouth, I.D. Frank, S.R. Weiss, A.R. Odom John, C.M. Otto, Discrimination of SARS-CoV-2 infected patient samples by detection dogs: A proof of concept study, PLoS One 16 (2021), https://doi.org/10.1371/journal. pone.0250158.
- [84] L. Urbanová, V. Vyhnánková, A. Nečasová, Z. Filipejová, R. Srnec, L. Staňková, I. Rizzo, D. Pacík, A. Nečas, The effect of urine sample temperature on the efficacy of olfactory detection of prostate cancer in men by a specially trained dog, Acta Veterinaria Brno 92 (2023) 303–307, https://doi.org/10.2754/ avb202392030303.
- [85] T. Kind, V. Tolstikov, O. Fiehn, R.H. Weiss, A comprehensive urinary metabolomic approach for identifying kidney cancerr, Anal Biochem 363 (2007) 185–195, https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.01.028.
- [86] M. Kawaguchi, R. Ito, N. Sakui, N. Okanouchi, K. Saito, Y. Seto, H. Nakazawa, Stir-bar-sorptive extraction, with in-situ deconjugation, and thermal desorption with in-tube silylation, followed by gas chromatography-mass spectrometry for measurement of urinary 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol glucuronides, in, Anal Bioanal Chem (2007) 391–398, https://doi.org/10.1007/s00216-007-1225z.
- [87] M. Wagenstaller, A. Buettner, Quantitative Determination of Common Urinary Odorants and Their Glucuronide Conjugates in Human Urine, Metabolites 3 (2013) 637–657, https://doi.org/10.3390/metabo3030637.
- [88] M. Wagenstaller, A. Buettner, Characterization of odorants in human urine using a combined chemo-analytical and human-sensory approach: A potential diagnostic strategy, Metabolomics 9 (2013) 9–20, https://doi.org/10.1007/ s11306-012-0425-5.
- [89] R.M.G. Paredes, C.G. Pinto, J.L.P. Pavón, B.M. Cordero, Headspace-gas chromatography-mass spectrometry for the rapid determination of possible biomarkers in urine samples, Analytical Methods 9 (2017) 5784–5790, https:// doi.org/10.1039/c7ay01655g.
- [90] Natalia Drabińska, M. Starowicz, U. Krupa-Kozak, Headspace Solid-Phase Microextraction Coupled with Gas Chromatography–Mass Spectrometry for the Determination of Volatile Organic Compounds in Urine, Journal of Analytical Chemistry 75 (2020) 792–801. 10.1134/S1061934820060088.
- [91] N. Sarigul, F. Korkmaz, İ. Kurultak, A New Artificial Urine Protocol to Better Imitate Human Urine, Sci Rep 9 (2019), https://doi.org/10.1038/s41598-019-56693-4.
- [92] G.A. Mills, V. Walker, H. Mughal, Quantitative determination of trimethylamine in urine by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, Journal of Chromatography B 723 (1999) 281–285, https://doi. org/10.1016/s0378-4347(98)00542-8.
- [93] R. Guadagni, N. Miraglia, A. Simonelli, A. Silvestre, M. Lamberti, D. Feola, A. Acampora, N. Sannolo, Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method validation for the determination of endogenous substances: Urinary hexanal and heptanal as lung tumor biomarkers, Anal Chim Acta 701 (2011) 29–36, https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.05.035.

#### L. Maidodou et al.

- [94] S. Takamoto, N. Sakura, M. Yashiki, T. Kojima, Determination of acrolein by headspace solid-phase microextraction gas chromatography and mass spectrometry, Journal of Chromatography B 758 (2001) 123–128, https://doi. org/10.1016/s0378-4347(01)00152-9.
- [95] S. Takamoto, N. Sakura, A. Namera, M. Yashiki, Monitoring of urinary acrolein concentration in patients receiving cyclophosphamide and ifosphamide, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 806 (2004) 59–63, https://doi. org/10.1016/j.jchromb.2004.02.008.
- [96] N. Sakura, S.-I. Nishimura, N. Fujita, A. Namera, M. Yashiki, T. Kojima, Determination of acrolein in human urine by headspace gas chromatography and mass spectrometry, Journal of Chromatography B 719 (1998) 209–212, https:// doi.org/10.1016/s0378-4347(98)00422-8.
- [97] A. Erb, P. Marsan, M. Burgart, A. Remy, A.M. Lambert-Xolin, F. Jeandel, O. Hanser, A. Robert, Simultaneous determination of aromatic and chlorinated compounds in urine of exposed workers by dynamic headspace and gas chromatography coupled to mass spectrometry (dHS-GC–MS), J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 1125 (2019), https://doi.org/10.1016/j. jchromb.2019.121724.
- [98] K. Demeestere, J. Dewulf, B. De Witte, H. Van Langenhove, Sample preparation for the analysis of volatile organic compounds in air and water matrices, J Chromatogr A 1153 (2007) 130–144, https://doi.org/10.1016/j. chroma.2007.01.012.
- [99] X. Li, X. Wen, Z. Luo, Y. Tian, C. Qian, J. Zhang, R. Ling, Y. Duan, Development of a headspace-solid phase microextraction gas chromatography-high resolution mass spectrometry method for analyzing volatile organic compounds in urine: Application in breast cancer biomarker discovery, Clinica Chimica Acta 540 (2023), https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117236.
- [100] C.R. O'Lenick, J.D. Pleil, M.A. Stiegel, J.R. Sobus, M.A.G. Wallace, Detection and analysis of endogenous polar volatile organic compounds (PVOCs) in urine for human exposome research, Biomarkers 24 (2019) 240–248, https://doi.org/ 10.1080/1354750X.2018.1548031.
- [101] P. Porto-Figueira, J.A.M. Pereira, J.S. Câmara, Exploring the potential of needle trap microextraction combined with chromatographic and statistical data to discriminate different types of cancer based on urinary volatomic biosignature, Anal Chim Acta 1023 (2018) 53–63, https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.027.
- [102] P. Porto-Figueira, J. Pereira, W. Miekisch, J.S. Câmara, Exploring the potential of NTME/GC-MS, in the establishment of urinary volatomic profiles. Lung cancer patients as case study, Sci Rep 8 (2018), https://doi.org/10.1038/s41598-018-31380-y.
- [103] P. Bauër, M. Leemans, E. Audureau, C. Gilbert, C. Armal, I. Fromantin, Remote Medical Scent Detection of Cancer and Infectious Diseases With Dogs and Rats: A Systematic Review, Integr Cancer Ther 21 (2022), https://doi.org/10.1177/ 15347354221140516.

- [104] C. Feil, F. Staib, M.R. Berger, T. Stein, I. Schmidtmann, A. Forster, C. C. Schimanski, Sniffer dogs can identify lung cancer patients from breath and urine samples, BMC Cancer 21 (2021), https://doi.org/10.1186/s12885-021-08651-5.
- [105] P. Jendrny, F. Twele, S. Meller, C. Schulz, M. von Köckritz-Blickwede, A.D.M. E. Osterhaus, H. Ebbers, J. Ebbers, V. Pilchová, I. Pink, T. Welte, M.P. Manns, A. Fathi, M.M. Addo, C. Ernst, W. Schäfer, M. Engels, A. Petrov, K. Marquart, U. Schotte, E. Schalke, H.A. Volk, Scent dog identification of SARS-CoV-2 infections in different body fluids, BMC Infect Dis 21 (2021), https://doi.org/ 10.1186/s12879-021-06411-1.
- [106] Q. Gao, W.-Y. Lee, Urinary metabolites for urological cancer detection: a review on the application of volatile organic compounds for cancers, Am J Clin Exp Urol 7 (2019) 232–248, www.ajceu.us/.
- [107] T. Schettgen, A. Alt, P. Dewes, T. Kraus, Simple and sensitive GC/MS-method for the quantification of urinary phenol, o- and m-cresol and ethylphenols as biomarkers of exposure to industrial solvents, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 995–996 (2015) 93–100, https://doi.org/10.1016/j. jchromb.2015.05.023.
- [108] A.M. De Livera, M. Sysi-Aho, L. Jacob, J.A. Gagnon-Bartsch, S. Castillo, J. A. Simpson, T.P. Speed, Statistical Methods for Handling Unwanted Variation in Metabolomics Data, Anal Chem 87 (2015) 3606–3615, https://doi.org/10.1021/ ac502439y.
- [109] E. Heidi, Roth, Robert Powers, Meta-Analysis Reveals Both the Promises and the Challenges of, Cancers (basel) (2022), https://doi.org/10.3390/ cancers14163992.
- [110] H.L. Ngan, K.Y. Lam, Z. Li, J. Zhang, Z. Cai, Machine learning facilitates the application of mass spectrometry-based metabolomics to clinical analysis: A review of early diagnosis of high mortality rate cancers, TrAC - Trends in Analytical Chemistry 168 (2023), https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117333.
- [111] Y. Jian, N. Zhang, T. Liu, Y. Zhu, D. Wang, H. Dong, L. Guo, D. Qu, X. Jiang, T. Du, Y. Zheng, M. Yuan, X. Fu, J. Liu, W. Dou, F. Niu, R. Ning, G. Zhang, J. Fan, H. Haick, W. Wu, Artificially Intelligent Olfaction for Fast and Noninvasive Diagnosis of Bladder Cancer from Urine, ACS Sens 7 (2022) 1720–1731, https:// doi.org/10.1021/acssensors.2c00467.
- [112] Q. Liu, S. Li, Y. Li, L. Yu, Y. Zhao, Z. Wu, Y. Fan, X. Li, Y. Wang, X. Zhang, Y. Zhang, Identification of urinary volatile organic compounds as a potential noninvasive biomarker for esophageal cancer, Sci Rep 13 (2023), https://doi.org/ 10.1038/s41598-023-45989-1.
- [113] E.R. Kehoe, B.L. Fitzgerald, B. Graham, M.N. Islam, K. Sharma, G.P. Wormser, J. T. Belisle, M.J. Kirby, Biomarker selection and a prospective metabolite-based machine learning diagnostic for lyme disease, Sci Rep 12 (2022), https://doi.org/ 10.1038/s41598-022-05451-0.

Ainsi nous avons mis évidence les éléments clés liés à la préparation, la conservation et l'analyse d'échantillons d'urine. Cette étude révèle encore une fois la diversité des molécules volatiles composant le volatilome humain, l'importance de l'échantillonnage dans ce domaine, et l'intérêt du développement de protocoles standardisés.

Pour pouvoir établir un protocole d'échantillonnage pertinent pour son application dans le domaine biomédical, la connaissance des performances analytiques, des avantages et des inconvénients des matériaux de prélèvement est indispensable au chercheur. Pourtant, dans la littérature, peu d'études apportent ces informations, en particulier pour les matériaux dédiés à l'olfaction canine. Dans ce contexte, le chapitre suivant aborde l'étude d'une sélection de cinq dispositifs de prélèvement des composés volatils de la sueur, reportés dans les travaux utilisant les chiens de détection ou dans les études instrumentales.

# Chapitre 3

## Chapitre 3 : Etude expérimentale sur les supports de prélèvements de la sueur

Dans ce chapitre, une étude préliminaire visant à sélectionner la méthode d'extraction la plus efficace pour analyser les matériaux ne pouvant pas être analysés par thermodésorption directe (compresses, tissus, tubes Getxent) est réalisée. La revue de la littérature (chapitre 1), nous a permis d'identifier les techniques les plus sensibles et exhaustives pour l'extraction des COVs de la sueur, telles que la SPME ou l'extraction par DHS. L'analyse des tubes Getxent<sup>®</sup> (Biodesiv, Suisse) est peu abordée actuellement dans la littérature, c'est pourquoi ce support de prélèvement a été choisi pour comparer les performances des techniques de SPME et DHS. En effet, les tubes Getxent sont des matériaux conçus pour l'entrainement des chiens de détection, notamment utilisés par les douanes, les militaires (détection d'explosifs) [25,26], et plus récemment pour des études médicales [27–30]. Ces tubes adsorbants ont été analysés par SPME GC-MS par plusieurs équipes [25,27,29,31], mais à notre connaissance, n'ont jamais été analysés par la technique de DHS GC-MS. Ces deux méthodes sont appliquées ici à l'analyse d'échantillons de sueur axillaire.

Dans une seconde partie, la préparation d'une solution artificielle de sueur est décrite. L'objectif est de mettre au point une solution de composition précise, de molécules stables pendant leur utilisation, représentant les différentes familles de molécules retrouvées dans la sueur du volatilome sain. Cette préparation permettra ensuite de réaliser une étude comparative avec cinq supports de prélèvement. La sensibilité et la sélectivité de ces matériaux est comparée dans des conditions standardisées.

Enfin, la troisième partie aborde les essais préliminaires d'analyse de matériaux nanostructurés innovants, développés spécifiquement pour le prélèvement des thiols volatils, difficilement détectés avec les supports testés précédemment.

## Partie 1 : Comparaison des techniques d'extraction par SPME et DHS, pour l'analyse par GC-ToF-MS d'échantillons de sueur axillaire prélevés à l'aide de tubes Getxent chez des individus sains

## 1.1 Matériels et méthodes

## 1.1.1 Échantillonnage de sueur humaine

## <u>Individus</u>

Trois sujets sains, dont 1 homme de 38 ans et 2 femmes de 28 et 23 ans, d'origine caucasienne, ont participé à l'expérience. Les individus réalisent le prélèvement le matin à jeun, sans avoir utilisé de déodorant ni d'autres produits cosmétiques depuis la veille. Les individus se sont lavé les mains avant le prélèvement avec un savon sans parfum.

## Tubes Getxent

Les tubes Getxent sont conditionnés dans des sachets de 50 unités (vendus par l'entreprise Biodesiv sur le site internet https://getxent.com/fr/). Ils sont composés d'un polymère apolaire breveté, ont une masse de 930 mg, et mesurent 35 mm de long et 8 mm de diamètre, Figure 4. Ces dispositifs sont préconditionnés par le fournisseur et à usage unique.



Figure 4 : Illustration d'un tube Getxent® (Biodesiv)

## **Protocole**

Les prélèvements sont réalisés au laboratoire de Twistaroma. Chaque individu réalise un auto-prélèvement, en manipulant les tubes sans port de gants. Le schéma du protocole de prélèvement est présenté en Figure 5. Un tube Getxent est placé sous chaque aisselle pendant 15 min. La position des tubes est ensuite inversée : le tube initialement positionné sous l'aisselle droite est mis sous l'aisselle gauche, et inversement. Le prélèvement continue ensuite pendant 15 min.



Figure 5 : Schéma du protocole réalisé pour le prélèvement de sueur à l'aide de tubes Getxent pour les analyses par SPME GC-MS et DHS GC-MS

Les 6 tubes Getxent, et 2 tubes vierges (blancs analytique) sont stockés dans des vials de 20 mL en verre, fermés avec un bouchon à visser et un septum en PTFE, à 4 °C jusqu'à l'analyse.

## 1.1.2 Paramètres d'extraction par DHS

Lors de ces essais préliminaires, le laboratoire de Twistaroma n'était pas encore équipé d'un système pour réaliser les extractions par la technique de Dynamique Headspace (DHS). Afin d'expérimenter cette technique, les extractions par DHS sont réalisées par le fournisseur Markes International, à Offenbach (Allemagne). Ainsi, après avoir réalisé les prélèvements de sueur des 3 individus, au laboratoire de Twistaroma (Strasbourg), les vials contenant les tubes Getxent sont envoyés au laboratoire d'Offenbach. Les extractions sont réalisées avec le système Micro-Chamber Thermal Extractor™ (MCTE Markes, Allemagne), illustré sur la Figure 6.



Figure 6 : Illustration du système d'extraction MCTE2501 Markes International Ltd ; A : Système vue de l'avant, avec micro-chambres fermées ; B : Micro-chambres ouvertes, vues d'en haut.

Le MCTE est composé de quatre chambres cylindriques de 6,4 cm de diamètre interne et 3,6 cm de profondeur (équivalent à 114 cm<sup>3</sup>). Les tubes Getxent sont placés individuellement dans une micro-chambre, chauffée à 65 °C pendant 1 h. Un flux d'azote (qualité 5.0, issu d'une bouteille à une pression de 4 bars), avec un débit de 50 mL/min, balaye les micro-chambres contenant les tubes Getxent afin d'entrainer les COVs dans une trappe (tube en verre) contenant 60 mg d'adsorbant Tenax TA

(2,6-diphényl-p-phénylène). Ce type d'adsorbant est choisi pour sa capacité à piéger une large gamme de composés volatils (C7 – C26) [32].

Les tubes adsorbants (Tenax TA) proviennent également du fournisseur Markes (Allemagne), et sont utilisés neufs pour cette expérience. Les tubes d'adsorbant sont préconditionnés par le fournisseur avant leur première utilisation (système TC-20, Markes). Ils sont ensuite manipulés à l'aide de gants en nitrile. Après l'extraction des COVs, les tubes d'adsorbant sont fermés avec des bouchons en laiton à visser, et emballés dans du polystyrène pour leur transport jusqu'au laboratoire de Twistaroma. Le transport est effectué le lendemain du prélèvement, à température ambiante. Les 5 tubes réceptionnés (3 échantillons, 1 tube Getxent blanc, et 1 tube Tenax TA blanc) sont illustrés Figure 7.



Figure 7 : Illustration des tubes Tenax TA après l'extraction, réceptionnés au laboratoire de Twistaroma (Strasbourg)

L'injection des échantillons est réalisée par désorption thermique avec un système automatisé (Thermal Desorption Unit - TDU, Gerstel). La méthode de désorption appliquée est un protocole classique recommandé par le fournisseur. La température initiale du TDU est de 40°C, puis augmente de 60°C/min jusqu'à 280°C (maintenu pendant 10 min) sous un flux d'hélium (54,2 mL/min). Les COVs sont ensuite piégés à froid (-10°C) dans un injecteur à température programmable (CIS Gerstel), puis injectés avec un ratio de split de 1/10. Le programme de température de l'injecteur

consiste une rampe de 12°C/s jusqu'à 300°C (maintenue 5 min). L'injecteur CIS est ensuite chauffé avec une rampe de 12°C/s jusqu'à 300 °C (maintenu pendant 5 min). Ce dernier est équipé d'un insert cylindrique en verre d'un diamètre de 2 mm et de 7,6 mm de longueur, rempli de Tenax TA.

## 1.1.3 Paramètres d'extraction par SPME

L'extraction par SPME est mise en œuvre avec un système automatisé, le Multipurpose Sampler (MPS, Gerstel), réalisée au laboratoire de Twistaroma. Une seringue munie d'une fibre de 2 cm de long est utilisée. La fibre est préconditionnée avant sa première utilisation selon les recommandations du fournisseur dans l'injecteur sous flux d'hélium pendant 30 min à 270°C. Des échantillons de contrôle qualité internes sont utilisés ensuite entre chaque série d'analyses par le laboratoire pour suivre le vieillissement de la fibre (cartes de contrôle). Il s'agit d'une fibre (Supelco<sup>®</sup>) composée de plusieurs adsorbants : une couche de Divinylbenzène (DVB) de 50 µm d'épaisseur, et une couche d'une combinaison de Carboxène (CAR) et de Polydiméthylsiloxane (PDMS), de 30 µm d'épaisseur. Ce type de fibre (DVB/CAR/PDMS) est choisi pour permettre l'extraction de différentes catégories de COVs :

-Le DVB est constitué de deux groupements vinyles (-CH=CH2) liés à un noyau benzénique. Il présente une affinité particulière pour les composés aromatiques (exemple : hydrocarbures aromatiques polycycliques) due aux interactions  $\pi$ – $\pi$  qu'il forme avec les noyaux aromatiques des analytes [33].

- Le Carboxène est un adsorbant microporeux qui présente une affinité particulière pour les composés très volatils, tels que les alcools, les aldéhydes et les hydrocarbures légers (C2 - C5) [32].

- Le PDMS est un polymère apolaire particulièrement efficace pour extraire les composés volatils apolaires (hydrocarbures, esters, cétones, ...) [34].

La température d'extraction est de 65 °C, et la durée d'extraction de 50 min, avec une agitation de 250 rpm. La température et la durée d'extraction ont été repris d'un protocole interne à Twistaroma, développé avant ces travaux de thèse. Après extraction, la fibre est directement désorbée dans l'injecteur, sans split pendant 5 min

à 250 °C sous un flux d'hélium à 19,2 mL/min. L'injecteur est équipé d'un insert cylindrique en verre vide d'un volume de 870  $\mu$ L. Entre chaque échantillon, la fibre est reconditionnée pendant 5 min à 250 °C.

## 1.1.4 Analyse par GC-ToF-MS

Les analyses sont réalisées par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (GC-ToF-MS) avec un système GC 7890B (Agilent) et un spectromètre de masse à temps de vol Pegasus BT-ToF (Leco). Une colonne de séparation polaire (DB-WAX, Agilent) est utilisée, de dimensions : 30 m x 0,25 mm (diamètre interne) x 0,25  $\mu$ m (épaisseur phase). Le programme du four est le suivant : la température initiale est de 40 °C (pendant 2 min), puis augmente avec une rampe de 5°C/min jusqu'à 250 °C (maintenue pendant 5 min). Le spectromètre de masse est utilisé en mode full scan de 30 à 400 m/z. La résolution en masse du détecteur est de 10 000, et la précision en masse de 0,01 Da.

## 1.1.5 Identification des composés

L'identification des composés est réalisée de manière putative à l'aide de la base de données NIST14, et des indices de rétention des composés.

## 1.2 Résultats

## 1.2.1 Chromatogrammes

Trois chromatogrammes (TIC) de différents échantillons obtenus par l'analyse par DHS-GC-ToF-MS sont présentés Figure 8. Tout d'abord, le chromatogramme (A) d'un tube Tenax TA blanc thermodésorbé est utilisé comme contrôle. Il permet de détecter les contaminations potentielles des tubes adsorbants après l'extraction, notamment pendant le transport des tubes jusqu'au laboratoire de Twistaroma pour l'analyse. Le chromatogramme (B) représentant un tube Getxent blanc extrait par DHS, permet de détecter les composés relargués par les tubes Getxent neufs (non préconditionnés) pendant l'extraction. On observe un pic d'éthanol, de nonanal et de décanal, pouvant provenir d'une contamination lors de la manipulation des tubes (air du laboratoire, expérimentateur). Un phtalate et des silanes sont également identifiés, pouvant provenir d'une dégradation du polymère Getxent.

Enfin, le chromatogramme (C) d'un extrait de sueur (F, 28 ans), montre les COVs majoritaires identifiés (également reportés en gras dans le Tableau 1) : l'acétate d'éthyle, l'éthanol, le décane, le 1-butanol, le cyclopentanone, le dodécane, l'acétoine, l'octanal, la butyrolactone, et les acides octanoïque et décanoïque. Ces composés volatils ont tous déjà été identifiés dans des précédentes études liées à l'analyse de la sueur [35], à l'exception du cyclopentanone. Ce composé, ainsi que ses dérivés méthylés, sont utilisés en parfumerie et dans l'industrie pharmaceutique [36]. Le cyclopentanone est de ce fait probablement d'origine exogène.



Figure 8 : Chromatogrammes (TIC) d'un tube Tenax TA blanc (A), de l'extrait du tube Getxent blanc (B), et d'un échantillon de sueur (C), analysés par DHS-GC-ToF-MS.

De même, les chromatogrammes des blancs et d'un extrait de sueur obtenu par SPME-GC-ToF-MS sont présentés Figure 9. Le chromatogramme (A) d'un blanc (fibre SPME préconditionnée) permet de détecter les contaminations potentielles de la fibre DVB/CAR/PDMS, notamment par l'air du laboratoire. Sur le chromatogramme (B) représentant un tube Getxent blanc extrait par SPME, on observe un pic de siloxane, ainsi que d'autres composés considérés comme des contaminations de l'environnement (éthanol, acide acétique, et deux esters (oxime-méthoxyle-phényle et hexyl décanoate)).



Figure 9 : Chromatogrammes (TIC) d'un blanc (vial vide) (A), d'un tube Getxent blanc (B), et d'un échantillon de sueur (C), analysés par SPME-GC-ToF-MS

Figure 9, le chromatogramme (C) d'un extrait de sueur par SPME, montre les composés majoritaires identifiés dans le profil volatil du même individu (F, 28 ans) que celui présenté en exemple pour l'extraction par DHS (Figure 8). On observe

notamment un pic d'acétone, de 1-butanol, de cyclopentanone, d'acétoine, de 5hepten-2-one, 6-methyl (ou Sulcatone), de 6,10-dimethyl-5,9-Undecadien-2-one (ou Geranylacetone). A l'exception du cyclopentanone, ces COVs sont des molécules typiquement retrouvées dans la sueur [12]. Ils sont reportés en gras dans le Tableau 1.

## 1.2.2 Comparaison de la sélectivité des méthodes d'extraction

Afin de comparer la sélectivité des deux méthodes d'extraction, les COVs déjà retrouvés dans la sueur humaine d'après la littérature, et identifiés dans cette expérience par DHS et/ou SPME GC-ToF-MS, sont reportés par ordre de temps de rétention (TR, en min), dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Identifiant CAS, Temps de Rétention (TR, en min), nom usuel et formule brute des composés détectés et identifiés par DHS et/ou SPME GC-ToF-MS indiqués par une croix dans les colonnes DHS et/ou SPME. Dans la dernière colonne du tableau, l'origine possible de ces COVs dans la sueur est indiquée (d'après la base de données HMDB (Human Metabolome Database), consultée le 10/10/2024 sur le site <u>https://hmdb.ca/</u>,et les références cités). Les composés identifiés sur les chromatogrammes présentés précédemment sont indiqués en gras

CAS	TR (min)	Nom	Formule	Famille	DHS	SPME	Origine possible
142- 82-5	3,15	Heptane	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub>	Alcane	x	x	Métabolite secondaire, lipoxydation [11]
111- 65-9	3,78	Octane	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub>	Alcane		x	Métabolite secondaire, lipoxydation [11]
67- 64-1	3,90	Acétone	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	Cétone	x	x	Oxydation squalène et acides gras [12]
111- 84-2	4,98	Nonane	$C_9H_{20}$	Alcane		x	Peroxydation des lipides (acides gras polyinsaturés) [11]
96- 17-3	5,17	2-Methylbutanal	C₅H₁₀O	Aldéhyde		x	Métabolite secondaire (métabolisme des alcools, détoxification), alimentation [11]
124- 18-5	6,93	Décane	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>	Alcane	x	x	Peroxydation des lipides (acides gras polyinsaturés)[11]
80- 56-8	7,42	alpha-Pinène	$C_{10}H_{16}$	Terpène		x	Métabolite bactérien, ou exogène (aliments, environnement)[12]
108- 88-3	8,30	Toluène	C7H8	Hydrocarbu re aromatique	x		Exogène (environnement [11,12])
66- 25-1	8,81	Hexanal	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O	Aldéhyde	x	x	Peroxydation acide linoléique [12]

CAS	TR (min)	Nom	Formule	Famille	DHS	SPME	Origine possible	
1587 7-57- 3	8,90	3-Methylpentanal	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O	Aldéhyde		x	Métabolite secondaire (métabolisme des alcools, détoxification), alimentation[11]	
1120 -21-4	9,05	Undecane	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>	Alcane	x	x	Peroxydation des lipides (acides gras polyinsaturés) [11]	
106- 42-3	10,26	p-Xylène	$C_8H_{10}$	Hydrocarbu re aromatique	x	x	Exogène (environnement) [11]	
100- 41-4	10,50	Ethylbenzène	$C_8H_{10}$	Hydrocarbu re aromatique	x	x	Métabolite bactérien (Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus) [37]	
71- 36-3	10,72	1-Butanol	C₄H₁₀O	Alcool	x	x	Métabolites secondaire (détoxification)[11] ou exogène (aliments)	
629- 50-5	11,97	Tridecane	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	Alcane	x	x	Peroxydation des lipides (acides gras polyinsaturés)[11]	
120- 92-3	12,20	Cyclopentanone	C₅H <sub>8</sub> O	Cétone	x	x	Exogène (alimentation)	
112- 40-3	12,50	Dodécane	$C_{12}H_{26}$	Alcane	x		Peroxydation des lipides (acides gras polyinsaturés)[11]	
100- 42-5	13,59	Styrène	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub>	Hydrocarbu re aromatique	x	x	Métabolite bactérien ( <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> ) [38]	
629- 62-9	14,00	Pentadécane	$C_{15}H_{32}$	Alcane	x		Peroxydation des lipides (acides gras polyinsaturés)	
124- 13-0	14,58	Octanal	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	Aldéhyde	x	x	Peroxydation des lipides (acides gras polyinsaturés)	
513- 86-0	14,83	3-hydroxy-2- butanone (Acétoine)	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Cétone	x	x	Métabolite bactérien ( <i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis, Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ) [37]	
110- 93-0	15,92	5-Hepten-2-one, 6- methyl- (Sulcatone)	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	Cétone	x	x	Sébum (oxydation squalène)[12]	
124- 19-6	17,47	Nonanal	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	Aldéhyde	x	x	Peroxydation des lipides (acides gras polyinsaturés)	
629- 59-4	17,64	Tétradécane	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	Alcane		x	Peroxydation des lipides (acides gras polyinsaturés)	
106- 32-1	18,66	Ethyl octanoate	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	Ester		x	Exogène (cosmétique, aliments)	
64- 19-7	18,72	Acide acétique	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Acide gras volatil	x	x	Interaction glycérol et acide lactique avec bactéries cutanées ( <i>Propionibacteria,</i> <i>staphylococcus,</i> <i>Corynebacteria</i> ) [39]	
CAS	TR (min)	Nom	Formule	Famille	DHS SPME		Origine possible	
--------------------	-------------	--	--	-----------------------	----------	---	--	--
99- 87-6	19,00	p-Cymène	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	Terpène	x		Métabolite bactérien [38], ou exogène (aliments, environnement)	
98- 01-1	19,12	Furfural	$C_5H_4O_2$	Aldéhyde	x	x	Métabolite secondaire (métabolisme des alcools) [11], alimentation	
78- 93-3	19,70	2-Butanone	C₄H <sub>8</sub> O	Cétone	x		Métabolite bactérien à la surface de la peau ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) [37]	
1847 9-58- 8	19,70	7-Octen-2-ol, 2,6- dimethyl- (Dihydromyrcenol)	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	Alcool	x		Métabolite secondaire, exogène (cosmétique)	
64- 18-6	20,04	Acide formique	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Acide gras volatil		x	Interaction glycérol et acide lactique avec bactéries cutanées ( <i>Propionibacteria,</i> <i>staphylococcus,</i> <i>Corynebacteria</i> )[39]	
112- 31-2	20,60	Décanal	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	Aldéhyde	x		Peroxydation des lipides (acides gras polyinsaturés)	
1342 9-07- 7	20,89	1-(2- méthoxypropoxy) - propan-2-ol	C7H16O3	Alcool		x	Exogène (solvant cosmétique)	
79- 09-4	20,98	Acide propanoïque	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	Acide gras volatil		x	Interaction glycérol et acide lactique avec bactéries cutanées ( <i>Propionibacteria,</i> <i>staphylococcus,</i> <i>Corynebacteria</i> )[39]	
100- 52-7	21,20	Benzaldéhyde	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O	Aldéhyde	x		Métabolite secondaire, alimentation	
78- 70-6	21,70	Linalol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	Alcool	x		Exogène (cosmétique, aliments)	
636- 41-9	21,80	2-Methyl-1H-pyrrole	$C_5H_7N$	Pyrrole	x		Exogène (alimentation)	
110- 13-4	22,70	2,5-Hexanedione	$C_6H_{10}O_2$	Cétone	x		Métabolite secondaire (intestin, foie)	
112- 12-9	22,77	2-Undecanone	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O	Cétone		x	Métabolite bactérien ( <i>Staphylococcus aureus</i> )[37]	
693- 54-9	22,79	2-Decanone	C <sub>10</sub> H <sub>2</sub> 0O	Cétone		х	Métabolite secondaire (intestin, foie)	
544- 76-3	22,90	Hexadecane	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	Alcane	х		Peroxydation des lipides (acides gras polyinsaturés)	
107- 92-6	23,19	Acide butanoïque	$C_4H_8O_2$	Acide gras volatil		x	Oxydation des lipides [40], ou interactions amino-acides - bactéries cutanées [39]	
112- 44-7	23,2	Undécanal	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O	Aldéhyde	x		Peroxydation des lipides (acides gras polyinsaturés)	
107- 21-1	23,7	1,2-Ethanediol	$C_2H_6O_2$	Alcool	x		Métabolite secondaire, exogène	

CAS	TR (min)	Nom	Formule	Famille	DHS	SPME	Origine possible
96-	22 77	Butyrolactopo	C.H.O.	Lactono	v	v	Métabolite secondaire,
48-0	23,11	Bulyrolacione	C4I 16O2	Lacione	^	^	exogène
98-	23,92	Acetophenone	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O	Cétone	x	x	Métabolite de détoxification
86-2	- , -	1	-00-				(intestin, foie)
89- 78-1	24,10	dl-Menthol	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	Alcool	x		Exogène (cosmétique, aliments)
500		3-Methylbutanoic		A .:			
503-	24,20	acid (Acide	$C_5H_{10}O_2$	Acide gras		x	Interaction proteines (Leucine)
74-2		isovalérique)		volatii			-bacteries cutanees [37,39]
1188		2-Methylheptanoic		Acide gras			Dégradation sébum (hydrolyse
-02-9	24,23	acid	$C_8H_{16}O_2$	volatil		x	triglycérides)[39]
534-				_			Métabolite secondaire,
22-5	24,90	2-méthylfurane	C₅H <sub>6</sub> O	Furane	х		exogène [11]
1048							Métabolite bactérien, ou
2-56-	25,40	alpha-Terpinéol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	Terpène	x		exogène (aliments,
1							environnement)[12]
2212							
2-36-	25.80	3-methyl-2(5H) -	C5H6O2	Cétone	x		métabolite de détoxification
7	- ,	Furanone	-0 0-2	-			(intestin, foie)[11]
				Hvdrocarbu			
91-	26.40	Naphtalène	C10H8	re	x		Exoaène (environnement) [11]
20-3	,		- 10. 10	aromatique			
629-				•			Peroxydation des lipides
82-3	26,50	1,1'-Oxybisoctane	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O	Alcane	х	x	(acides gras polvinsaturés)[11]
103-							Exogène (cosmétique.
45-7	27,69	Phényléthyle acetate	$C_{10}H_{12}O_2$	Ester		x	aliments)
79-							,
05-0	27,70	Propanamide	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO	Amine	x		Exogène (environnement)
							Métabolite secondaire
110-		2-Propanol -1,1'-					(métabolisme des
98-5	27,96	oxybis-	$C_6H_{14}O_2$	Alcool	х	х	hydrocarbures)[11],
							alimentation
							Oxydation des lipides ou
142-	28,14	Hexanoic acid	$C_6H_{12}O_2$	Acide gras		x	interactions Aminoacides -
62-1				volatil			bactéries cutanées [39]
				Hydrocarbu			<u>-</u>
4537	28,60	5-Phenylundecane	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub>	re	x		Exogène (environnement)
-15-9				aromatique			
				Hydrocarbu			
4536	28,90	4-Phenylundecane	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub>	re	x		Exogène (environnement)
-86-1		-		aromatique			,
		5,9-Undecadien-2-		·			
689-	28,90	one, 6,10-dimethyl-	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O	Cétone	x	x	Sebum (oxydation squalène)
67-8		(Geranylacetone)					[12]
67-	00.00		0.11.6.5				Métabolite bactérien, ou
71-0	29,29	Diméthylsulfone	$C_2H_6O_2S$	Ihiol	X	x	exogène
	I					I	1

CAS	TR (min)	Nom	Formule	Famille	DHS SPME		Origine possible
100- 51-6	29,30	Alcool benzylique	C7H8O	Alcool	x		Exogène (cosmétique, aliments)
4536 -87-2	29,50	3-Phénylundecane	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub>	Hydrocarbu re aromatique	x		Exogène (environnement)
60- 12-8	29,68	2-Phényléthanol	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	Alcool	х	x	Exogène (cosmétique, aliments)
149- 57-5	30,39	Acide 2- éthylhexanoïque	$C_8H_{16}O_2$	Acide gras volatil		x	dégradation sébum (hydrolyse triglycérides)
2719 -62-2	30,50	6-Phényldodecane	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub>	Hydrocarbu re aromatique	x		Exogène (environnement)
2719 -63-3	30,70	5-Phényldodecane	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub>	Hydrocarbu re aromatique	x		Exogène (environnement)
4536 -88-3	30,80	2-Phénylundecane	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub>	Hydrocarbu re aromatique	x		Exogène (environnement)
95- 16-9	31,10	Benzothiazole	C7H₅NS	Thiol	x		Métabolite bactérien, ou exogène
108- 95-2	31,44	Phénol	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O	Alcool	x	x	Exogène
110- 27-0	32,38	Isopropyl myristate	$C_{17}H_{34}O_2$	Ester	x	x	Exogène (cosmétique)
123- 11-5	32,40	Anisaldéhyde	$C_8H_8O_2$	Aldéhyde	x		Exogène (aliments)
124- 07-2	32,57	Acide octanoïque	$C_8H_{16}O_2$	Acide gras volatil	x	x	Dégradation sébum (hydrolyse triglycérides)
124- 06-1	32,90	Ethyl myristate	$C_{16}H_{32}O_2$	Ester	x		Exogène (cosmétique, aliments)
4534 -51-4	33,20	4-Phényltridécane	$C_{19}H_{32}$	Hydrocarbu re aromatique	x		Exogène
106- 44-5	33,40	p-Crésol	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	Alcool	х		Exogène
2050 -08-0	33,71	Benzoic acid, 2- hydroxy-, pentyl ester	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	Ester		x	Exogène (cosmétique, aliments)
112- 05-0	34,63	Acide nonanoïque	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	Acide gras volatil	x	x	Sébum (hydrolyse triglycérides) [39]
122- 99-6	34,70	2-Phénoxyéthanol	$C_8H_{10}O_2$	Alcool	x		Exogène
706- 14-9	34,80	2(3H) -Furanone, 5- hexyldihydro-	$C_{10}H_{16}O_2$	Lactone	x		Exogène
4534 -53-6	35,00	2-Phényltridécane	$C_{19}H_{32}$	Hydrocarbu re aromatique	x		Exogène (environnement)

CAS	TR (min)	Nom	Formule	Famille	DHS	SPME	Origine possible
112- 72-1	35,20	1-Tétradecanol	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O	Alcool	x		Exogène (cosmétique)
6259 -76-3	36,10	n-Hexyl salicylate	$C_{13}H_{18}O_3$	Ester	x		Exogène (cosmétique)
142- 91-6	36,26	Isopropyl palmitate	$C_{19}H_{38}O_2$	Ester	x	x	Exogène (cosmétique, aliments)
628- 97-7	36,52	Ethyl palmitate	$C_{18}H_{36}O_2$	Ester	x	x	Exogène (cosmétique, aliments)
334- 48-5	36,60	Acide décanoïque	$C_{10}H_{20}O_2$	Acide gras volatil	x	x	Sébum (hydrolyse triglycérides) [39]
122- 40-7	36,90	α-Pentyl- cinnamaldéhyde	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O	Aldéhyde	x		Exogène (cosmétique)
2485 1-98- 7	37,04	Hédione	$C_{14}H_{24}O_3$	Ester	x	x	Exogène (synthétique, ingrédient cosmétique)
6540 5-77- 8	37,10	cis-3-Hexenyl salicylate	$C_{13}H_{16}O_{3}$	Ester	x		Exogène (cosmétique)
1222 -05-5	38,20	Galaxolide	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O	Benzopyran e	x		Exogène (cosmétique)
101- 86-0	38,70	α-Hexyl- cinnamaldéhyde	$C_{15}H_{14}O$	Aldéhyde	x		Exogène (synthétique, ingrédient cosmétique)
629- 76-5	38,90	n-Pentadécanol	$C_{15}H_{32}O$	Alcool	x		Exogène
2114 5-77- 7	39,20	Tonalid	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O	Cétone	x		Exogène (synthétique, cosmétique)
65- 85-0	39,31	Acide benzoïque	$C_7H_6O_2$	Acide gras volatil		x	Oxydation lipides, métabolite secondaire (lié au stress) [41]
88- 29-9	39,40	Versalide	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O	Cétone	х		Exogène
143- 07-7	40,29	Acide dodécanoïque	$C_{12}H_{24}O_2$	Acide gras volatil	x	x	Sébum (hydrolyse triglycérides)[39]
118- 56-9	40,40	Homosalate	$C_{16}H_{22}O_3$	Ester	x		Exogène (cosmétique)
119- 61-9	40,90	Benzophénone	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O	Cétone	х		Exogène (alimentation)
111- 02-4	42,50	Squalène	$C_{30}H_50$	Terpène	x		Composé majoritaire du sébum
120- 51-4	43,30	Benzyle Benzoate	$C_{14}H_{12}O_2$	Ester	x		Exogène (cosmétique)
544- 63-8	43,72	Acide tétradécanoïque	$C_{14}H_{28}O_2$	Acide gras volatil	x	x	Sébum (hydrolyse triglycérides)[39]
1002 -84-2	45,70	Acide pentadécanoïque	$C_{15}H_{30}O_2$	Acide gras volatil	x		Sébum (hydrolyse triglycérides)[39]

En combinant les résultats obtenus avec les deux techniques d'extraction, 103 COVs sont identifiés (Tableau 1). Dans cette expérience, l'extraction par DHS permet l'identification de 83 COVs, alors que l'extraction par SPME permet l'identification 53 COVs, par GC-ToF-MS. Parmi les 83 composés identifiés dans les extraits par DHS, 40 % sont également identifiés dans les extraits par SPME, et 60 % ne sont pas détectés par SPME-GC-ToF-MS.

En considérant le nombre de COVs identifiés par famille chimique en fonction de la technique d'extraction utilisée, Figure 10, l'extraction par DHS apparait ici comme la plus exhaustive des deux techniques.



Figure 10 : Diagramme en barres représentant le nombre (Nb) de COVs identifiés par SPME et/ou DHS FS-ToF-MS par familles chimiques

A l'inverse, l'extraction par SPME est donc plus sélective. Cependant, parmi les 52 composés identifiés dans les extraits par SPME, 20 COVs ne sont pas détectés dans les extraits obtenus par DHS. Il s'agit principalement d'acides gras volatils (8 composés), tels que l'acide formique, l'acide propanoïque, l'acide butanoïque, l'acide isovalérique, l'acide 2-méthylheptanoïque, l'acide hexanoïque, l'acide 2-éthylhexanoïque, et l'acide benzoïque. Les différences observées pour la détection des acides gras volatils sont inattendues car selon la littérature, le polymère Tenax TA est un adsorbant efficace pour ce type de COVs, semi-polaires [32].

Trois alcanes (octane, nonane, tétradécane), 3 esters (éthyle octanoate, phényléthyle acétate, et amyle salicylate), 2 cétones (2-undécanone, et 2-décanone), 2 aldéhydes (3-méthylbutanal et 3-méthylpentanal), un terpène (alpha-pinène) et un alcool (1-(2-

méthoxypropoxy) propan-2-ol), ne sont également pas identifiés dans les extraits par DHS.

Le Tenax TA est moins adapté que le Carboxen (l'un des polymères composant la fibre SPME) pour le piégeage des composés à courte chaine carbonée (< C7) [32], et très volatils présentant des températures d'ébullition ( $T_e$ )  $\leq$  100°C [42]. Cela peut expliquer la non-détection du 2-méthylbutanal ( $T_e$  = 91-92 °C) et de l'acide formique ( $T_e$  = 100,4°C) dans les extraits par DHS.

### 1.2.3 Comparaison de la sensibilité des méthodes d'extraction

Un *t-test* est réalisé afin de comparer les valeurs des surfaces de pics des 33 COVs communs aux extraits par SPME et par DHS. Les différences sont significatives (p-value < 0,05) pour 20 composés, Figure 11.



Figure 11 : Diagrammes en barres représentant les surfaces de pics des 20 COVs significativement différents (pvalue < 0,05) entre les extraits par DHS et les extraits par SPME

La majorité des composés significatifs sont extraits préférentiellement par DHS : acétophénone (p-value =  $6.9 \times 10^{-11}$ ), furfural (p-value =  $2.2 \times 10^{-7}$ ), octanal (p-value =  $4.7 \times 10^{-7}$ ), styrène (p-value =  $2.7 \times 10^{-6}$ ), 1-butanol (p-value =  $1.3 \times 10^{-5}$ ), heptane (pvalue =  $8.9 \times 10^{-5}$ ), phénol (p-value =  $2.7 \times 10^{-4}$ ), acide octanoïque (p-value =  $4.1 \times 10^{-4}$ ), p-xylène (p-value =  $4.7 \times 10^{-4}$ ), hexanal (p-value = 0.0012), tridécane (p-value = 0.0021), acide dodécanoïque (p-value = 0.0025), éthylbenzène (p-value = 0.0030), isopropyl palmitate (p-value = 0.0058), dimethyl sulfone (p-value = 0.010), décane (pvalue = 0.015) et isopropyl myristate (p-value = 0.020).

Les composés très volatils ( $T_e \le 100^{\circ}C$ ) tels que l'acétone (p-value = 3,4 x 10<sup>-4</sup>), et l'heptane (p-value = 8,9 x 10<sup>-5</sup>), sont extraits préférentiellement par SPME, grâce à la combinaison de polymères utilisés (notamment le Carboxen). Les surfaces de pics de l'acide nonanoïque (p-value = 0,0044), et de l'acide dodécanoïque (p-value = 1,1 x 10<sup>-6</sup>), sont également supérieures dans les extraits obtenus par SPME.

#### **1.3 Conclusion**

L'expérience montre la faisabilité d'utiliser les tubes Getxent pour le prélèvement de sueur au niveau des aisselles chez des individus sains. Le protocole de prélèvement mis en œuvre est très simple à réaliser. Les tubes Getxent sont positionnés en contact direct avec la peau, et tiennent dans le creux des aisselles, simplement en maintenant les bras le long du corps, sans nécessiter de système de fixation supplémentaire. Le contact direct du dispositif avec la surface de la peau implique que le sébum soit également prélevé. Les tubes Getxent imprégnés de sueur et de sébum sont ensuite extraits avec deux techniques différentes, la SPME (fibre DVB/CAR/PDMS) et la DHS (tube adsorbant Tenax TA), dans des conditions de temps et de température d'extraction similaires (à 65°C, pendant 50 min pour la SPME et 60 min pour la DHS), et analysés avec le même système par GC-ToF-MS.

Une centaine de composés volatils sont identifiés dans l'ensemble des échantillons. Diverses familles chimiques sont retrouvées, dont une plus grande diversité dans les extraits obtenus par DHS. Cette technique permet ici une extraction des COVs moins sélective que la SPME. Cependant, on remarque que les composés très volatils ( $T_e < 100^{\circ}$ C) et les acides gras volatils sont préférentiellement extraits par SPME.

En comparant l'intensité des signaux (surfaces de pics) des 33 composés détectés avec les deux techniques, on observe une meilleure sensibilité avec l'extraction par DHS pour 16 composés (48 % des COVs en commun).

A notre connaissance, l'utilisation du tube Getxent pour prélever les COVs de la sueur et du sébum, suivie par une extraction par DHS et une analyse par GC-ToF-MS n'avait pas encore été expérimentée et reportée dans la littérature. Ainsi, cette expérience met en avant les performances (sensibilité et spécificité) de l'extraction par DHS, par rapport à la SPME, qui est la technique la plus utilisée pour l'analyse des tubes Getxent jusqu'à présent (exemples chapitre 1). Finalement, pour extraire le maximum de COVs, la combinaison des deux techniques pourrait être une solution intéressante, si le nombre d'échantillons prélevés est suffisant pour réaliser deux analyses en parallèle. Une autre solution pourrait être l'utilisation de la technique DHS avec une combinaison de différents types d'adsorbants.

# Partie 2 : Comparaison d'une sélection de 5 dispositifs de prélèvement de l'odeur corporelle, pertinents pour l'analyse par olfaction canine et par GC-MS

L'un des objectifs de ces travaux de thèse est d'approfondir nos connaissances sur les capacités de prélèvement des matériaux utilisés pour l'olfaction canine. Il s'agit de comparer les matériaux existants afin de sélectionner les plus performants en termes de sensibilité, de sélectivité, les plus pratiques sur le terrain, et les moins coûteux. La revue de la littérature (chapitre 1) souligne la grande diversité des supports de prélèvements existants, tant pour l'analyse par GC-MS, que pour l'analyse par olfaction canine. En prenant en compte les résultats présentés dans les différentes publications étudiées, 5 dispositifs de prélèvement de l'odeur corporelle sont sélectionnés pour l'étude et décrits dans cette partie (la compresse médicale stérile en coton, le tube Getxent<sup>®</sup> (Biodesiv), le tube Sorbstar<sup>®</sup> (Action Europe), le Twister (Gerstel), et le Polydiméthylsiloxane (PDMS) sous forme de patch).

### 2.1 Matériels et méthodes

## 2.1.1 Dispositifs de prélèvements

#### Matériaux à base de PDMS

Le PDMS est un polymère apolaire adapté au prélèvement des composés volatils issus du corps humain, avec notamment plusieurs exemples d'applications (chapitre 1) démontrant la détection par TD-GC-MS de faibles quantités de COVs (50 - 200 pg) [41,43]. Pour rappel, ce polymère est commercialisé sous différentes formes : tubes ou feuilles de différentes dimensions. Les feuilles de PDMS (d'épaisseur de 0,5 à 0,6 mm), au format A4, sont peu coûteuses (≈ 40 €), et peuvent être découpées sous forme de patchs à déposer directement sur la peau.

En l'occurrence, pour cette étude, des feuilles de PDMS commandées au format A4, d'une épaisseur de 0,5 mm (Shielding-Solutions, Angleterre) sont découpées (à l'aide d'une paire de ciseaux) sur mesure sous forme de patch de 0,5 mm d'épaisseur x 25 mm de longueur x 4 mm de largeur, Figure 12. Ces dimensions sont choisies pour être compatibles avec le diamètre et la longueur des tubes utilisés pour la thermodésorption

(TDU Gerstel), permettant l'analyse des patchs par TD-GC-ToF-MS avec la même méthode d'injection que celle utilisée pour les Twisters et les tubes Sorbstar. Chaque patch possède une masse de 35 mg (± 5 mg).



Figure 12 : Illustration d'un patch PDMS (découpé au laboratoire) tenu avec une pince

Il existe des matériaux à base de PDMS comme le Twister (Gerstel), commercialisé (≈ 50 €/unité) pour réaliser des extractions par la technique de SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction). Les Twisters sont des dispositifs réutilisables après reconditionnement selon les recommandations du fournisseur (conditionnement thermique entre 250°C et 270°C, pendant 1 h à 2 h, sous flux d'azote ou d'hélium (conditionneur TC2, Gerstel)). Pour cette étude, des Twister de 1 cm, avec un film PDMS d'une épaisseur de 1 mm (63 µL de phase PDMS) sont utilisés.

Les deux supports à base de PDMS : patch découpé sur mesure et Twister (Gerstel) sont inclus dans cette étude, afin d'obtenir un comparatif entre un support expérimental, et un support commercialisé prêt à l'emploi.

## Matériaux polymères commerciaux utilisés pour l'olfaction canine

Les tubes Getxent sont décrits dans la partie précédente (Partie 1, section 1.1.1) Ces dispositifs ont déjà été analysés instrumentalement (par SPME GC-MS), notamment pour étudier leur capacité à piéger et relarguer les COVs émis par les explosifs [31].

Dans le cadre de ces travaux de thèse, il est intéressant d'étudier la capacité de ces supports à adsorber et relarguer les COVs de la sueur humaine.

Les tubes Sorbstar (présentés dans le chapitre 1) sont, pour rappel, notamment utilisés par la gendarmerie nationale pour le prélèvement d'odeurs corporelles pour la reconnaissance d'individus [44]. Les tubes sont conditionnés à l'unité dans des vials de 2 mL en verre. Ils sont composés d'un polymère apolaire dont la densité est de 1,12 g/cm<sup>3</sup>. Les tubes mesurent 2 cm de longueur et 2 mm de diamètre, Figure 13. Ces dispositifs sont préconditionnés par le fournisseur et à usage unique.



Figure 13 : Illustration d'un tube Sorbstar (Action Europe) tenu avec une pince

#### Compresse médicale en coton

La compresse médicale est choisie pour cette étude car il s'agit un matériau économique et très utilisé dans les études cliniques par GC-MS et par olfaction canine (exemples dans le chapitre 1).

Pour savoir quel type de compresse choisir pour prélever les COVs de la sueur, un comparatif d'une dizaine de compresses de différentes marques et composition : fibres de coton à 100 %, d'un mélange de rayonne (viscose)/polyester/coton, d'un mélange de polypropylène/laine, ou encore d'un mélange de viscose/polyester/cellulose, est rapporté dans un brevet [45]. Les compresses stériles 100 % en fibres de coton (hydrophiles) sont recommandées dans ces travaux [45] pour le prélèvement de la sueur, c'est pourquoi ce type de compresse a été sélectionné pour notre étude.

Par ailleurs, selon une étude américaine dans le domaine de la police scientifique (*Forensics*), l'épaisseur de la compresse (nombre de plis) est un facteur influençant l'absorption des COVs : la capacité d'absorption augmente avec le nombre de plis [46]. Les compresses médicales utilisées pour notre étude sont en coton et de dimensions 5 x 5 cm, 4 plis (Tetra Médical<sup>®</sup>, France), stérilisées et conditionnées par paquet de 5 unités. La masse d'une compresse est de 300 mg +/-10 mg.

## 2.1.2 Analyse par GC-ToF-MS

L'analyse par GC-ToF-MS est réalisée avec la méthode décrite précédemment dans la Partie 1, section 1.1.4. Les Twisters, les tubes Sorbstar et les patchs PDMS sont traités par thermodésorption directe (TD). Les compresses médicales et les tubes Getxent ne sont pas compatibles avec le système de thermodésorption (TDU, Gerstel). En effet, ces matériaux ont des dimensions trop grandes pour être insérés dans les tubes de thermodésorption, et ne peuvent pas être chauffés à hautes températures sans être dégradés. Pour analyser les COVs prélevés sur ces supports, une extraction par la technique de DHS est réalisée, avec cette fois un système automatisé (module DHS, Gerstel).

Dispositif	Méthode d'analyse	Paramètres d'extraction	Injection
Sorbstar	Thermodésorption		La température initiale du TDU est de 40°C (0,1 min), puis augmente de 60°C/min
Twister	Directe (TD) - GC-ToF- MS	/	jusqu'à 250°C (maintenue 10 min). La température du
Patch PDMS			CIS est de - 10°C, puis augmente de 12°C/s jusqu'à 250°C (5min)
Compresse en coton	Extraction par Dynamic	Trapping à 80°C, volume d'azote de 1500 mL, à 50 mL/min, avec une agitation à 500 rpm. La phase adsorbante utilisée est le Tenax Ta (60 mg). La	
Tube Getxent	Headspace (DHS) - GC-       température de la trappe et         ToF-MS       de 20°C.         Pour les compresses, une       étape de séchage des         tubes adsorbants avec 500       mL d'azote à 50 mL/min         est ajoutée       est ajoutée		Méthode décrite dans la Partie 1, section 1.1.2

#### Tableau 2 : Méthode d'analyse des dispositifs et paramètres analytiques

#### 2.1.3 Conditionnement des dispositifs de prélèvement

Les tubes Getxent et Sorbstar sont vendus déjà préconditionnés, et à usage unique. C'est pourquoi ces deux dispositifs ne sont pas abordés dans cette partie. Le conditionnement des patchs PDMS et des compresses médicales fait l'objet d'un développement particulier mené durant cette étude.

#### Twister PDMS

Les Twisters en PDMS sont conditionnés selon les recommandations du fournisseur pendant 1 h à 250 °C sous flux d'azote. Cette méthode de conditionnement nécessite un équipement spécifique (TC2, Gerstel) pour chauffer le PDMS à 250 °C dans une

atmosphère inerte (sous flux d'un gaz inerte, tels que l'hélium ou l'azote). Le PDMS est en effet un polymère qui se dégrade à des températures > 100 °C en présence d'oxygène.

### Patch en PDMS

Un patch PDMS est d'abord analysé par TD-GC-ToF-MS sans conditionnement. Le chromatogramme obtenu est illustré en haut de la Figure 15 (A). Le PDMS relargue des composés volatils (siloxanes, phtalates, et COVs non identifiés) en quantité suffisante pour observer une saturation de détecteur, rendant le chromatogramme non interprétable. L'analyse montre ainsi que le patch en PDMS (découpé sur mesure au laboratoire) ne peut pas être utilisé sans pré-conditionnement.

Deux protocoles de conditionnement du PDMS sous forme de patch sont rapportés dans la littérature [43,47], et consistent en deux étapes : un conditionnement par solvants (exemples : vortex 90 min dans du méthanol puis vortex 90 min dans une solution aqueuse 5% Decon [47], ou uniquement dans une solution aqueuse 5 % Decon [47], ou uniquement dans une solution aqueuse 5 % Decon [43]), suivi d'un conditionnement thermique (exemples : sous flux d'azote de 50°C (rampe de 10°C/min) à 200°C pendant 120 min [47], ou dans un four sous vide (< 1 mbar) pendant 15 h à 180°C [43]).

Dans cette étude, pour commencer, deux injections sont réalisées avec deux patchs PDMS : l'un conditionné par immersion dans 1 mL d'éthanol (99%) dans un vial de 1,5 mL pendant 12 h aux ultrasons, et le second conditionné thermiquement sous flux d'azote à 250°C pendant 2 h (conditionneur TC2, Gerstel). Le conditionnement thermique permet d'éliminer les larges pics observés lors de l'injection du patch non conditionné, mais il reste cependant des pics de siloxanes. Ces derniers sont moins intenses, ou non détectés, sur le chromatogramme du patch conditionné par solvant. Cependant, le conditionnement par solvant n'est pas idéal car on observe encore des pics saturés en fin de chromatogramme, conduisant à une augmentation de la ligne de base du chromatogramme.

Le conditionnement thermique est également utilisé pour conditionner les Twister en PDMS, car il s'agit d'une technique efficace, mais il n'est pas conseillé de dépasser 2

h de chauffe à 250°C, pour ne pas dégrader le PDMS (recommandations fournisseur). En revanche, le conditionnement par solvant peut être optimisé. En effet, les composés volatils relargués par le PDMS migrent dans le solvant jusqu'à atteindre un équilibre phase PDMS/solvant. Afin de déterminer si un renouvellement du solvant est pertinent, un protocole de conditionnement avec plusieurs cycles de nettoyage est expérimenté.

Cinq cycles de conditionnement sont alors réalisés pour obtenir une courbe d'épuisement : le patch PDMS est immergé entièrement dans 1 mL de solvant dans un vial de 1,5 mL, mis au bain ultrasons pendant 30 min. Le solvant est ensuite renouvelé, avant de démarrer le cycle de 30 min suivant aux ultrasons. Le protocole est réalisé avec 3 solvants, sélectionnés car non toxiques : éthanol (99%), acétone (99%) et acétate d'éthyle (99%). On observe des résultats similaires avec l'éthanol ou l'acétone. L'acétate d'éthyle n'est pas sélectionné car des impuretés provenant du solvant sont identifiés sur les chromatogrammes. Avec l'éthanol ou l'acétone, une diminution de l'intensité des pics des siloxanes majoritaires est observée entre le 1<sup>er</sup> et le 4<sup>ème</sup> cycle de nettoyage, Figure 14.



Figure 14 : Courbe d'épuisement représentant la somme des surfaces de pic des 10 siloxanes majoritaires relargués par les patch PDMS, en fonction du nombre de cycles de conditionnement dans l'éthanol au bain ultrasons

Le conditionnement des patchs PDMS est alors réalisé aux ultrasons dans 4 x 1 mL d'éthanol, par cycles de 30 min aux ultrasons. Le chromatogramme d'un patch conditionné avec ce protocole est présenté, Figure 15 (B).



Figure 15 : Chromatogrammes (TIC) d'un patch en PDMS non conditionné (A) en haut, et d'un patch conditionné aux ultrasons dans 4 x 1 mL d'éthanol, en bas (B)

Sur le chromatogramme, Figure 15 (B), on observe un pic saturé d'éthanol. De plus, l'injecteur CIS (équipé d'un insert en Tenax TA) est contaminé, car des pics intenses de solvant sont visibles sur les chromatogrammes d'échantillons blancs (tube vide) analysés par la suite. Pour résoudre ce problème, le protocole est complété par un rinçage du patch quelques secondes par immersion dans un bécher d'eau distillée, un séchage avec un mouchoir absorbant (Kimtech Science), et une étape finale de conditionnement thermique sous flux d'azote pendant 1 h à 250 °C (TC2, Gerstel), permettant d'éliminer l'excès de solvant adsorbé par le PDMS.

#### Compresses médicales

L'analyse préliminaire des compresses neuves non conditionnées permet d'identifier les principaux composés relargués : 1,2-Ethanediol (éthylène glycol), dodécane, octanal, nonanal, décanal, 1-butanol, et 1-dodecanol. A l'exception de l'éthylène glycol, les COVs identifiés sont des composés typiquement retrouvés dans la sueur humaine (notamment identifiés dans la partie précédente de cette étude). De plus, l'octanal est l'un des constituant du mélange étalon de sueur. Le pré-conditionnement des compresses est donc important pour éliminer ces contaminations.

Les compresses sont introduites entières dans des vials en verre de 20 mL remplis entièrement d'éthanol absolu anhydre RPE (20 mL). Les vials sont ensuite mis aux ultrasons pendant 30 min. Puis, les compresses sont retirées du vial à l'aide d'une pince et mises à sécher dans une étuve à 80 °C pendant 12 h.

La Figure 16 permet de visualiser l'effet du conditionnement, avec en haut le chromatogramme d'une compresse non conditionnée, et en bas une compresse analysée après conditionnement. Une diminution significative du bruit de fond est observée après conditionnement, et les pics majoritaires correspondants à l'éthylène glycol, aux aldéhydes (octanal, nonanal, décanal) ne sont plus détectés. Les pics de siloxanes et d'éthanol identifiés sur les chromatogrammes correspondent à des contaminations du système et ne proviennent pas des compresses.



Figure 16 : Chromatogrammes (TIC) d'une compresse analysée avant conditionnement (A), en haut, et après conditionnement (B), en bas.

La méthode de pré-conditionnement développée est simple, nécessite peu de matériel, et présente l'avantage de ne pas nécessiter de solvants toxiques et/ou polluants.

## 2.1.4 Solution étalon de sueur

Afin de réaliser une évaluation comparative des 5 dispositifs en fonction de leur efficacité à prélever des quantités de COVs connues, dans des conditions standardisées en s'affranchissant de la variabilité biologique de la sueur, une solution étalon de sueur est préparée.

## Matrice modèle (composés non volatils)

Une matrice modèle de sueur est préparée avec 10 mL d'eau distillée, dans lesquels sont ajoutés 9 mg de chlorure de sodium (NaCl, Sigma/S9888-25G), afin d'obtenir une concentration en sel proche de la sueur réelle (0,9 g/L); et 1 % d'huile minérale (Sigma/330779), afin de mimer le sébum.

### Formulation de la solution étalon de sueur (COVs)

Une sélection de 22 COVs est réalisée pour cette étude, Tableau 3. Parmi les composés sélectionnés, 8 COVs sont notamment identifiés par DHS et/ou SPME GC-ToF-MS dans les échantillons de sueur axillaire étudiés dans la partie précédente : le 5-Hepten-2-one, 6-methyl- (Sulcatone), l'acide butanoïque (acide butyrique), l'acide hexanoïque, l'acide 3-méthylbutanoïque (acide isovalérique), l'acide propanoïque (acide propionique), l'hexadécane, l'octanal et le tridécane. Leur origine possible dans la sueur est indiquée dans le Tableau 1.

Les 14 autres molécules sont des composés typiquement retrouvés dans la sueur selon la littérature :

- Les acides heptanoïque et isobutyrique, pouvant provenir de la biotransformation des acides gras à longue chaine (C14-C30) présents dans le sébum [45].
- Le dimethyl disulfide, qui est un métabolite secondaire, pouvant être d'origine exogène, marqueur de la consommation d'aliments riches en protéines ou en légumes comme l'ail ou l'oignon [48].

- Le 3-méthyl-3-sulfanylhexan-1-ol, ou 3-mercapto-3-méthylhexan-1-ol, qui est également connu sous le nom commun de Transpirol. Il s'agit de l'un des COVs responsable de l'odeur soufré typique de la transpiration axillaire [13,49–51], avec un seuil de perception olfactif très bas (0,002 ng/L d'air) [48].
- De même, l'acide (R/S) 3-hydroxy-3-méthylhexanoïque (odeur épicée, au seuil de 0,2 ng/L d'air) [48] et l'acide insaturé (E/Z) 3-méthylhex-2-enoïque (odeur de transpiration, au seuil de 0,1 ng/L d'air) [48], sont des métabolites bactériens propres à la sueur apocrine axillaire.
- Les alcools (1-octen-3-ol, 1-hexanol, et le 1-decanol), pouvant être issus du métabolisme des hydrocarbures [11], ou d'origine exogène (source HMDB).
- Le 2-nonanone, pouvant être issu du métabolisme de l'intestin ou du foie, lors des processus de détoxification de l'organisme [11], ou d'origine exogène (source HMDB).
- Le trans-2-nonenal, étant produit par la dégradation oxydative de certains acides gras monoinsaturés du sébum (acide palmitoléique et acide transvaccénique) [52].
- Enfin, le 5-hydroxyméthylfurfural, le limonène et le méthyl octanoate, considérés comme exogènes (alimentation, environnement) (source HMDB)

Les composés choisis sont ainsi issus de différentes familles chimiques, et possèdent diverses propriétés physico-chimiques (volatilité et polarité), décrits dans le Tableau 3.

La volatilité peut se définir en fonction du point d'ébullition à une pression donnée, ou de la pression de vapeur saturante d'un composé à une température donnée. Plus la pression de vapeur saturante est élevée, plus le composé est volatil. Les valeurs de pression de vapeur saturante des composés du mélange vont de 0,001 mm Hg à 25°C (hexadécane), à 28,7 mm Hg à 25°C (diméthyle disulfide). La polarité des COVs s'étend de l'hexadécane, le plus hydrophobe avec un LogP de 8,2, au 5-hydroxyméthylfurfural, qui est le plus hydrophile avec un LogP de -0,6.

Famille chimique	Nom	Polarité (LogP)	Pression de vapeur saturante (mm Hg à 25°C)
	Acide (E/Z) -3-Methylhex-2-enoïque	2,2	Inconnue
	Acide 3-hydroxy-3-methylhexanoïque	0,5	inconnue
	Acide butyrique	0,8	1,65
Acide gras	Acide isovalérique (3-methyl-butanoïque)	1,4	0,44
Volatii	Acide Heptanoïque	2,4	0,017
	Acide Hexanoïque	1,9	0,044
	Acide propionique (propanoïque)	0,3	3,5
	Acide isobutyrique (2-methyl-propanoïque)		1,81
Alcane	Hexadecane	8,2	0,001
	Tridécane	6,7	0,081
Alecol	1-Décanol	4,6	0,009
AICOUI	1-Hexanol	2	0,93
1-Octen-3-ol		2,6	0,53
Aldábyda	5-Hydroxyméthylfurfural	- 0,6	0,005
Aldenyde	Octanal	3,5	2,07
	Trans-2-Nonenal	3,1	0,26
Cátana	2-Nonanone	3,1	0,65
Ester	6-Methyl-5-hepten-2-one	1,9	1,28
	Méthyl octanoate	3,3	0,52
Terpène	Limonène	4,6	1,98
Thiol	3-Methyl-3-sulfanylhexan-1-ol (Transpirol)	1,7	inconnu
	Diméthyle disulfide	1,8	28,7

Tableau 3 : Nom des composés organiques volatils (COVs) sélectionnées pour l'étude, famille chimique, valeursthéoriques des LogP des pressions de vapeur saturante des COVs

Les références et la pureté des étalons analytiques utilisés sont reportés dans le Tableau 4. Pour les composés sous forme de poudre (2-nonanone, méthyl octanoate, 5-hydroxyméthylfurfural), selon la quantité disponible pour chaque composé, une masse m (en mg) est pesée dans un vial en verre de 2 mL, puis 1 mL d'éthanol (99%) est ajouté dans le vial. La masse de composé pesée (minimum 4 mg  $\pm$  0,5 mg) permet d'obtenir la concentration de la solution étalon en mg/mL.

Pour les autres étalons analytiques, sous forme liquide, 100  $\mu$ L (± 5  $\mu$ L) sont pipetés dans un vial de 2 mL en verre, et pesés. Ensuite, 900  $\mu$ L d'éthanol sont ajoutés dans

le vial pour obtenir un volume total de 1 mL. La masse d'étalon analytique pesée permet d'obtenir la concentration de la solution stock en mg/mL. Les solutions stocks sont conservées à -20°C pendant la durée de l'étude.

Un automate de préparation (MPS, Gerstel), muni d'une seringue de 10  $\mu$ L est utilisé pour ajouter les solutions stocks, dans 1 mL de matrice modèle. Les solutions stocks sont sorties du congélateur et utilisées immédiatement (vial froid) afin de limiter la perte de composés par évaporation. Cependant, le portoir d'échantillon n'est pas équipé d'un système de réfrigération.

CAS	Nom usuel	Formule brute	Référence	Pureté	
624-92-0	Diméthyldisulfure	$C_2H_6S_2$	Sigma/68986	≥ 98 %	
5989-27-5	Limonène	$C_{10}H_{16}$	Sigma/ 62118-1ML	≥ 99 %	
124-13-0	Octanal	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	Sigma/52466-1ML	≥ 98 %	
629-50-5	Tridécane	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	Sigma/91490-5ML	≥ 99 %	
110-93-0	6-methyl-5-hepten-2-one	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	Sigma/M48805-5ML	≥ 99 %	
111-27-3	1-Hexanol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O	Sigma/73117-1ML-F	≥ 99 %	
821-55-6	2-Nonanone	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	Sigma/108731-5G	≥ 99 %	
111-11-5	Méthyl octanoate	C9H18O2	Sigma/06934-50MG	≥ 99 %	
3391-86-4	1-Octen-3-ol	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	Sigma/90963-1ML	≥ 99 %	
79-09-4	Acide propionique*	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>			
79-31-2	Acide isobutyrique*	$C_4H_8O_2$			
107-92-6	Acide butyrique*	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Supelco/CRM46975	> 00 %	
503-74-2	Acide isovalérique*	C5H10O2		2 33 70	
142-62-1	Acide Hexanoïque*	$C_6H_{12}O_2$			
111-14-8	Acide Heptanoïque*	C7H14O2			
112-30-1	1-Decanol	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O	Sigma/442539	≥ 99 %	
544-76-3	Hexadécane	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	Sigma/H6703-100ML	≥ 99 %	
67-47-0	5-Hydroxyméthylfurfural	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Sigma/W501808-1G-K	≥ 99 %	
18829-56-6	Trans-2-nonenal	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O	Sigma/07592-1ML	≥ 95 %	
inconnu	Acide 3-Hydroxy-3-	C-H44O2	Synthétisé par un	Non	
meonna	methylhexanoïque	07111403	collaborateur (Nicolas	mesurée	
inconnu	Acide (E/7)-3-methylbey-2-enoïque	$C_7H_{12}O_2$	Baldovini, Université	Non	
meonna	Acide (E/Z)-o-methymex Z-enoique	0/11/202	Côte d'Azur, équipe	mesurée	
207064 22 4	2 Méthyl 2 sylfenylhover 4 st		Simulations, Parfums,	Non	
307964-23-4	૩-ivietnyi-૩-suifanyinexan-1-ol	U7H16US	Evolution)	mesurée	

Tableau 4 : Numéro CAS, nom usuel, formule brute, référence et pureté des étalons analytique utilisés ; \*Ces composés font partie d'un mélange commercial (Volatile Free Acid Mix, référence CRM46975, Supelco)

Les volumes de solutions stocks et les concentrations des COVs dans la matrice modèle sont indiquées dans le Tableau 5. La somme des volumes de solutions ajoutées dans 1 mL de matrice modèle est de 0,218 mL, ce qui correspond à un volume total de 1,218 mL. La solution est ensuite homogénéisée au vortex pendant 2 min. Après l'ajout des 22 COVs, le pH de la solution artificielle est compris entre 4 et 5.

Nom	Concentration solution stock	Volume solution	Conc. mélange étalons (g/L)	Quantité dans 5 μL (ng)
	(g/L)	Stock (µL)	0.05	050
I rans-2-nonenal	10	6	0,05	256
Diméthyldisulfure	16	6	0,08	384
Limonène	16	6	0,08	404
Méthyl octanoate	10	10	0,08	411
2-Nonanone	10	10	0,08	415
5-Hydroxyméthylfurfural	17	6	0,08	416
3-methyl-3-sulfanylhexan-1-ol	7	15	0,09	431
6-methyl-5-hepten-2-one	8	13	0,09	438
Octanal	4	30	0,09	443
1-Octen-3-ol	8	13	0,09	443
Tridécane	8	13	0,09	448
Hexadécane	7	15	0,09	450
Acide propionique	8	15	0,09	462
3-Hydroxy-3-methylhexanoic acid	4	30	0,1	480
Acide isobutyrique	9	15	0,1	536
Acide butyrique	9	15	0,1	536
1-Hexanol	15	10	0,1	599
1-Decanol	15	10	0,1	620
Acide isovalérique	10	15	0,1	622
(E/Z)-3-methylhex-2-enoic acid	16	10	0,1	636
Acide Hexanoïque	12	15	0,1	708
Acide Heptanoïque	13	15	0,2	794

#### Conservation de la solution étalon de sueur

Afin d'étudier la stabilité des COVs dans la matrice modèle, la solution étalon de sueur (1 mL) est conservée à – 20 °C pendant 9 jours. Lors de ces essais, le laboratoire de Twistaroma n'était pas encore équipé d'un système pour réaliser les extractions par DHS. La technique d'extraction par SPME a alors été choisie pour étudier la stabilité

du mélange. L'échantillon (5 μL) est incubé dans un vial en verre de 20 mL pendant 20 min à 40°C, puis l'extraction par SPME (fibre DVB/CAR/PDMS) est réalisée à 40 °C pendant 30 min. La fibre SPME est ensuite désorbée thermiquement dans l'injecteur du système GC pendant 5 min à 250°C.

Cinq  $\mu$ L de la solution sont prélevés du même vial et analysés en triplicat le jour de la préparation, après 24 h, après 48 h, après 6 jours, et après 9 jours de stockage. Entre chaque injection, le bouchon du vial avec septum en PTFE, percé par la seringue lors du prélèvement des 5  $\mu$ L, est remplacé. Cela permet de limiter les pertes de COVs par évaporation, et également de réduire la contamination de la solution par le septum en PTFE, susceptible de relarguer des composés volatils après avoir été percé.

L'analyse est réalisée par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (GC-ToF-MS) avec un système GC 7890B (Agilent) et un spectromètre de masse Pegasus BT-ToF (Leco). Une colonne de séparation polaire (DB-WAX, Agilent) est utilisée, de dimensions : 30 m x 0,25 mm (diamètre interne) x 0,25  $\mu$ m (épaisseur phase). Le spectromètre de masse est utilisé en mode full scan de 30 à 400 m/z.

L'analyse de la solution à t<sub>0</sub> permet la détection de 21 COVs du mélange. Le 5hydroxyméthylfurfural n'est pas détecté (rapport signal/bruit < 3). Il s'agit du COV le plus hydrophile de mélange, étant extrait préférentiellement par des polymères de type polaire (exemple : fibre en polyacrylate [53,54]). Il est possible que sa non-détection soit liée à la sélectivité de la fibre SPME utilisée ici.



Figure 17 : Chromatogramme TIC de la solution analysée à t0 par SPME GC-ToF-MS. Les composés sont numérotés et annotés dans le Tableau 6.

## Les composés identifiés sur les chromatogrammes sont reportés dans le Tableau 6.

Numéro (Figure 17)	TR (min)	Nom		
1	8,11	Diméthyldisulfure		
2	11,28	Limonène		
3	14,15	Octanal		
4	14,41	Tridécane		
5	15,49	5-Hepten-2-one, 6-methyl-		
6	15,89	1-Hexanol		
7	16,88	Méthyl octanoate		
8	16,91	2-Nonanone		
9	18,51	1-Octen-3-ol		
10	20,49	Acide propanoïque		
11	20,67	Trans-2-Nonenal		
12	21,25	Acide isobutyrique (acide 2-methyl-propanoïque)		
13	21,89	Acide 3-hydroxy-3-methyl-hexanoïque		
14	22,33	Hexadecane		
15	22,69	Acide butanoïque		
16	23,69	Acide isovalérique (acide 3-methyl butanoïque)		
17	26,03	1-Décanol		
18	27,62	Acide hexanoïque		
19	28,49	3-Méthyl-3-sulfanylhexan-1-ol		
20	29,88	Acide heptanoïque		
21	30,61	Acide E-3-methylhex-2-enoïque		

#### Tableau 6 : Numérotation et temps de rétention (TR) en min des COVs du mélange de sueur modèle

Les pics non annotés sur le chromatogramme, Figure 17, sont des contaminations pouvant provenir de l'eau distillée utilisée, de l'éthanol ou encore de l'huile minérale (composés de la matrice modèle).

Les surfaces de pics des 21 composés identifiés, obtenues lors des analyses au cours du temps sont comparées par ANOVA (t<sub>0</sub> vs t<sub>+1 jour</sub> vs t<sub>+2 jours</sub> vs t<sub>+6 jours</sub> vs t<sub>+9 jours</sub>). Pour 20 composés sur 21, nous n'observons pas de différences significatives (p-value > 0,05) de la durée de conservation à -20°C.

Le 3-méthyl-3-sulfanylhexan-1-ol fait exception avec une perte de signal de 96 % (± 2%), dès 24 h de conservation. Le composé n'est plus détecté lors de l'analyse à t + 48 h, Figure 18.



Figure 18 : Représentation graphique des surfaces de pics du 3-méthyl-3-sulfanylhexan-1-ol de t0 à t+9 jours. Les points bleus correspondent à la moyenne des surfaces de pics, et les points gris aux valeurs individuelles ; les barres d'erreurs correspondent aux coefficients de variation (n=3).

L'une des causes possibles envisagées pouvant expliquer cette observation est l'oxydation du thiol dans la matrice modèle aqueuse [55,56]. Cependant, selon la littérature, la congélation à - 20°C inhibe l'oxydation de ce composé précis en solution dans l'eau ultrapure [56]. Cette dégradation oxydative pourrait alors être survenue le lendemain de la première injection du mélange étalon, après remise à température ambiante de la solution (sur le portoir d'échantillon, avant l'injection). En effet, une recalibration du spectromètre de masse (environ 20 min), puis une analyse d'un échantillon blanc (50 min) sont effectués avant l'injection de la solution étalon. Cet intervalle de temps de plus d'une heure est potentiellement la cause de la dégradation rapide du thiol.

Pour les analyses quantitatives (préparation de gammes d'étalonnage), la stabilité des composés dans le mélange étalon est cruciale afin d'assurer la reproductibilité des analyses. Afin d'éviter les interactions entre le thiol et la matrice modèle (eau salée), il est alors décidé de préparer le mélange de COVs dans l'éthanol (99 %). Le mélange étalon est préparé extemporanément, pour chaque jour d'analyse.

### 2.1.5 Détermination des limites instrumentales

Afin de déterminer les limites de quantification instrumentales des composés (LQ instrument), la solution de sueur étalon (dans l'éthanol), ainsi que des dilutions de la solution dans l'éthanol (Tableau 7), sont analysées par DHS-GC-ToF-MS. Pour l'extraction de la solution étalon par DHS : 5  $\mu$ L de la solution sont prélevés à l'aide d'une seringue de 10  $\mu$ L par l'automate de préparation (MPS, Gerstel) et injectés dans un vial de 10 mL en verre, Figure 19. L'extraction est ensuite réalisée avec les paramètres décrits dans la section 2.1.2.



Figure 19 : Schéma du protocole pour l'analyse de la solution étalon de sueur et des solutions diluées, analysées par DHS GC-ToF-MS

Les paramètres appliqués pour l'analyse par GC-ToF-MS (programme du four, colonne séparative, acquisition du spectre de masse) sont décrits précédemment dans la partie 1.1.4.

## Préparation des dilutions de la solution étalon

La solution étalon de sueur, nommée S0, est diluée en cascade avec un facteur de dilution de 10 à chaque dilution (100  $\mu$ L dans 900  $\mu$ L d'éthanol) afin d'obtenir les solutions de travail S1 à S4.

Tableau 7 : Concentrations en ng/µL des COVs dans les solutions diluées du mélange étalon, nommées solution	ns
S0 à S4	

		Cond	centration en	ng/µL	
Nom	Solution S0	Dilution 1 – Solution S1	Dilution 2 - Solution S2	Dilution 3 - Solution S3	Dilution 4 - Solution S4
Trans-2-nonenal	51	5	0,5	0,05	0,005
Diméthyldisulfure	77	8	0,8	0,08	0,008
Limonène	81	8	0,8	0,08	0,008
Méthyl octanoate	82	8	0,8	0,08	0,008
2-Nonanone	83	8	0,8	0,08	0,008
5-Hydroxyméthylfurfural	83	8	0,8	0,08	0,008
3-methyl-3-sulfanylhexan-1-ol	86	9	0,9	0,09	0,009
6-methyl-5-hepten-2-one	88	9	0,9	0,09	0,009
Octanal	89	9	0,9	0,09	0,009
1-Octen-3-ol	89	9	0,9	0,09	0,009
Tridécane	90	9	0,9	0,09	0,009
Hexadécane	90	9	0,9	0,09	0,009
Acide propionique	92	9	0,9	0,09	0,009
3-Hydroxy-3-methylhexanoic acid	96	10	1,0	0,10	0,010
Acide isobutyrique	107	11	1,1	0,11	0,011
Acide butyrique	107	11	1,1	0,11	0,011
1-Hexanol	120	12	1,2	0,12	0,012
1-Decanol	124	12	1,2	0,12	0,012
Acide isovalérique	124	12	1,2	0,12	0,012
(E/Z)-3-methylhex-2-enoic acid	127	13	1,3	0,13	0,013
Acide Hexanoïque	142	14	1,4	0,14	0,014
Acide Heptanoïque	159	16	1,6	0,16	0,016

## Estimation des limites de quantification (LQ instrument)

La limite de quantification instrumentale est estimée par la concentration à partir de laquelle un rapport signal/bruit  $\geq$  10 est obtenu. Le rapport signal/bruit est déterminé à l'aide du logiciel MassHunter Quantitative Analysis (Agilent), avec des segments de ligne de base sélectionnés automatiquement. Le bruit est calculé par une valeur efficace (la racine carrée de la moyenne des carrés, ou *RMS - Root-Mean-Square*) du bruit de la ligne de base pendant l'intervalle de temps choisi.

N°	Nom	LQ instrument (DHS-GC-ToF-MS)
1	Diméthyldisulfure	4 ng
2	Limonène	0,4 ng
3	Octanal	0,04 ng
4	Tridécane	0,04 ng
5	5-Hepten-2-one, 6-methyl- (Sulcatone)	0,04 ng
6	1-Hexanol	0,06 ng
7	Méthyl octanoate	0,04 ng
8	2-Nonanone	0,04 ng
9	1-Octen-3-ol	0,04 ng
10	Acide propanoïque	0,05 ng
11	Trans-2-Nonenal	26 ng
12	Acide isobutyrique (acide 2-méthyl-propanoïque)	54 ng
13	3-Hydroxy-3-methyl-hexanoic acid	0,05 ng
14	Hexadecane	45 ng
15	Acide butanoïque (ou butyrique)	54 ng
16	Acide isovalérique (acide 3-méthyl-butanoïque)	6 ng
17	1-Décanol	6 ng
18	Acide hexanoïque	0,7 ng
19	3-Methyl-3-sulfanylhexan-1-ol	Non détecté par DHS* (LQ > 1,8 μg)
20	Acide heptanoïque	0,8 ng
21	E-3-Methyl-2-hexenoic acid	64 ng
22	5-Hydroxyméthylfurfural	0,04 ng

 Tableau 8 : Limites de quantification (LQs) instrumentales. Les COVs sont classés par ordre d'élution (temps de rétention croissants)

\*Le 3-méthyl-3-sulfanylhexan-1-ol (3-MSH) est détecté par SPME (niveau à 431 ng) en solution aqueuse lors de l'étude de la stabilité du mélange étalon. Cependant il se dégrade en quelques heures à température ambiante, rendant son utilisation imprécise pour une étude quantitative.

Comme décrit précédemment, nous savons que cette molécule est perceptible olfactivement par l'humain à l'état de trace (0,002 ng/L d'air), mais la concentration du 3-MSH dans la sueur réelle, n'est pas connue précisément. Dans la littérature, une publication de Dallo & *al [56]*, indique que le 3-MSH est quantifiable par SPME avec une fibre en polyacrylate (polaire) immergée dans une solution aqueuse saline (NaCl 30%) d'un volume de 20 mL, avec une LQ de 0,25 ng/mL (équivalent à 5 ng). Cependant la méthode développée dans cette étude n'a pas été appliquée à des échantillons réels de sueur [56].

## 2.1.6 Mise en contact des COVs avec les dispositifs de prélèvement

Les dispositifs sont dopés avec une quantité précise de COVs mis en contact dans un vial en verre de 10 mL fermé, pendant 1 h à 30°C. Cette température est choisie pour se rapprocher de la température à la surface de la peau chez l'humain (30 à 31°C). L'effet du volume du contenant n'a pas été étudié, c'est pourquoi les COVs sont quantifiés en quantité en ng, et non en concentrations.

Le protocole, schématisé sur la Figure 20, et comprend les étapes suivantes :

- Le dispositif est introduit individuellement dans un vial en verre de 20 mL, fermé avec un bouchon métallique à visser et un septum en PTFE.

- A l'aide d'un robot de préparation (MPS, Gerstel, équipé d'une seringue de 10  $\mu$ L), un volume de 5, 10, 20 ou 50  $\mu$ L de solution étalon est injecté dans le vial, à travers le septum en PTFE.

- Après 1 h d'incubation des dispositifs avec les COVs à 30°C (température choisie pour s'approcher de la température à la surface de la peau), le dispositif est retiré du vial à l'aide d'une pince.

- Le dispositif est ensuite introduit, soit dans un tube de thermodésorption pour l'analyse par TD-GC-ToF-MS, soit dans un nouveau vial de 10 mL propre, pour l'analyse par DHS-GC-ToF-MS.



Figure 20 : Protocole mis en œuvre pour mimer un prélèvement de composés volatils par les dispositifs de capture d'odeurs à l'aide de la solution de sueur étalon

Un petit volume de solution étalon (de 5 à 50  $\mu$ L) injecté dans le vial de 20 mL est volontairement choisi, afin que ce volume soit négligeable par rapport au volume du vial (20 mL). De cette manière, le ratio  $\beta$  correspondant à l'équation :

Ratio 
$$\beta = \frac{Volume \ phase \ gazeuse}{Volume \ solution}$$
, est élevé.

Plus ce ratio est grand, plus l'on peut s'approcher de la vaporisation totale de la solution [57]. L'objectif est ici de mimer un prélèvement de composés volatils de la sueur sous forme gazeuse.

#### 2.1.7 Quantification relative

Les dispositifs sont dopés à 7 niveaux d'étalonnage compris entre 0,03 ng et 3,2  $\mu$ g, Tableau 9. Pour ce faire, 5, 10 ou 20  $\mu$ L des solutions étalons, S0 à S4, sont introduits dans des vials fermés de 10 mL en verre contenant les dispositifs, à l'aide d'un robot de préparation (MPS, Gerstel), équipé d'une seringue de 10  $\mu$ L. Les échantillons sont préparés en triplicat.

	Niveau	Niveau	Niveau	Niveau	Niveau	Niveau	Niveau
	7	6	5	4	3	2	1
Solution étalon	S0	S0	S0	S1	S2	S3	S4
Volume de solution ajoutée	20 µL	10 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
Nom	Quantité de COV en ng						
Trans-2-nonenal	1025	512	256	26	3	0,3	0,03
Diméthyldisulfure	1537	768	384	38	4	0,4	0,04
Limonène	1616	808	404	40	4	0,4	0,04
Méthyl octanoate	1642	821	411	41	4	0,4	0,04
2-Nonanone	1658	829	415	41	4	0,4	0,04
5-Hydroxyméthylfurfural	1665	833	416	42	4	0,4	0,04
3-methyl-3-sulfanylhexan-1-ol	1724	862	431	43	4	0,4	0,04
6-methyl-5-hepten-2-one	1750	875	438	44	4	0,4	0,04
1-Octen-3-ol	1772	886	443	44	4	0,4	0,04
Octanal	1773	887	443	44	4	0,4	0,04
Tridécane	1793	897	448	45	4	0,4	0,04
Hexadécane	1798	899	450	45	4	0,4	0,04
Acide propionique	1847	924	462	46	5	0,5	0,05
3-Hydroxy-3-methylhexanoic acid	1921	961	480	48	5	0,5	0,05
Acide isobutyrique	2143	1071	536	54	5	0,5	0,05
Acide butyrique	2143	1071	536	54	5	0,5	0,05
1-Hexanol	2397	1199	599	60	6	0,6	0,06
1-Decanol	2479	1240	620	62	6	0,6	0,06
Acide isovalérique	2488	1244	622	62	6	0,6	0,06
(E/Z)-3-methylhex-2-enoic acid	2545	1273	636	64	6	0,6	0,06
Acide Hexanoïque	2833	1416	708	71	7	0,7	0,07
Acide Heptanoïque	3177	1589	794	79	8	0,8	0,08

## Tableau 9 : Volumes des solutions étalons ajoutés dans chaque vial et quantités de COVs correspondantesmises en contact avec les dispositifs

Dans le but d'obtenir des droites d'étalonnages réalisées avec les échantillons dopés, comprenant au minimum 4 niveaux compris dans la gamme de linéarité, 5 niveaux supplémentaires (n = 2) sont ajoutés par la suite. La solution étalon S0 (décrite partie 2.1.5) est diluée dans l'éthanol (99%), à l'aide du robot de préparation (équipé de seringues de 1 mL et de 100  $\mu$ L), dans des vials de 1,5 mL en verre, avec des facteurs de dilutions croissants : par 2 (500  $\mu$ L de la solution S0 dans 500  $\mu$ L d'éthanol), par 4 (250  $\mu$ L de la solution S0 dans 750  $\mu$ L d'éthanol), par 8 (125  $\mu$ L de la solution S0 dans 875  $\mu$ L d'éthanol), et par 16,6 (60  $\mu$ L de la solution S0 dans 940  $\mu$ L d'éthanol).

Les solutions diluées résultantes sont utilisées pour doper (avec 50 µL) les dispositifs de prélèvements. Les quantités de COVs mis en contact avec les dispositifs de prélèvement correspondant à ces 5 niveaux d'étalonnages supplémentaires sont indiquées dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Concentrations des dilutions par	<sup>.</sup> 2, 4, 8 et 16,6 de la	a solution étalon en	ng/µL pour l'ajout d	le 5
niveaux de gamme supplémentaires ; et qua	ntités de COVs corr	respondant à ces 5 i	niveaux d'étalonnag	ges

		Facteur de dilution								
			4	8	16,6	Quantités (ng) dans 50 µL				
Conc. Nom S0 (ng/μL)		Concentration des dilutions (ng/µL)			n des /μL)	Niveau 5	Niveau 4	Niveau 3	Niveau 2	Niveau 1
Trans-2-nonenal	51	26	13	6	3	2550	1275	638	319	154
Méthyl octanoate	82	41	21	10	5	4100	2050	1025	513	247
Limonène	81	41	20	10	5	4050	2025	1013	506	244
Diméthyldisulfure	77	39	19	10	5	3850	1925	963	481	232
5-Hydroxyméthylfurfural	83	42	21	10	5	4150	2075	1038	519	250
2-Nonanone	83	42	21	10	5	4150	2075	1038	519	250
Tridécane	90	45	23	11	5	4500	2250	1125	563	271
Octanal	89	45	22	11	5	4450	2225	1113	556	268
Hexadécane	90	45	23	11	5	4500	2250	1125	563	271
Acide propionique	92	46	23	12	6	4600	2300	1150	575	277
6-methyl-5-hepten-2-one	88	44	22	11	5	4400	2200	1100	550	265
3-methyl-3- sulfanylhexan-1-ol	86	43	22	11	5	4300	2150	1075	538	259
1-Octen-3-ol	89	45	22	11	5	4450	2225	1113	556	268
3-Hydroxy-3- methylhexanoic acid	96	48	24	12	6	4800	2400	1200	600	289
Acide isobutyrique	107	54	27	13	6	5350	2675	1338	669	322
Acide butyrique	107	54	27	13	6	5350	2675	1338	669	322
Acide isovalérique	124	62	31	16	7	6200	3100	1550	775	373
1-Hexanol	120	60	30	15	7	6000	3000	1500	750	361
1-Decanol	124	62	31	16	7	6200	3100	1550	775	373
Acide (E/Z)-3-methylhex- 2-enoïque	127	64	32	16	8	6350	3175	1588	794	383
Acide Hexanoïque	142	71	36	18	9	7100	3550	1775	888	428
Acide Heptanoïque	159	80	40	20	10	7950	3975	1988	994	479

### 2.1.8 Traitement des données

Les pics détectés sur les chromatogrammes sont intégrés à l'aide du logiciel MassHunter (Agilent). Pour chaque COV, l'un des 3 ions majoritaires du spectre de masse est utilisé pour la quantification (ion « *Quantifier* »). L'ion *Quantifier* choisi pour chaque composé est indiqué par une police en gras dans le Tableau 11. Les intensités relatives des deux autres ions majoritaires (ions « *Qualifier* ») permettent de confirmer l'identification du composé. Les ratios des intensités des ions *Qualifier/Quantifier* sont vérifiés avec une erreur tolérée de  $\pm 20$  %.

Composí	Oursetifier	Ovelifier 4	Ovelifier 2	Ratio	Ratio
Compose	Quantifier	Quaimer 1	Quaimer 2	1 (%)	2 (%)
3-Methyl-3-sulfanylhexan-1-ol	55,04	71,06	97,11	35	30
Diméthyldisulfure	93,99	78,97	46.99	162	178
Limonène	93,07	68,06	38,99	204	213
Methyl octanoate	74,06	87,07	55,01	42	630
5-Hepten-2-one, 6-methyl	69,06	55,04	58,03	167	52
2-Nonanone	58,03	87,03	74,03	49	100
Octanal	57,03	69,06	84,09	46	52
Trans-2-nonenal	55,04	84,07	70,04	19	106
5-Hydroxymethylfurfural	126,03	69,02	97,07	151	218
1-Hexanol	55,03	69,05	83,07	72	18
1-Octen-3-ol	57,02	72,00	85,00	7	5
1-Decanol	56,06	70,06	84,08	85	33
Tridecane	85,10	57,06	71,08	440	196
Hexadecane	57,08	85,09	71,10	31	57
E-3-methylhex-2-enoic acid	100,09	113,06	128,08	61	95
3-Hydroxy-3-methylhexanoic acid	85,10	99,11	113,13	26	15
Propanoic acid	59,06	45,01	74,06	581	16
Isobutyric acid (Propanoic acid, 2-methyl-)	73,05	43,06	88,05	316	18
Butyric acid	60,01	42,03	73,02	250	40
Isovaleric acid (Butanoic acid, 3-methyl)	60,01	41,02	87,05	80	20
Hexanoic acid	60,01	73,02	41,02	38	34
Heptanoic acid	60,01	73,02	87,05	56	10

Tableau 11 : lons majoritaires pour chaque COV ; les ions utilisés pour la quantification (ions « Quantifier ») sont indiqués par une police en gras. Le ratio 1 correspond au rapport de l'ion Qualifier 1 / ion Quantifier, et le ratio 2 correspond au rapport de l'ion Qualifier 2 / ion Quantifier ; les ratios sont exprimés en %.

#### 2.2 Résultats et discussion

#### 2.2.1 Prélèvement des COVs par les dispositifs

#### Patchs PDMS

Avec les patchs en PDMS, cinq COVs (méthyl octanoate, octanal, 5-hepten-2-one, 6methyl, 1-octen-3-ol et 2-nonanone) sont détectés. Les coefficients de détermination des droites d'étalonnage sont inférieurs à 0,95, et ne permettent pas de déterminer les limites de quantification des COVs. Ces essais mettent en évidence un manque de répétabilité au niveau du prélèvement des COVs avec les patchs PDMS. La droite d'étalonnage obtenue pour l'octanal est représentée en exemple, Figure 21.



Figure 21 : Droite d'étalonnage de l'octanal, avec les patchs PDMS analysés par TD-GC-ToF-MS

En prenant en compte le rapport signal/bruit, les composés sont détectés instrumentalement, cependant les patchs PDMS dopés à différents niveaux d'étalonnage ne permettent pas d'obtenir des réponses (surfaces de pics) corrélées linéairement avec la quantité de COVs mis en contact.

#### **Twisters PDMS**

Les limites de quantification, Tableau 12, de 15 COVs (tridécane, trans-2-nonenal, limonène, hexadécane, octanal, 2-nonanone, méthyl octanoate, 5-hydroxyméthylfurfural, 5-hepten-2-one, 6-methyl, 1-hexanol, 1-octen-3-ol, acide 3-hydroxy-3-methylhexanoïque, acide butyrique, 1-décanol, et l'acide E-3-methylhex-2-enoïque) ont pu être déterminées avec les Twisters. Des droites d'étalonnages avec un coefficient de détermination linéaire  $R^2 \ge 0,99$  sont obtenues pour le trans-2-nonenal, le 6-methyl-5-hepten-2-one, le 1-hexanol, l'hexadécane, le 1-décanol, le tridécane, le méthyl octanoate, et le 2-nonanone.

Pour les 7 autres composés, les résultats obtenus présentent une variabilité plus importante ; 5-hydroxymétylfurfural ( $R^2 = 0.967$ ), acide E-3-methylhex-2-enoïque ( $R^2 = 0.986$ ), octanal ( $R^2 = 0.971$ ), acide butyrique ( $R^2 = 0.970$ ), 1-octen-3-ol ( $R^2 = 0.984$ ), acide isovalérique ( $R^2 = 0.985$ ), et limonène (0.986). La droite du trans-2-nonenal est représentée en exemple, Figure 22.



Figure 22 : Droite d'étalonnage du trans-2-nonenal avec les Twisters par TD-GC-ToF-MS

#### Tubes Sorbstar

Les limites de quantification, Tableau 12, de 9 COVs (limonène, 2-nonanone, méthyl octanoate, 5-hepten-2-one, 6-methyl, trans-2-nonenal, octanal, 1-hexanol, hexadécane et tridécane) ont pu être déterminées avec les tubes Sorbstar.

Des coefficients de détermination linéaire  $R^2 \ge 0,99$  sont obtenues pour le limonène, le 1-hexanol et l'acide 3-méthylhex-2-enoïque. Une erreur plus élevée est observée pour le 6-methyl-5-hepten-2-one, ( $R^2 = 0,979$ ), le tridécane ( $R^2 = 0.963$ ), le méthyl octanoate ( $R^2 = 0,973$ ), le trans-2-nonenal ( $R^2 = 0,980$ ), l'octanal ( $R^2 = 0.986$ ), et le 2nonanone (0.987). La droite du 6-methyl-5-hepten-2-one est représentée en exemple, Figure 23.



Figure 23 : Droite d'étalonnage du 6-methyl-5-hepten-2-one avec les tubes Sorbstar par TD-GC-ToF-MS

#### Compresses médicales

L'analyse des compresses permet la détection et la détermination des LQs, Tableau 12, de 15 COVs (limonène, méthyl octanoate, 2-nonanone, 6-méthyl-5hepten-2-one, trans-2-nonenal, octanal, 1-hexanol, tridécane, hexadécane, acide 3-hydroxy-3-methylhexanoïque, acide isovalérique, acide butyrique, 1-décanol, 1-octen-3-ol, acide E-3-méthyl-2-hexenoïque) par DHS GC-ToF-MS. Des coefficients de détermination linéaire  $R^2 \ge 0,99$  sont obtenus pour le tridécane, trans-2-nonenal, l'acide butyrique, l'octanal, le 6-methyl-5-hepten-2-one et le 1-Hexanol. Pour les 9 autres COVs, les
valeurs de R<sup>2</sup>, sont comprises entre 0,978 (méthyl octanoate) et 0,989 (1-octen-3-one). La droite du 1-décanol est représentée en exemple, Figure 24.



Figure 24 : Droite d'étalonnage du 1-décanol pour les compresses par DHS-GC-ToF-MS

#### Tubes Getxent

Enfin, l'analyse des tubes Getxent permet la détection et la détermination des LQs, Tableau 12, de 14 COVs (tridécane, méthyl octanoate, 2-nonanone, octanal, limonène, 1-octen-3-ol, 5-hepten-2-one, 6-methyl, 1-décanol, 1-hexanol, acide E-3-méthyl-2hexenoïque, hexadécane, trans-2-nonenal, 5-hydroxyméthylfurfural, acide 3-hydroxy-3-methylhexanoïque) par DHS GC-ToF-MS. Des coefficients de détermination linéaire  $R^2 \ge 0,99$  sont obtenus pour tous les COVs, sauf pour l'héxadécane ( $R^2 = 0.978$ ), le trans-2-nonenal ( $R^2 = 0.984$ ), et le 1-décanol ( $R^2 = 0.989$ ). La droite du trans-2-nonenal est représentée en exemple, Figure 25.



Figure 25 : Droite d'étalonnage du trans-2-nonenal pour les tubes Getxent par DHS-GC-ToF-MS

#### 2.2.3 Comparaison des performances des dispositifs

Le Tableau 12 présente les limites de quantification des COVs détectés avec les différents systèmes de prélèvement (Twisters, tubes Sorbstar, compresses médicales, tubes Getxent) et les coefficients de détermination R<sup>2</sup> des droites d'étalonnage.

Tableau 12 : Limites de quantification (LQs) en ng des COVs du mélange artificiel, avec les différents systèmes de prélèvement, et coefficients de détermination R<sup>2</sup> des droites d'étalonnages ; NA : Non Applicable ; les LQs sont en gras dans le tableau pour permettre une meilleure lisibilité ; LD signifie Limites de Détection

	Patch PDMS	Twister		Sorbstar		Compresse		Getxent	
Nom	LD ng	LQ ng	LQ ng R <sup>2</sup>		R <sup>2</sup>	LQ ng	R <sup>2</sup>	LQ ng	R <sup>2</sup>
3-méthyl-3-sulfanylhexan-1-ol	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Diméthyldisulfure	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Limonène	NA	0,04	0,986	0,04	0,998	244	0,984	4	0,999
Méthyl octanoate	4	4	0,998	4	0,973	512	0,978	4	0,991
6-methyl-5-hepten-2-one	4	4	0,992	4	0,962	265	0,999	4	0,998
2-Nonanone	4	0,4	0,999	0,4	0,987	518	0,978	4	0,99
Octanal	4	0,4	0,971	4	0,986	268	0,994	4	0,998
Trans-2-nonenal	NA 0,03		0,991	3	0,977	319	0,991	319	0,984
5-Hydroxyméthylfurfural	NA	4	0,967	NA	NA	NA	NA	518	0,999
1-Hexanol	NA	0,06	0,992	361	0,994	361	0,999	0,6	0,999
1-Octen-3-ol	4	4	0,984	NA	NA	256	0,989	4	0,991
1-Decanol	NA	62	0,993	NA	NA	62	0,988	62	0,989
Tridécane	NA	0,04	0,994	45	0,963	271	0,991	271	0,997
Hexadécane	NA	45	0,992	NA	NA	450	0,982	1798	0,978
(E/Z)-3-methylhex-2-enoic acid	NA	0,06	0,986	0,06	0,998	383	0,984	6	0,999
3-Hydroxy-3-methylhexanoic acid	NA	NA	NA	NA	NA	289	0,988	NA	NA
Acide propionique	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Acide isobutyrique	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Acide butyrique	NA	322	0,97	NA	NA	54	0,993	54	0,998
Acide isovalérique	NA	62	0,985	NA	NA	374	0,981	NA	NA
Acide Hexanoïque	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Acide Heptanoïque	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Les résultats de l'analyse quantitative mettent en évidence des différences de sensibilité selon les dispositifs de prélèvement utilisés. Le limonène est détecté à 0,04 ng avec le Twister et le tube Sorbstar, et à 4 ng avec le tube Getxent, contre 244 ng avec la compresse médicale en coton. Le méthyl octanoate est détecté à des quantités de l'ordre de 4 ng avec le Twister, le Sorbstar et le tube Getxent. En revanche, avec la compresse, la limite de quantification est de 512 ng. De même pour les cétones, des limites de quantifications inférieures sont obtenues avec les polymères adsorbants

(entre 0,4 et 4 ng), par rapport aux limites déterminées avec les compresses (518 ng pour le 2-nonanone, et 265 ng pour le 6-méthyl-5-Hepten-2-one).

Dans le cas des aldéhydes, les résultats sont plus variables : le 5hydroxyméthylfurfural n'est détecté qu'avec le Twister (4 ng) et le tube Getxent (518 ng). Le trans-2-nonenal et l'octanal sont détectés avec des limites de 0,03 et 0,4 ng avec le Twister, à 3 et 4 ng avec le Sorbstar, et respectivement à 319 et 4 ng avec le tube Getxent et 268 ng avec la compresse.

Pour les alcools, les limites de quantifications déterminées sont comprises entre 0,06 et 361 ng avec le Twister, le tube Getxent et la compresse. En revanche, avec le tube Sorbstar, deux composés (1-décanol et 1-octen-3-ol) ne sont pas détectés. Dans le cas des alcanes, les limites de détections obtenues avec le Twister sont très basses (0,04 ng), et variables avec les autres dispositifs, de 45 ng à 1,8 µg.

#### 2.3 Conclusion

Les capacités des 5 dispositifs de prélèvement à piéger les COVs sous forme gazeuse, pendant 1 h, dans un incubateur à 30°C et sans agitation, est étudiée. L'ordre de grandeur des quantités de COVs ( $10^{-1}$  ng – 1 µg) mis en contact avec les dispositifs correspond à des concentrations pouvant être retrouvées dans la sueur réelle. Le protocole réalisé présente des limites : les quantités de COVs prélevées par les dispositifs sont notamment estimées de manière relative afin de comparer les dispositifs. Les éléments de validation de la méthode, tels que la reproductibilité et la précision, nécessaires pour la quantification absolue, n'ont pas été étudiés.

Les résultats de cette expérience mettent en avant les différences de sensibilité et de sélectivité des 5 dispositifs observées dans des conditions particulières. Le Tableau 13 regroupe les « scores » de sensibilité et de spécificité attribués à chacun des matériaux. La sensibilité est évaluée en fonction des limites de détection (cas du patch PDMS) ou de quantification estimées à partir de l'analyse des échantillons dopés avec le mélange d'étalons analytiques à différents niveaux de concentration. La sélectivité,

est évaluée en fonction du nombre de COVs détectés (en %) sur les 22 molécules décrites précédemment. Le nombre de COVs détectés par famille chimique est présenté, afin de mieux visualiser la sélectivité relative de chacun des matériaux.

Dispositifs	Patch PDMS	Twister	Getxent	Compresse	Sorbstar
Sensibilité	-	+++	+++	+	++
Sélectivité	23%	68%	64%	68%	41%
Familles chimiques		٨	lombre COVs	prélevés	<u>.</u>
Acide gras volatil	0	3	2	4	1
Alcane	0	2	2	2	1
Alcool	1	3	3	3	1
Aldéhyde	1	3	3	2	2
Cétone	2	2	2	2	2
Ester	1	1	1	1	1
Terpène	0	1	1	1	1
Thiol	0	0	0	0	0

	Tableau 13	Bilan com	paratif des	performances	de sensibilité	et sélectivité	des 5 d	ispositifs	étudiés
--	------------	-----------	-------------	--------------	----------------	----------------	---------	------------	---------

Au niveau de la sensibilité, le Twister et le tube Getxent se démarquent des autres supports de prélèvement. Le patch en PDMS expérimental, conçu pour cette étude, n'est malheureusement pas fiable pour l'instant (manque de répétabilité), et peu sensible.

Le protocole de prélèvement et d'analyse utilisant les compresses en coton, ne permet pas d'obtenir des résultats aussi sensibles que ceux obtenus avec les matériaux polymères. Cependant, le prélèvement des COVs avec les compresses présente l'avantage de ne pas être sélectif. En effet, concernant les caractéristiques de sélectivité, le Twister, la compresse et le tube Getxent permettent le prélèvement de plus de la moitié des COVs du mélange étalon.

La compresse médicale se démarque des autres matériaux par sa capacité à piéger les acides gras volatils. Cette observation s'explique par le caractère hydrophile des fibres de coton qui composent la compresse, permettant l'absorption de ces composés au caractère hydrophile. Le PDMS est plus adapté pour prélever les composés hydrophobes, avec des valeurs de LogP  $\geq$  3 (tels que les alcanes, le limonène, le 1-décanol, l'octanal, le trans-2-nonenal, le 2-nonanone, et le méthyl octanoate).

Le tube Sorbstar ne prélève pas spécifiquement un type de COV, il semble exhaustif mais manque de sensibilité en comparaison avec les autres matériaux polymères (Twister et tube Getxent).

Aucun des dispositifs testés ne permet la détection des thiols présents dans le mélange étalon. Des matériaux spécifiques pour le prélèvement de ce type de composés nécessitent d'être développés. Ce sujet est abordé dans la partie suivante.

# Partie 3 : Développement de supports nanostructurés pour le prélèvement spécifique des thiols volatils

Les thiols volatils ne sont pas aisément détectés par GC-MS en raison de leur forte réactivité (oxydation ou formation de ponts disulfures) et de leur faible concentration dans la sueur. Les résultats de la précédente étude (partie 2), ne montrent qu'aucun des 5 dispositifs de prélèvement testés ne permet la détection de deux thiols retrouvés dans la sueur (3-methyl-3-sulfanylhexan-1-ol et diméthyldisulfure), dans des quantités de l'ordre du µg. Les composés soufrés sont pourtant très intéressants d'un point de vue biologique, ils sont impliqués dans de nombreux processus métaboliques [58]. Pour répondre à cette problématique, le développement de supports de prélèvement spécifiques aux thiols a alors été envisagé.

Les dispositifs innovants conçus dans ce contexte, consistent en une base de PDMS (Twister ou patch), fonctionnalisé en surface avec des nanoparticules d'or (AuNP). Les nanoparticules d'or ont en effet la capacité de former des liaisons fortes (proche des liaisons covalentes), avec les atomes de soufre [59]. L'adsorption de thiols en solution aqueuse est réalisée avec les dispositifs nanostructurés, et deux méthodes de désorption sont expérimentées : la désorption thermique et la désorption liquide par échange de ligands avec du DTT (Dithiothréitol).

#### 3.1 Matériels et méthodes

# 3.1.1 Préparation de la solution de nanoparticules d'or (AuNPs)

Les nanoparticules d'or (AuNPs) sont synthétisées par l'équipe du laboratoire CITHEFOR à Nancy, selon une méthode interne par réduction chimique, adapté du protocole de Turkevich, décrite dans les travaux de Berthou *& al.* [60].

#### 3.1.2 Préparation des dispositifs nanostructurés

La préparation des dispositifs est réalisée par une méthode de trempage (ou *dip-coating*), qui consiste à tremper le matériau de base (ici le dispositif en PDMS) dans une suspension colloïdale de nanoparticules [61]. Plus précisément, la préparation est

réalisée en deux étapes : la fonctionnalisation, puis la nanostructuration, illustrées Figure 26. La fonctionnalisation du PDMS est une étape nécessaire pour pouvoir immobiliser ensuite les nanoparticules sur la surface du polymère.

Le dispositif en PDMS est immergé dans une solution piranha, composée d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98%)), et d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)), avec un ratio de 3 : 2 (V/V). Lors de cette étape, des groupements hydroxyles se fixent au PDMS. Le dispositif est ensuite immergé dans une solution basique (KOH, 2 M), afin de déprotoner les groupements hydroxyles et d'obtenir une surface anionique. Puis le dispositif est immergé dans une solution de polyéthylènimine branché (PEI) (2 mM). Il s'agit d'un polymère cationique, permettant l'ajout de charges positives à la surface du PDMS.



Figure 26 : Schéma du protocole de préparation des supports en PDMS nanostructurés

Les nanoparticules d'or utilisées ici sont chargées négativement et stabilisées par des ions citrates en solution. De ce fait, la surface cationique (PEI) du PDMS fonctionnalisé permet le greffage des nanoparticules par des interactions ioniques.

L'immobilisation des nanoparticules sur le dispositif est réalisée en immergeant le PDMS fonctionnalisé pendant 10 min dans une solution AuNPs citrates (0,1 M). Le dispositif est ensuite immergé pendant 3 min dans une solution tampon Tris/HCI (0,15

M) à pH = 7,4. Enfin, un rinçage du dispositif est réalisé dans de l'eau ultrapure. Le dispositif est déposé sur du papier absorbant pour le sécher. Chaque cycle de nanostructuration correspond au dépôt d'une couche de nanoparticules. On observe une coloration plus foncée du PDMS au fur et à mesure du processus, illustré Figure 27.





Afin de quantifier les nanoparticules d'or immobilisées sur les dispositifs, une analyse par spectroscopie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES) est réalisée par l'équipe du laboratoire CITHEFOR. Cette méthode d'analyse est destructive, c'est pourquoi elle n'a été réalisée que pour les premiers dispositifs nanostructurés (patchs PDMS, n = 3). L'objectif est d'avoir un ordre de grandeur de la quantité de nanoparticules immobilisées sur le PDMS avec ce protocole.

Le patch PDMS nanostructuré est d'abord traité par digestion, en l'introduisant dans un récipient fermé contenant de l'eau régale (HNO<sub>3</sub>, 3 HCI), et soumis à une irradiation par micro-ondes (*Microwave Digestion System Multiwave Go*, Anton Paar) à 180 °C. L'élévation de la température et de la pression dans ce milieu acide accélère la décomposition thermique de l'échantillon, favorisant la solubilisation des métaux. Il s'agit d'une méthode standard utilisée au laboratoire pour solubiliser les métaux en présence de matrices organiques. Une fois les métaux solubilisés, l'échantillon peut être analysé par ICP-OES. L'échantillon est ionisé au sein d'une torche à plasma, excitant les atomes des métaux présents. Lorsqu'ils reviennent à leur état fondamental, les atomes des métaux émettent des photons correspondant à des longueurs d'onde distinctes. La lumière émise est mesurée, et son intensité est comparée à celle d'un étalon de concentration connue.

Une concentration de 1,7 x 10<sup>13</sup> AuNP/cm<sup>2</sup> de PDMS, avec un coefficient de variation de 8,9 % est déterminée pour les 3 patchs nanostructurés avec 30 couches de AuNPs. A titre de comparaison, une concentration de 3,8 x 10<sup>13</sup> AuNP/cm<sup>2</sup> sur des membranes en cellulose nanostructurés avec la même approche (30 couches de nanoparticules), est obtenue dans les travaux de Berthou & *al* [62]. La quantité de AuNPs immobilisée ici sur le patch PDMS est cohérente par rapport aux précédentes études (même ordre de grandeur de 10<sup>13</sup> AuNP/cm<sup>2</sup> support).

#### 3.1.3 Analyse des échantillons

Les analyses sont réalisées par GC-MS/SCD (Sulfur Chemiluminescence Detection) avec le système GC 7890B (Agilent) couplé à un spectromètre de masse simple quadrupôle (Agilent) et un détecteur SCD (Agilent). Le détecteur SCD est spécifique aux composés soufrés et fonctionne par chimiluminescence. Le gaz vecteur (hélium) sortant de la colonne chromatographique conduit les analytes dans un brûleur à 800°C, au sein duquel un flux d'air permet d'oxyder les composés soufrés en monoxyde de soufre, eau et dioxyde de carbone. Ces produits de combustion passent ensuite dans une cellule dans laquelle le monoxyde de soufre va réagir avec de l'ozone pour former du dioxyde de soufre sous forme excitée (SO<sub>2</sub>\*). Enfin, le SO<sub>2</sub>\* formé revient à un état stable en émettant de la lumière entre 300 et 400 nm, détectée par un tube photomultiplicateur.

# 3.1.4 Adsorption des thiols

Cinq mL d'une solution d'eau distillée/éthanol (5%) sont introduits dans un vial de 20 mL en verre ambré, contenant le support de prélèvement (patch ou Twister), qui est alors entièrement immergé dans la solution. Le vial est ensuite fermé avec un bouchon métallique à visser et un septum en PTFE. Les solutions étalons de thiols sont ajoutées (2  $\mu$ L) à travers le septum à l'aide d'un robot de préparation (MPS, Gerstel), équipé d'une seringue de 10  $\mu$ L. Deux thiols en solution dans l'éthanol (99,9%, HPLC grade) sont ajoutés : le 3-mercaptophexyl acétate (3-MHA) (étalon analytique Sigma-Aldrich, pureté  $\geq$  98 %) à 8,5 g/L, et le 1-octanethiol (étalon analytique Sigma-Aldrich, pureté  $\geq$  98,5 %), à 8,4 g/L, Tableau 14.

Nom	Concentration solution étalon (g/L)	Volume étalon ajouté par vial dans 5 mL (μL)	Volume final par vial (µL)	Concentration finale (mg/L)
3-Mercepatohexyl acétate (3-MHA)	8,5	2	5004	3,4
1-Octanethiol	8,4	2		3,4

Tableau 14 : Concentration des thiols en solution

La concentration des deux thiols dans chaque vial est de 3,4 mg/L, équivalent à une quantité de 1,7 x  $10^4$  ng par vial. Finalement, dans chaque vial contenant le dispositif immergé dans 5 mL de solution, 96 nmol de 3-MHA et 115 nmol de 1-octanethiol sont mis en contact avec les dispositifs, Tableau 15.

#### Tableau 15 : Quantité thiol en nmol dans chaque vial

Nom	Quantité par vial (ng)	Masse Molaire (g/mol)	Quantité par vial (nmol)
3-MHA	1,7 E+04	176,3	96
1-octanethiol	1,7 E+04	146,3	115

L'extraction est réalisée immédiatement à température ambiante pendant 10 min, sans agitation pour les patchs PDMS, et sur un agitateur magnétique à 800 rpm avec les Twisters.

# 3.1.5 Désorption liquide (échange de ligands)

Six vials contenant 15,4 mg ± 0,5 mg de DTT (DL-Dithiothréitol) (Sigma-Aldrich, pureté  $\geq$  98%) et 1 mL d'éthanol (99% HPLC Grade) sont préparés, afin d'avoir une quantité de 100 µmol de DTT par vial. Le support de prélèvement est immergé dans le mL de solution de DTT précédemment décrite et mis sous agitation aux ultrasons pendant 10 min. Le dispositif est ensuite retiré du vial. La solution de DTT est analysée par injection liquide (1 µL) par GC-ToF-MS. Six désorptions liquides sont réalisées successivement sur chaque dispositif et les solutions sont analysées à la suite, Figure 28.



Figure 28 : Schéma représentant le protocole de désorption liquide des supports nanostructurés

# 3.1.6 Désorption thermique (TD)

Les Twisters ou patchs PDMS sont désorbés thermiquement dans une unité de désorption thermique (TDU, Gerstel) à 280°C pendant 15 min. Cette température est choisie car le PDMS se dégrade au-dessus 280°C. Les COVs sont piégés à froid à – 10 °C dans un injecteur à température programmable (CIS, Gerstel). L'injecteur est ensuite chauffé avec une rampe de 12°C/s jusqu'à 300 °C température finale maintenue pendant 5 min. Les échantillons désorbés thermiquement sont analysés par GC-MS/SCD.

#### 3.2 Résultats

#### 3.2.1 Essais de désorption liquide

On remarque que les thiols sont désorbés au bout de 3 à 4 bains successifs dans la solution de DTT, ce qui équivaut à environ 300 à 400 µmol de DTT, Figure 29.



Figure 29 : Courbe d'épuisement représentant les surfaces de pics du 1-octanethiol et du 3-MHA en fonction du nombre de bains dans le DTT, utilisé comme solvant de désorption.

Le protocole est ensuite reproduit en remplaçant la solution de DTT par de l'éthanol à 99%, afin de déterminer si la désorption des thiols en solution est liée au DTT ou à l'éthanol. On obtient des surfaces de pics du même ordre de grandeur dans la solution de DTT et dans l'éthanol, Figure 30.



Figure 30 : Graphique représentant les surfaces de pics du 1-octanethiol et du 3-MHA en fonction du nombre de cycles de désorptions (de 1 à 3 bains) en fonction du solvant utilisé (DTT dans l'éthanol ou éthanol).

Le protocole est alors reproduit en triplicat pour le 3-MHA avec des patchs PDMS classiques et des patchs nanostructurés. Les valeurs de surfaces de pics obtenues avec les patchs en PDMS classique, comparées par *t-test* aux valeurs des surfaces de pics obtenues avec les patchs nanostructurés, sont supérieures (p-value = 0,008), Figure 31.



Figure 31 : Graphique représentant les surfaces de pics du 3-MHA dans la solution de DTT analysée après la première désorption des patchs nanostructurés et des patchs classiques. Les barres d'erreur correspondent aux coefficients de variation des moyennes des surfaces de pics (n=3).

Ces résultats montrent que les thiols détectés sont les molécules adsorbées par le PDMS, et non par les nanoparticules, puisque la désorption se fait préférentiellement dans l'éthanol, et non par échange de ligands dans le DTT.

Il est possible que les thiols soient adsorbés à la fois par le PDMS et par les nanoparticules, mais que seuls les composés adsorbés par le PDMS soient détectés, car les liaisons AuNPs-thiols ne sont rompues par la désorption liquide. Une autre méthode de désorption est envisagée : la désorption thermique.

#### 3.2.2 Essais de thermodésorption (TD)

L'expérience est réalisée avec des Twisters nanostructurés et des Twisters classiques (n = 3). Un échantillon liquide huileux industriel, riche en composés soufrés est utilisé pour cette expérience. L'échantillon (100  $\mu$ L) est dilué dans une solution d'eau distillée à 5% d'éthanol (200 mL).

L'analyse des échantillons en triplicat par GC-MS/SCD permet la détection et l'identification de 5 composés soufrés (méthanethiol, diméthyldisulfure, sulfure d'hydrogène, dioctyldisulfure et 3-méthyl-thiophène). Les réponses obtenues (surfaces de pics des composés) sont comparables entre les Twisters classiques et les Twisters nanostructurés, Figure 32.



Figure 32: Graphique représentant les surfaces de pics des thiols identifiés par TD GC-MS/SCD avec les Twisters classiques et les Twisters nanostructurés. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types des valeurs moyennes (n=3).

#### 3.3 Conclusion

Les résultats obtenus lors de ces essais préliminaires ne montrent pas de gain en sensibilité pour la détection des thiols volatils, en utilisant les supports nanostructurés par rapports aux supports en PDMS. Ces essais ne permettent pas de déterminer si l'adsorption des thiols par les nanoparticules a bien lieu. Dans l'hypothèse où des liaisons AuNPs-thiols seraient formées, nous ne parvenons pas à rompre ces liaisons fortes, ni par désorption liquide dans du DTT, ni par thermodésorption à 280°C.

Avec la méthode de désorption thermique, une température plus élevée (> 300°C), pourrait potentiellement permettre la rupture des liaisons AuNPs-thiol. Cependant l'expérience montre une dégradation importante du PDMS au-dessus de 300°C, rendant les chromatogrammes non interprétables. L'utilisation d'un autre type de polymère adsorbant comme support pour greffer les nanoparticules, plus résistant thermiquement, comme le Tenax TA (2,6-diphényl-p-phénylène), pourrait éventuellement répondre à cette problématique.

Par ailleurs, l'utilisation de membranes en cellulose comme celles développées par Berthou *et al [62]*, pourrait être une solution pour gagner en sensibilité dans la détection des thiols volatils par GC-MS.

Ainsi, les performances relatives d'une sélection de matériaux de prélèvement des COVs de la sueur, et les techniques d'extractions associées à ces supports, ont été abordés dans ce chapitre. En parallèle, dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons eu accès à des échantillons réels de sueur, dédiés à l'étude de la pathologie de la COVID-19, par le biais d'une collaboration avec la Fondation Hôpital Ambroise Paré, de l'Hôpital Européen de Marseille. Pour cette étude, le protocole d'échantillonnage de la sueur fut élaboré et mis en œuvre par les praticiens hospitaliers de l'équipe de l'Hôpital Européen. Les compresses médicales ont été choisies par les praticiens pour des raisons de praticité sur le terrain, car les compresses sont faciles à manipuler. De plus, elles sont économiques, et peuvent être mise en contact avec la peau sans risques pour la santé du patient.

Une fois la collecte de l'ensemble des échantillons terminée, les compresses nous ont été envoyées congelées au laboratoire de Twistaroma à Strasbourg, comme détaillé dans la suite de ce rapport. Cette étude expérimentale est présentée dans le chapitre suivant.

# Chapitre 4

# Chapitre 4 : Identification d'un profil chromatographique associé à une infection par le virus SARS-CoV-2

L'infection par le virus du SARS-CoV-2 induit chez les individus atteints, la modification de certaines voies métaboliques, engendrant des variations dans la composition des COVs émis par le corps humain. En effet, une dizaine d'études ont démontré une signature spécifique au virus du SARS-CoV-2, en analysant les COVs émis dans l'air expiré de sujets infectés [63]. Aux États-Unis, en avril 2022, dans le contexte de la crise sanitaire liée à la COVID-19, la Food and Drug Administration (FDA) a approuvé officiellement un test basé sur l'analyse des COVs dans l'air expiré [64].

La sueur est une matrice pouvant être prélevée de manière non invasive, et qui présente un risque de transmission du virus du SARS-CoV-2 plus faible que l'air expiré. En effet, la transmission du virus se fait principalement par les gouttelettes et les aérosols générés lors de la respiration, de la parole, de la toux et des procédures médicales produisant des aérosols [65]. Ainsi, l'utilisation de la sueur pour diagnostiquer une infection au SARS-CoV-2 pourrait constituer une alternative intéressante aux méthodes actuelles. Par ailleurs, les tests réalisés par des chiens de détection entraînés, démontrent la faisabilité de l'utilisation de l'odeur corporelle pour le dépistage de la COVID-19 [30].

Cependant, les biomarqueurs de la pathologie n'ont pas encore été identifiés avec certitude dans la sueur. Dans ce contexte, la Chromatographie-Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS), l'outil de référence pour la détection et l'identification de biomarqueurs volatils, est utilisée. L'objectif de cette étude est ainsi de mettre en évidence un profil chromatographique spécifique aux patients infectés par le SARS-CoV-2, par rapport à des sujets sains, basé sur l'analyse de l'odeur corporelle des individus.

# 1. Matériels et méthodes

# 1.1 Echantillons

# 1.1.1 Population étudiée

L'étude menée est réalisée en partenariat avec La Fondation Hôpital Ambroise Paré, établissement de santé privé d'intérêt collectif, situé à Marseille. L'établissement est habilité à collecter, stocker, et transférer des échantillons issus du corps humain (EICH) par la collection déclarée sous la référence DC-2022-5056, ou son renouvellement ultérieur, et en ayant déclaré une Recherche N'Impliquant pas la Personne Humaine (RNIPH), référence 22-17 et intitulée « Détection d'un profil chromatographique associé à une infection aigue par SARS Cov-2 ». La collection des échantillons est organisée et mise en œuvre par le service de la Direction de la Recherche Clinique de l'Hôpital Européen de Marseille (Dr Frédérique Retornaz).

Cent-soixante patients (101 femmes et 59 hommes) sont inclus dans cette étude, entre juin 2021 et janvier 2022. Trois groupes d'individus sont comparés : patients infectés par SARS-CoV-2 asymptomatiques (RT-PCR+) ; patients infectés par SARS-CoV-2 (RT-PCR+) symptomatiques ; et témoins sains, non infectés par SARS-COV-2 (RT-PCR-) et asymptomatiques. Ils sont répartis comme indiqué dans le Tableau 16. Les individus sont âgés de 18 à 94 ans. La tranche des sujets de 18 à 29 ans comprend 39 individus, entre 30 et 49 ans sont inclus 57 individus, entre 50 et 69 ans sont inclus 37 individus, et enfin 22 sujets ont plus de 70 ans. Une partie des sujets sont des fumeurs actifs (22,5 %), Tableau 16. Le tabagisme actif est considéré comme un facteur confondant dans cette étude car des marqueurs du tabac, issus du métabolisme des composés de la fumée de cigarette, peuvent être émis dans les fluides biologiques (air expiré, urine, sueur) [5]. Dans la sueur en particulier, l'acétaldéhyde, et des composés volatils aromatiques comme le toluène, le 3-méthylfuran, le 2,5-diméthylfuran, le 3-ethenyl pyridine, et la nicotine, sont détectés en concentrations supérieures chez les fumeurs [6].

	SARS-CoV-2 positif asymptomatique	SARS-CoV-2 positif symptomatique	Témoin sain	Total
Femmes	24	29	48	101
tabac actif	3	5	16	24
Hommes	26	21	12	59
tabac actif	4	4	4	12
Nombre total d'individus	50	50	60	160

#### Tableau 16 : Description de la population étudiée

# 1.1.2 Prélèvement des échantillons

Les échantillons de sueur ont été prélevés entre le 21 juin 2021 et le 14 janvier 2022. Les prélèvements sont réalisés à l'aide de compresses médicales non tissées non stériles Medicomp<sup>®</sup> de 7,5 x 10 cm en viscose (67%) et polyester (33%). Les individus réalisent un auto-prélèvement de sueur en frottant la compresse sur la peau pendant 2 min au niveau de l'aine. La sueur de la main de l'individu peut également avoir été absorbée par la compresse.

# 1.1.3 Stockage et préparation des échantillons

Les échantillons sont conservés à -20 °C dans des sachets Diagnobag en polyéthylène, conditionnés pour le transfert de produits infectieux de la classe 6.2, notamment les échantillons de diagnostic. Il s'agit d'emballages secondaires utilisés dans le cadre du triple emballage imposé pour toute expédition de matière potentiellement infectieuse de la classe 6.2 Catégorie B (UN3373).

Pour l'analyse, les échantillons congelés sont transférés (compresse entière) à l'aide de pinces, dans des vials en verre de 10 mL, par séries de 10 à 12 échantillons. Les échantillons décongelés ne sont plus recongelés par la suite. Le transfert des échantillons est réalisé en extérieur, afin de limiter les contaminations par les COVs de l'air environnant, et à une température comprise entre 0°C et 4°C. Cette étape est illustrée Figure 33.



Figure 33 : Photographies illustrant le transfert des échantillons des sacs Diagnobag (à droite), aux vials utilisés pour l'analyse par DHS GC-ToF-MS.

# 1.1.4 Préparation des échantillons de Contrôle Qualité Interne (CQI)

Des compresses neuves, identiques à celles utilisées pour le prélèvement des échantillons (décrites partie 1.1.2), sont dopées avec 5 µL d'un mélange d'étalons analytiques dans l'éthanol (99,9%), préparé comme décrit précédemment (chapitre 3) à l'exception du thiol 3-MHA qui n'est pas ajouté dans ce mélange, Tableau 17.

Les compresses sont introduites en entier dans les vials de 20 mL en verre à l'aide de pinces. Les vials sont ensuite fermés avec un bouchon en métal à visser et un septum en PTFE. Puis, les 5  $\mu$ L du mélange étalon sont ajoutés à l'aide d'un automate de préparation (MPS, Gerstel), muni d'une seringue de 10  $\mu$ L. Les échantillons sont incubés pendant 1 h dans une étuve à 30°C (± 1 °C), afin de s'approcher de la température à la surface de la peau. Les compresses sont ensuite retirées des vials à l'aide de pinces et introduite dans un vial de 10 mL utilisé pour l'extraction par DHS

CAS	Nom usuel	Pureté	Concentration (g/L)
107-92-6	Acide butyrique	≥ 99 %	0,109
110-93-0	6-Methyl-5-hepten-2-one	≥ 99 %	0,092
111-11-5	Méthyl octanoate	≥ 99 %	0,085
111-14-8	Acide Heptanoïque	≥ 99 %	0,162
111-27-3	1-Hexanol	≥ 99 %	0,122
112-30-1	1-Decanol	≥ 99 %	0,127
124-13-0	Octanal	≥ 98 %	0,091
142-62-1	Acide Hexanoïque	≥ 99 %	0,145
18829-56-6	Trans-2-nonenal	≥ 95 %	0,087
3391-86-4	1-Octen-3-ol	≥ 99 %	0,089
503-74-2Acide isovalérique		≥ 99 %	0,127
544-76-3	Hexadécane	≥ 99 %	0,094
5989-27-5	Limonène	≥ 99 %	0,083
624-92-0	Diméthyldisulfure	≥ 98 %	0,085
629-50-5	Tridécane	≥ 99 %	0,088
67-47-0	5-Hydroxyméthylfurfural	≥ 99 %	0,084
79-09-4	<b>79-09-4</b> Acide propionique		0,092
79-31-2	Acide isobutyrique	≥ 99 %	0,109
821-55-6	2-Nonanone	≥ 99 %	0,079
inconnu	3-Hydroxy-3-methylhexanoic acid	Non mesurée	0,049
inconnu	(E/Z)-3-methylhex-2-enoic acid	Non mesurée	0,130

Tableau 17 : Numéro CAS, nom usuel, pureté et concentrations des COVs

#### **1.2 Développement de la méthode d'extraction par Dynamic Headspace (DHS)**

Pour le développement de la méthode d'extraction des COVs par DHS, les manipulations sont réalisées dans le laboratoire de l'entreprise Twistaroma, en utilisant des compresses dopées avec le mélange étalon, comme décrit dans la partie II.1.4. L'extraction est réalisée à l'aide d'un système automatisé (module DHS, Gerstel), permettant le réglage des paramètres d'extraction, en fonction des applications, au niveau de 4 étapes, schématisées Figure 34 :

1) L'incubation, qui permet de volatiliser et concentrer les COVs dans l'espace de tête du vial. Lors de cette première étape, les paramètres pouvant être optimisés sont l'agitation, la température et la durée d'incubation.

2) La pré-purge, qui peut être appliquée pour éliminer l'excédent de solvant en balayant l'échantillon avec le gaz vecteur, mais induit une perte de COVs. Pour cette étude, afin de limiter la perte de composés d'intérêt, un faible volume de solvant (1 μL) est utilisé (lors de l'ajout des étalons internes sur les compresses, détaillé dans la partie suivante II.3.1). Ainsi, l'étape de pré-purge n'est pas nécessaire.

3) Le trapping, qui permet de piéger les COVs dans une phase adsorbante. Les paramètres pouvant être optimisés sont la température, le volume de gaz vecteur et le débit du gaz vecteur.

4) Le dry purge, qui permet d'éliminer l'humidité accumulée dans la phase adsorbante par un flux de gaz vecteur passant par un vial vide.



Figure 34 : Schéma représentant les différentes étapes de l'extraction par DHS et les paramètres pouvant être optimisés (avec le module DHS automatisé, Gerstel). La première étape est l'incubation. La seconde étape est une pré-purge pour éliminer l'excédent de solvant ; non réalisée dans cette étude. L'étape 3 est le trapping, permettant de piéger les COVs dans la phase adsorbante. L'étape 4 correspond au séchage de l'adsorbant. L'étape 5 correspond à la thermodésorption du tube adsorbant dans le système GC-MS. Les points rouges représentent les COVs piégés lors de l'étapes 3 ; les points bleus représentent les molécules d'eau ; les points verts représentent les COVs non retenus par la phase adsorbante.

# 1.2.1 Température de la trappe

La température de la trappe contenant le tube adsorbant peut également être réglée, entre 20°C et 70°C. Afin de maximiser le piégeage des COVs, la température minimale, de 20°C, est appliquée pour cette étude.

# 1.2.2 Choix des paramètres d'incubation et de trapping

La température de l'incubateur du module DHS peut être réglée à une température différente pour les étapes d'incubation et de trapping. Cependant, le temps nécessaire pour la stabilisation de la température de l'incubateur peut être relativement long (10-15 min). Pour des raisons de praticité, dans cette étude, la température d'incubation est appliquée par défaut en fonction de la température de trapping (T Incubation = T Trapping). Les effets de la température de trapping et du débit de gaz vecteur lors du trapping sont étudiés à l'aide d'un plan d'expérience (logiciel Minitab). Le gaz vecteur utilisé est l'azote (bouteille Linde, qualité 5.0). Un plan factoriel complet est réalisé en duplicata pour évaluer l'effet de ces deux facteurs. Le plan d'expérience comprend au total 10 injections.

La durée d'incubation est fixée à 5 min. Pour la température, le niveau bas est de 30°C, et le niveau haut de 80°C. Des températures plus élevées n'ont pas été expérimentées afin de ne pas détériorer les compresses. Pour le débit d'azote, le niveau bas est de 10 mL/min, et le niveau haut est de 50 mL/min, avec un volume d'azote fixe de 500 mL, ce qui correspond à une durée d'extraction comprise entre 10 et 50 min. L'étape de dry purge est réalisée à 20°C avec un volume d'azote de 500 mL à 50 mL/min.

# 1.3. Méthode d'analyse finale

# 1.3.1 Analyse par GC-ToF-MS

La Figure 35 est un schéma des étapes principales du protocole mis en œuvre. L'injection est réalisée par thermodésorption (TDU, Gerstel). La température initiale de l'unité de thermodésorption est de 40°C (1 min), puis augmente de 60°C/min jusqu'à 280°C (maintenue 10 min). Les COVs sont ensuite piégés à froid (10°C) dans un injecteur à température programmable (CIS Gerstel), puis injectés avec une rampe de 12°C/s jusqu'à 300°C (maintenue 5 min), avec un ratio de split de 1/10. L'analyse, non ciblée, est réalisée par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (GC-ToF-MS) avec un système GC 7890B (Agilent) et un spectromètre de masse Pegasus BT-ToF (Leco). Une colonne de séparation polaire (DB-WAX, Agilent) est utilisée, de dimensions : 30 m x 0,25 mm (diamètre interne) x 0,5  $\mu$ m (épaisseur phase). Le spectromètre de masse est utilisé en mode full scan de 30 à 400 m/z.



Figure 35 : Schéma du protocole analytique illustrant les étapes d'extraction par DHS, désorption thermique et injection des COVs dans le système d'analyse par GC-ToF-MS

#### 1.3.2 Extraction des COVs

Après sélection des paramètres d'extraction, la méthode est appliquée à l'analyse des échantillons réels. Deux étalons internes (1  $\mu$ L) marqués sont ajoutés avant l'extraction : linalol-D<sub>3</sub> (96,5 ng) et acide octanoïque-1<sup>13</sup>C (505 ng). Le solvant n'est pas évaporé (étape de pré purge non réalisée).

Les compresses dopées avec les étalons sont incubées dans des vials de 10 mL à 80°C pendant 5 min. L'extraction est ensuite réalisée à 80°C avec un débit d'azote de 50 mL/min pendant 10 min. Le Tenax TA (2,6-diphenylene oxide, 60 mg par tube) est utilisé comme phase adsorbante, à 20°C. Après extraction, les tubes sont purgés avec 1 000 mL d'azote à 50 mL/min afin d'éliminer l'humidité.

# 1.3.3 Intégration de blancs analytiques

Les analyses sont réalisées par séries de 10 à 12 échantillons dans un ordre aléatoire. Les échantillons sont encadrés comme suit :

- Entre chaque série, un échantillon blanc méthode (compresse neuve) dopé avec le mélange étalons (préparation partie II.1.4), et avant l'extraction, avec les étalons internes (1 μL), est injecté. Les chromatogrammes de ces échantillons sont utilisés pour identifier les artefacts à soustraire des données des échantillons réels.

- Tous les 5 échantillons, un blanc système (tube de thermodésorption vide). Les chromatogrammes de ces échantillons sont utilisés pour détecter les contaminations du système analytique (injecteur, colonne séparative, détecteur) et vérifier la stabilité de la ligne de base.

# 1.4. Pré-traitement des données

Pour commencer, les données collectées sont traitées à l'aide du logiciel MassHunter Quantitative Analysis (Agilent). Les pics détectés sont intégrés après déconvolution des chromatogrammes. Les composés détectés, identifiés ou non, sont annotés par ordre de temps de rétention croissant, entre 3,43 min et 49,68 min, du COV 1 au COV 770.

Chaque COV est considéré comme une variable indépendante, avec ses valeurs propres dans chaque échantillon. Les termes variables, valeurs et variances sont fréquemment employés dans la suite de cette partie, c'est pourquoi leur désignation est rappelée dans le Tableau 18.

#### Tableau 18 : Désignation des termes fréquemment employés dans cette partie du rapport

Terme	Désignation
Variable	Désigne un COV détecté dans un ou plusieurs échantillons
Valeurs	Désigne les surfaces de pics normalisées
	Désigne la mesure de la dispersion des valeurs d'un échantillon ou d'une
Variance	variable. La variance (S²) d'une variable est calculée par la formule suivante :
	$S^2 = \frac{\sum (x_i - \overline{x})^2}{n - 1}$
	Avec $x_i$ , la valeur d'une observation ; $\overline{x}$ , la valeur moyenne de toutes les
	observation ; et n, le nombre d'observations

#### 1.4.1 Normalisation des données

Pour utiliser un modèle statistique, les variances des variables étudiées doivent être homogènes. Or, ce n'est pas le cas si l'on utilise les données brutes générées par l'analyse d'échantillons biologiques par GC-MS. Cela s'explique par les trois facteurs suivants :

- La sensibilité de la méthode d'analyse et de l'instrumentation, qui est variable selon la nature des COVs.

- Les différences de variabilité entre les métabolites primaires et secondaires. En effet, les composés liés au métabolisme primaire de l'organisme sont généralement plus constants que les composés secondaires dépendant des conditions environnementales [66].

- Les variations techniques liées à l'échantillonnage, à la préparation des échantillons et aux erreurs analytiques.

Afin de normaliser les données, tout d'abord, les valeurs de surfaces de pics sont exprimées en réponses relatives par rapport à l'étalon interne (acide octanoïque-1-<sup>13</sup>C). Ces valeurs sont ensuite centrées, en les convertissant en fluctuation autour de 0. Cette méthode consiste à soustraire la moyenne de chaque variable ( $\bar{x}$ ), aux valeurs observés pour cette variable ( $x_i$ ). Enfin, une réduction d'échelle est réalisée par la méthode de Pareto. Cette étape consiste à diviser chaque valeur ( $x_i$ ), par la racine carré de l'écart-type de sa variable respective. La réduction d'échelle permet de réduire l'importance relative des variables ayant des valeurs élevées. La méthode de Pareto est sélectionnée pour cette étude, car elle est recommandée pour les analyses non-ciblées [66], et permet de conserver l'intégrité de l'ensemble de données [66].

Les étapes de centrage et de réduction d'échelle sont illustrées par un schéma, Figure 36. La normalisation des données est réalisée sur la plateforme Metaboanalyst 6.0 (<u>https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/home.xhtml</u>).



Figure 36 : Schéma représentant la normalisation des données brutes par centrage et réduction d'échelle (réalisé sur www.BioRender.com)

# 1.4.2 Identification des composés

L'identification des COVs d'intérêt est réalisée par comparaison des spectres de masse expérimentaux avec la base de données NIST17 (version 2017), et comparaison des indices de rétention des composés avec les données de la littérature.

# 2. Résultats

#### 2.1 Méthode d'extraction par DHS

Les effets de la température et du débit d'azote lors de l'étape de trapping des COVs sont étudiés en utilisant les surfaces de pics des 21 COVs du mélange étalon. Une analyse de variance (*ANOVA*) est réalisée pour identifier les différences statistiquement significatives (p-value < 0,05), en prenant en compte la moyenne des réponses des 21 COVs, et en prenant en compte les réponses individuelles pour chaque COV.

#### Moyenne des COVs

Le graphique des effets principaux, Figure 37, indique que la température est l'effet le plus important sur la moyenne des surfaces de pics des COVs (p-value = 0,011). L'extraction est favorisée à 80°C. L'effet du débit d'azote n'est pas significatif (p-value = 0,313).



Figure 37 : Graphique des effets principaux pour la moyenne des COVs.

#### Réponses individuelles pour chaque COV

L'effet de la température est significatif (p-value < 0,05) pour 7 composés : 1-décanol, 2-nonanone, 5-hepten-2-one, 6-méthyl, méthyl octanoate, trans-2-nonénal, hexadécane, et 1-hexanol. Les surfaces de pics obtenues pour ces 7 COVs sont représentées Figure 38. En comparaison avec les réponses obtenues à 30°C, la température de 80°C avec ce système permet une meilleure extraction de ces 6 COVs. L'effet du débit d'azote n'est significatif pour aucun des COVs du mélange (p-value > 0,05).



Figure 38 : Diagrammes en barres représentant les surfaces de pics des composés en fonction de la température et du débit d'azote. Les barres d'erreur représentent les coefficients de variation des valeurs moyennes (n=2).

#### 2.2 Traitement des données

Dans cette partie, des analyses statistiques univariées (*t-test*, *Analyse of Variance* (*ANOVA*)), et multivariées (Analyses en Composantes Principales (ACP)) sont réalisées afin d'identifier les métabolites discriminants entre les profils volatils des individus des 3 groupes (témoins sains, positifs asymptomatiques et positifs symptomatiques). En amont, l'effet du tabagisme est étudié afin de s'assurer que les COVs significativement différents entre les 3 groupes ne soient pas liés à ce facteur. Pour rappel, trois groupes d'individus sont comparés : patients infectés par SARS-

CoV-2 asymptomatiques (RT-PCR+) ; patients infectés par SARS-CoV-2 (RT-PCR+) symptomatiques ; et témoins sains, non infectés par SARS-COV-2 (RT-PCR-). Après avoir identifié les composés les plus discriminants entre les 3 groupes, une méthode de classification binaire est appliquée afin de développer un modèle prédictif. Les principales étapes du traitement des données sont schématisées ci-dessous, Figure 39.



Figure 39 : Schéma résumant les principales étapes du traitement des données collectés par DHS-GC-ToF-MS, ainsi que les outils (méthodes et logiciels) utilisés.

#### 2.2.1 Identification des composés discriminants

#### Effet du tabagisme

Un *t-test* est réalisé afin d'identifier les composés dont la concentration est affectée par l'effet du tabagisme. Les profils des individus fumeurs (n = 36) sont comparés aux profils des individus non-fumeurs (n = 124). Les résultats du test mettent en évidence un seul COV significativement différent entre les deux groupes (p-value = 0,006), représenté Figure 40. Il s'agit d'un composé détecté à 24 min sur les chromatogrammes, en quantité plus élevée chez les individus fumeurs (p-value = 0,006). Il est identifié par spectrométrie de masse et indice de rétention (MS, RI) comme étant le 2-éthyl hexanol (CAS : 104-76-7).



Figure 40 : Graphique des intervalles représentants les valeurs normalisées du 2-éthyl hexanol, en fonction du facteur « fumeur » ou « non-fumeur ». Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95% des valeurs moyennes (pour le groupe des « fumeur » n =36 ; pour le groupe « non-fumeurs » n = 124).

Selon la littérature, le 2-éthylhexanol n'est pas connu comme un marqueur du tabac. Les marqueurs de tabac identifiés dans la sueur dans une précédente étude (toluène, 3-méthylfuran, 2,5-diméthylfuran, 3-ethenyl pyridine, et nicotine) [67], ne sont pas retrouvés ici.

#### Comparaison des individus en fonction du groupe

Une analyse de variance *ANOVA* est réalisée dans le but d'obtenir un aperçu préliminaire des COVs potentiellement importants pour discriminer les 3 groupes étudiés. L'*ANOVA* permet d'identifier 32 COVs significatifs (p-valeur < 0,05). Ces composés sont reportés dans le Tableau 19, parmi les potentiels biomarqueurs détectés.

En considérant les 32 COVs significatifs identifiés par *ANOVA* comme des variables indépendantes, une ACP est réalisée. Sur la Figure 41, on observe à gauche le diagramme des scores de l'ACP, et à droite le diagramme des contributions des variables. Les symboles représentent les valeurs individuelles des 160 échantillons répartis en 3 groupes (témoins sains, non infectés, patients infectés par SARS-CoV-2 asymptomatiques et patients infectés symptomatiques). L'ACP ne permet pas de séparer distinctement les 3 groupes dans les deux dimensions principales (Figure 41). Toutefois, les échantillons négatifs ont tendance à se regrouper du côté gauche de l'axe vertical (axe dont l'abscisse est de 0), alors que les échantillons du groupe des patients positifs asymptomatiques se regroupent du côté droit de l'axe.

Sur le diagramme des contributions, à droite, les coefficients peuvent être compris entre -1 et 1 sur les deux dimensions (x et y). Pour les deux composantes, des coefficients proches de -1 ou 1 indiquent que la variable influence fortement la composante. Des coefficients proches de 0 indiquent que la variable exerce une faible influence sur la composante.



Figure 41 : Diagramme des scores de l'ACP représentant les 160 échantillons de sueur, selon les deux composantes principales, à gauche ; diagramme des contributions des variables, à droite. Les variables considérées sont les 32 COVs identifiés par ANOVA (p-valeur <0.05).

En retirant les données des individus positifs symptomatiques, et en comparant les échantillons témoins avec les individus positifs asymptomatiques par *t-test*, 20 COVs d'intérêt sont identifiés (p-value < 0.05), dont 12 composés déjà identifiés précédemment par *ANOVA*. Ces COVs sont également reportés dans le Tableau 19, parmi les potentiels biomarqueurs détectés.

Une ACP est réalisée en considérant ces 20 COVs identifiés par *t-test* comme des variables indépendantes, avec les données des 50 individus positifs asymptomatiques et des 60 témoins sains. La Figure 42 représente à gauche le diagramme des scores de l'ACP des profils volatils des individus positifs asymptomatiques et des témoins sains, selon les deux composantes principales ; et à droite, le diagramme des contributions des variables.



Figure 42 : Diagramme des scores de l'ACP représentant les 50 individus positifs asymptomatiques et des 60 témoins non infectés, selon les deux composantes principales, à gauche ; diagramme des contributions des variables, à droite. Les variables considérées sont les 20 COVs identifiés par t-test (p-valeur <0.05).

Une distinction entre les groupes est observée principalement sur l'axe horizontal représentant la première composante (score de 52.2 %), avec les échantillons des témoins négatifs regroupés sur le côté gauche du diagramme.

Le Tableau 19 regroupe 40 composés d'intérêt, comprenant les COVs identifiées par la comparaison des 3 groupes d'individus (160 sujets) par *ANOVA*, ainsi que les COVs identifiés par la comparaison du groupe des individus non infectés (60 sujets) et du groupe des patients infectés asymptomatiques (60 sujets), par *t-test*. On remarque que 12 COVs sont significatifs (p-value < 0,05) avec les deux tests, 20 COVs uniquement par *ANOVA*, et 8 COVs sont uniquement significatif par *t-test*.
Tableau 19 : Potentiels biomarqueurs détectés par DHS GC-ToF-MS, et putativement identifiés par spectrométrie de masse (MS) et indices de rétention (RI), et confirmé par le standard analytique lorsque le laboratoire en dispose (cas unique du styrène), dans les échantillons selon des analyses statistiques par ANOVA, et par t-test

Variable	Temps de rétention (min)	lon majoritaire (m/z)	Identification	P-value, ANOVA	<i>P-value, t-test</i> (témoins sains vs patients infectés asymptomatiques)
COV_88	11,25	92,08	Toluène (MS, RI)	2,22E-06	non significatif
COV_87	11,25	85,07	Non identifié	3,25E-06	non significatif
COV_79	11,10	93,09	Non identifié	6,41E-06	non significatif
COV_150	16,64	85,06	Acétylacétone (MS, RI)	7,83E-06	1,66E-04
COV_500	33,73	141,14	Non identifié	2,20E-05	1,69E-05
COV_175	17,79	104,08	Styrène (MS, RI, Standard)	2,80E-05	2,96E-06
COV_627	41,47	195,14	Non identifié	3,24E-05	1,96E-04
COV_189	17,89	102,07	Non identifié	8,42E-05	9,20E-06
COV_621	41,24	149,12	Non identifié	9,92E-05	4,06E-04
COV_173	17,56	105,09	Non identifié	non significatif	1,97E-04
COV_105	13,63	45,02	Non identifié	1,42E-04	non significatif
COV_622	41,27	197,16	2,6-Diisopropylnaphthalene (MS, RI)	1,43E-04	non significatif
COV_182	18,14	117,09	Non identifié	non significatif	1,82E-07
COV_494	33,61	142,10	2-methylnaphthalene (MS, RI)	1,53E-04	4,02E-05
COV_240	21,15	119,10	Cymène (isomère o- ou p-) (MS, RI)	non significatif	1,39E-04
COV_381	27,64	54,04	Non identifié	1,55E-04	non significatif
COV_599	39,92	155,12	Non identifié	1,71E-04	7,40E-05
COV_158	16,84	85,08	Non identifié	1,85E-04	non significatif
COV_108	13,82	45,02	Non identifié	1,90E-04	non significatif
COV_38	7,52	72,07	Non identifié	2,53E-04	non significatif
COV_450	31,04	128,09	Naphtalène (MS, RI)	2,75E-04	1,07E-04
COV_178	17,90	79,05	Non identifié	3,66E-04	2,30E-05
COV_464	31,6	71,09	Non identifié	non significatif	1,14E-03
COV_402	28,62	69,06	Non identifié	4,87E-04	non significatif
COV_331	25,19	58,04	Non identifié	7,92E-04	non significatif
COV_625	41,36	155,12	Non identifié	8,73E-04	non significatif
COV_517	34,93	85,06	Non identifié	non significatif	1,03E-03
COV_525	35,56	123,1	Benzène, 1,4-dimethoxy (MS, RI)	non significatif	1,37E-04

Variable	Temps de rétention (min)	lon majoritaire (m/z)	Identification	P-value, ANOVA	<i>P-value</i> , <i>t-test</i> (témoins sains vs patients infectés asymptomatiques)
COV_626	41,46	212,19	Non identifié	9,64E-04	7,36E-04
COV_596	39,81	107,08	4-ethylphenol (MS, RI)	non significatif	3,45E-04
COV_114	14,11	91,07	Non identifié	1,05E-03	non significatif
COV_606	40,56	158,11	Non identifié	non significatif	9,17E-04
COV_559	37,51	88,06	Non identifié	1,24E-03	non significatif
COV_314	24,55	109,07	Non identifié	1,37E-03	non significatif
COV_511	34,42	142,1	Non identifié	1,54E-03	8,94E-04
COV_310	24,33	126,03	Non identifié	1,93E-03	non significatif
COV_762	49,47	105,07	Non identifié	2,10E-03	non significatif
COV_325	24,98	355,11	Non identifié	2,21E-03	non significatif
COV_742	48,83	149,07	Non identifié	2,49E-03	non significatif
COV_724	47,26	54,04	Non identifié	2,56E-03	non significatif

#### Test individuels de Fisher LSD

Le Test de Fisher *LSD* (*Least Significant Difference*), est réalisé en complément de l'*ANOVA* pour l'ensemble des COVs du Tableau 19, afin d'étudier le regroupement des échantillons, c'est à dire identifier quels groupes sont différents entre eux, avec un niveau de confiance de 95%. Les moyennes des réponses normalisées pour chaque COV (Tableau 19) sont comparées. Les tests individuels sont significatifs pour 3 composés identifiés : styrène, acétylacétone et toluène.

Les résultats des comparaisons par groupes pour le styrène, sont présentés dans le Tableau 20.

Groupes comparés	P-value	Différence
Positifs symptomatiques - témoins sains, non infectés	3,21E-01	Non significative
Positifs asymptomatiques - témoins sains, non infectés	2,87E-04	significative
Compresses CQI - témoins sains, non infectés	1,29E-05	significative
Positifs asymptomatiques - positifs symptomatiques	1,03E-02	significative
Compresses CQI - positifs symptomatiques	9,39E-07	significative
Compresses CQI - positifs asymptomatiques	5,68E-11	significative

Tableau 20 : Comparaison des valeurs moyennes pour le styrène en fonction des groupes d'individus

Le styrène est l'un des composés majoritaires identifiés sur les chromatogrammes des individus des trois groupes. Il est détecté en quantité plus importante chez les sujets positifs asymptomatiques par rapport aux sujets symptomatiques et aux témoins non infectés, Figure 43. Les quantités déterminées pour le groupe d'individus positifs symptomatiques sont comparables aux valeurs retrouvées chez les individus non infectés.



Figure 43 : Graphiques des intervalles représentant les surfaces de pics normalisées du styrène, en fonction du groupe d'échantillons. Les barres d'erreurs correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. Les \* indiquent que la p-value est significative (p < 0,05).

Les résultats des comparaisons par groupes pour l'acétylacétone, sont reportés dans le Tableau 21.

Groupes comparés	P-value	Différence
Positifs symptomatiques - témoins sains, non infectés	6.45E-03	Significative
Positifs asymptomatiques - témoins sains, non infectés	4.00E-06	Significative
Compresses CQI - témoins sains, non infectés	1.90E-05	Significative
Positifs asymptomatiques - positifs symptomatiques	5.75E-02	Non significative
Compresses CQI - positifs symptomatiques	1.87E-02	Significative
Compresses CQI - positifs asymptomatiques	3.37E-01	Non significative

Tableau 21 : Comparaison des valeurs moyennes pour l'acétylacétone, en fonction des groupes d'individus

La quantité relative d'acétylacétone détectée est plus élevée chez les individus témoins non infectés par le SARS-CoV-2, par rapport aux individus infectés avec symptômes, et asymptomatiques, Figure 44. Les pics chromatographiques détectés dans les échantillons positifs asymptomatiques sont proches du bruit de fond analytique et du même ordre de grandeur que les pics détectés dans les compresses contrôles.



Figure 44 : Graphiques des intervalles représentant les surfaces de pics normalisées de l'acétylacétone, en fonction du groupe d'échantillons. Les barres d'erreurs correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. Les \* indiquent que la p-value est significative (p < 0,05).

Les résultats des comparaisons par groupes pour le toluène, sont reportés dans le Tableau 22.

Tableau 22	: Comparaison	des valeurs movenne	s pour le toluène	. en fonction des	aroupes d'individus
				,	9.00.000 0.0000

Groupes comparés	P-value	Différence
Positifs symptomatiques - témoins sains, non infectés	4.10E-02	Significative
Positifs asymptomatiques - témoins sains, non infectés	3.00E-03	Significative
Compresses CQI - témoins sains, non infectés	1.50E-02	Significative
Positifs asymptomatiques - positifs symptomatiques	3.28E-01	Non significative
Compresses CQI - positifs symptomatiques	3.34E-01	Non significative
Compresses CQI - positifs asymptomatiques	8.04E-01	Non significative

Le toluène est détecté avec une variabilité importante, en quantité plus élevée chez les individus non infectés par rapport aux deux groupes positifs, Figure 45. La

variabilité et l'intensité des surfaces de pics de ce composé, observées pour les compresses de contrôle, indiquent que le toluène est en partie d'origine exogène (contamination de l'air du laboratoire).



Figure 45 : Graphiques des intervalles représentant les surfaces de pics normalisées du toluène, en fonction du groupe d'échantillons. Les barres d'erreurs correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. Les \* indiquent que la p-value est significative (p < 0,05).

#### **Chromatogrammes**

Les composés les plus discriminants entre les 3 groupes d'échantillons identifiés sont le toluène, l'acétylacétone et le styrène. La Figure 46 est un exemple de chromatogramme d'un individu sain, sur lequel ces 3 COVs sont annotés en noir. Les étalons internes sont annotés en bleu sur le chromatogramme.



Figure 46: Exemple d'un chromatogramme (TIC) (F, 42 ans, groupe témoins sains). Les étalons internes (Octanoic acid 1-<sup>13</sup>C et Linalool-D<sub>3</sub>) sont indiqués en bleu sur le chromatogramme.

On observe un pic de faible intensité pour l'acétylacétone, sur la Figure 46, proche de la ligne de base du chromatogramme, indiquant que la concentration de ce composé est proche de la limite de détection instrumentale. En prenant comme critère de détection un rapport signal sur bruit  $\geq$  3, l'acétylacétone est détectée dans 70,4 % des échantillons, et non détecté dans les 29,6 % restants (majoritairement des échantillons provenant d'individus des groupes positifs au SARS-CoV-2 (70,9 %)).

#### 2.2.2 Classification des données

#### Modèle prédictif pour l'ensemble des échantillons

En utilisant les données obtenues pour l'acétylacétone, le styrène, et le toluène, un modèle de classification binaire est généré à l'aide d'un algorithme de forêts d'arbres de décisions (*Random Forest*), sur la plateforme Metaboanalyst 6.0.

Les échantillons des individus témoins sains sont comparés aux échantillons des individus infectés (asymptomatiques et symptomatiques confondus). Afin d'évaluer la performance du modèle de classification binaire, une courbe ROC (*Receiver Operating*)

*Characteristic*) est réalisé, Figure 47. L'axe des ordonnées exprime la sensibilité du modèle, et l'axe des abscisses indique la spécificité. En effet, la sensibilité et la sélectivité mesurent la probabilité que le modèle reflète réellement le phénomène observé (malade ou non malade). Ces deux indicateurs varient en sens inverse et sont calculés à partir de la matrice reportée Tableau 23. Le modèle prédictif généré présente une sensibilité de 67,8 % et une spécificité de 80 %.

Tableau 23 : Matrice pour le calcul de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives

Diagnostic	Malades	Non-malades
Positif	а	С
Négatif	b	d

La sensibilité est calculée en fonction du taux de vrais positifs (a) et de faux négatifs (b), selon la formule suivante :

Sensibilité = 
$$\frac{a}{a+b}$$

La spécificité est calculée en fonction du taux de faux positifs (c) et de vrais négatifs (d), selon la formule suivante :

$$Spécificité = \frac{d}{c+d}$$

Remarque : les Valeurs Prédictives Positives ( $VPP = \frac{a}{a+c}$ ), ou les Valeurs Prédictives Négatives ( $VPN = \frac{d}{b+d}$ ), peuvent également être considérées comme des indicateurs des erreurs de diagnostic. Cependant, elles ne sont pas utilisées dans cette étude, car ces valeurs ne dépendent pas uniquement des caractéristiques de la méthode et de l'instrument de mesure, mais dépendent aussi de la fréquence de la maladie dans la population [68].

Dans un contexte de diagnostic médical, l'aire sous la courbe *ROC*, ou *AUC* (Area Under the Curve), permet de choisir une valeur seuil optimale en fonction des priorités cliniques (sensibilité ou spécificité). Pour une pathologie contagieuse comme la COVID-19, le choix entre une meilleure sensibilité ou une meilleure spécificité dépend

du contexte. En effet, au début de la pandémie, une sensibilité élevée était indispensable pour un dépistage de masse, afin de contenir la propagation du virus. La spécificité devient ensuite plus importante lorsque la transmission du virus est moins fréquente (par exemple, après la vaccination de la population), et que l'on souhaite éviter les faux positifs.

L'aire sous la courbe ROC du modèle, représenté Figure 47, est ici de 0,768. Plus l'AUC est proche de 1, plus le modèle est performant.



Figure 47 : Courbe ROC représentant les résultats du modèle de classification binaire généré à partir de l'ensemble des données.

#### Variabilité des échantillons positifs

Dans cette partie, uniquement les échantillons positifs, asymptomatiques et symptomatiques confondus, sont considérés. Une analyse discriminante par la méthode des moindres carrés, appelées *Partial Least Squares Analysis (PLS-DA)*, est

réalisée avec les données des 100 individus positifs. Cette analyse met en évidence une variabilité des échantillons liée à la date du prélèvement (Figure 48).



Figure 48 : Graphiques des scores de l'analyse par PLS-DA

Les échantillons prélevés au début de l'étude entre le 21 juin et le 30 juillet 2021 se démarquent du reste des échantillons, Figure 48, selon la première composante, représentée par l'axe des abscisses, avec un score de 9,6%.

En outre, il est intéressant d'étudier les données en retirant ces échantillons, afin de s'affranchir de près de 10% de variabilité, et potentiellement gagner en précision dans la comparaison des échantillons positifs vs négatifs. Ainsi, un second modèle de classification est généré ensuite en retirant les échantillons prélevés entre le 21 juin et le 1<sup>er</sup> août 2021.

#### Modèle prédictif pour les échantillons prélevés à partir du 20 août 2021

La Figure 49 représente la courbe *ROC* résultante du second modèle, réalisé avec les échantillons prélevés à partir du 20 août 2021. Cette fois, l'aire de la courbe est de 0,817. La sensibilité du modèle est de 71,4 %, et la spécificité est de 79,1 %.



Figure 49 : Courbe ROC représentant les résultats du modèle de classification binaire généré avec les échantillons prélevés à partir du 20 août 2021

#### Test du modèle prédictif

Lors de la collecte des échantillons, les prélèvements ont été réalisés au minima en doublons et jusqu'à 4 prélèvements par patient ont été effectués. Les doublons non analysés ont été conservés au congélateur à – 20°C pendant la durée de l'étude. Afin

de tester le modèle prédictif, 22 échantillons du stock sont sélectionnés aléatoirement et analysés avec la même méthode par DHS GC-ToF-MS, Tableau 24.

	Groupe	Nombre	Total	
	NEGATIF	7	7	
POSITIF	asymptomatique	9	15	
	symptomatique		10	

Tableau 24 : Echantillons analysés pour tester le modèle prédictif

Parmi les 15 échantillons positifs, 13 sont correctement prédits positifs et 2 sont prédits négatifs, ce qui équivaut à une sensibilité de 86,7 %. Pour les échantillons, négatifs, 5 échantillons sont correctement identifiés comme négatifs, et 2 échantillons sont classés comme positifs, équivalent à une spécificité de 71,4 %. Ces résultats sont satisfaisants car ils montrent que le modèle prédictif fonctionne avec un ensemble de données différent de celui utilisé pour l'entrainement.

Par la suite, il serait intéressant de tester ce modèle avec une cohorte de patients différente, afin de vérifier sa capacité à généraliser la prédiction à d'autres populations.

## 3. Discussion

#### 3.1 Identification de potentiels biomarqueurs

L'acétylacétone, également connue sous le nom de 2,4-pentanedione, appartient à la famille des bêta-dicétones (composés organiques contenant deux groupements cétones séparés par un seul atome de carbone). Ce COV est considérée comme un hydrocarbure oxygéné. Il est probable que ce COV soit un métabolite secondaire.

Le styrène est un COV contenant un fragment éthénylbenzène. Il s'agit d'un composé réactif qui se polymérise et s'oxyde facilement. Selon Chuachaina *et al.*[38], l'émission de styrène à la surface de la peau pourrait être lié à un métabolisme bactérien (*Pseudomonas aeruginosa*).

Le toluène, également appelé méthylbenzène ou phénylméthane, appartient à la famille des dérivés benzéniques. Il existe dans toutes les espèces vivantes, des bactéries à l'humain. Ce composé pourrait être un métabolite secondaire.

Les précédentes études publiées concernant les biomarqueurs du SARS-CoV-2 dans la sueur ont été identifiées à l'aide des moteurs de recherche PubMed et Web of Sciences. Les informations principales (cohorte, zone de prélèvement, instrument d'analyse, support de prélèvement, biomarqueurs identifiés, et performances des modèles de classification, sont synthétisées dans le Tableau 25.

Les résultats des précédentes études révèlent peu de marqueurs communs dans la sueur (seuls le p-cymène et le styrène sont reportés dans deux études). Les chercheurs n'ont pas encore trouvé de consensus sur des marqueurs spécifiques pouvant être universels. Les variations observées dans les résultats pourraient être attribuées à une multitude de facteurs, tels que les différences méthodologiques, les populations étudiées, ou encore les techniques d'analyse employées.

Tableau 25 : Biomarqueurs du SARS-CoV-2 identifiés dans d'autres études par l'analyse de la sueur. La policeen gras dans le texte correspond aux composés reportés dans plusieurs études.

Echantillons et méthode d'analyse	Support de prélèvement	Biomarqueurs identifiés	Performances	Ref.
Cohorte de 95 sujets, sueur mains, analyse par GC-MS	Compresse médicales stériles (100% coton)	Diacetone alcohol, Styrene, 2-Pentylfuran, Phenylacetaldehyde, Undecane, Methyl caprylate, trans-2-Nonenal, 1-Nonanol, Decanal, 2-Phenoxyethanol, Dodecanal, 6,10-Dimethyl-5,9-undecadien-2-one-(E),1- Dodecanol, Dodecanoic acid	Modèle PLS-DA, 75,8% (± 0,4) précision, 81.8% sensibilité, 69,7% spécificité)	[69]
Cohorte de 120 sujets, sueur Aisselles, analyse par GC-MS	Compresses (100% coton)	<ul> <li>1-Octen-3-ol, 2-octanol, 1-octen-3-ol, 2,3- dimethyl-octane, Gallic acid, 4- Hydroxymandelate, DL-3,4- Dihydroxymandelic acid, Gentisic acid, Urocanic acid, Uridine, Octadecyl acetate,</li> <li>2-methyl-N-ethyl-N-octadecylpropanamide,</li> <li>2-methyl-N-ethyl-N-octadecylpropanamide,</li> <li>4-methyl-N-ethyl-N-octadecylpropanamide,</li> <li>4-methyl-2-thyl-Cyclohexanol acetate,</li> <li>4-methyl-2-benzyloxycarbonyl-2H-1-</li> <li>4-methyl-2-benzyloxycarbonyl-2H-1-</li> <li>4-methyl-2-benzyloxycarbonyl-2H-1-</li> <li>4-methyl-2-benzyloxycarbonyl-2H-1-</li> <li>4-methyl-2-benzyloxycarbonyl-2H-1-</li> </ul>	Non spécifié	[70]
Cohorte de 368 sujets, sueur aisselles, analyse par GC-MS et GC- FID	Coton tiges	p-Cymene	Courbe ROC 96% de précision	[71]
Cohorte de 140 sujets, sueur Aisselles, analyse par GC-MS	Coton tiges	Pentadecane, nonanal, <b>styrene</b> , xylene, ethylbenzene, and 2-ethylhexyl acrylate	Courbe ROC, précision 94- 98%, sensibilité 93%, spécificité 94%	[38]
Cohorte de 66 sujets, sueur Aisselles, analyse par GCxGC-MS	Coton tiges	<b>p-Cymene</b> , linalool, and 2,6,11- trimethyldodecane	Courbe ROC, précision 94%, sensibilité 93- 97%, spécificité 94-100%	[72]

#### 3.2 Limites de l'étude

#### 3.2.1 Conservation des échantillons

L'effet de la conservation des échantillons à -20°C jusqu'à 30 mois après le prélèvement n'a pas été étudié. La dégradation des COVs prélevés sur les compresses au cours du temps n'est pas exclue.

#### 3.2.2 Groupement des échantillons

Bien que le test RT-PCR soit la norme actuelle pour le dépistage du SARS-CoV-2, la technique de prélèvement, la charge virale, ou des erreurs de manipulation, peuvent entraîner des résultats inexacts [73]. La spécificité du test RT-PCR par prélèvement nasopharyngé est quasi parfaite (proche de 100 %) [74], mais les valeurs de sensibilité reportées dans la littérature sont moins élevées et très variables (entre 32 et 90 %) [74].

Par ailleurs, si le virus subit une mutation dans une région spécifique de son génome qui est utilisée comme cible par les réactifs RT-PCR, il est possible que le test ne détecte pas ces nouvelles souches virales. Enfin, les infections antérieures par le SARS-CoV-2, et la possibilité que des patients aient été atteints d'un COVID long au moment de la collecte des échantillons, sont également des facteurs pouvant impacter les résultats.

#### 3.2.3 Modifications liées aux variants du virus

Les échantillons positifs au SARS-CoV-2, prélevés du juin à mi-novembre 2021, font partie de la période de l'épidémie où le variant Delta était prépondérant en France selon l'OMS, alors que les échantillons de mi-novembre 2021 à janvier 2022 concordent avec la période des variants Omicron. Or, il a été démontré que le type de variant du SARS-CoV-2 influence les performances des tests de diagnostic basés sur les COVs de l'air expiré [64]. Il n'est pas exclu que la composition volatile de la sueur soit également influencée par les différents types de variants du virus.

Le modèle de classification binaire construit dans cette étude indique une précision de 76,8 % pour le diagnostic du SARS-CoV-2, et cet indicateur augmente à 81,7 %

lorsque les échantillons prélevés au début de l'étude, entre juin et juillet 2021, ne sont pas pris en compte dans le modèle. Toutefois, cette différence n'est pas significative en considérant l'intervalle de confiance à 95 % des valeurs.

En comparaison avec d'autres méthodes de diagnostic de la COVID-19 (chiens de détection, tests antigéniques), dont la précision est généralement > 85 %, ces performances sont modérées.

## 4. Conclusion

Des échantillons de sueur de 160 individus, dont 100 testés positifs au SARS-CoV-2 par tests PCR et 60 testés négatifs, au moment du prélèvement ont été analysés par DHS-GC-ToF-MS. Les échantillons ont été collectés à l'aide de compresses en viscose et polyester, et analysés avec une méthode semi-automatisée. La méthode de prélèvement mise en œuvre est rapide et non invasive. Les échantillons ont été conservés congelés à -20°C avant l'analyse, pendant 24 à 30 mois, démontrant indirectement la capacité des compresses médicales à conserver des odeurs sur une longue période.

Les quantités relatives des COVs détectés, en fonction des groupes (positif symptomatique vs positifs asymptomatiques vs négatif au SARS-CoV-2) ont été comparés en utilisant les aires de pics des chromatogrammes déconvolués, et normalisés. La comparaison des groupes d'échantillons par des analyses statistiques (*ANOVA, t-test*, test de Fisher), a mis en évidence 3 potentiels biomarqueurs du virus : le styrène, l'acétylacétone et le toluène. Ainsi, cette étude expérimentale démontre que le protocole d'analyse par DHS-GC-ToF-MS peut être utilisé pour prédire l'infection ou non au SARS-CoV-2 d'un patient, à partir d'échantillons de sueur. Enfin, la méthode développée pourrait être adaptée à d'autres pathologies.

# Conclusion

## Conclusion

Dans un contexte où la volatolomique est en plein essor, le premier axe de ces travaux de thèse vise à apporter des recommandations méthodologiques aux chercheurs du domaine clinique (chimistes, biologistes ou praticiens hospitaliers), pour le développement de méthodes de diagnostic non invasives.

Bien que l'odorat soit utilisé en médecine depuis l'Antiquité, ce n'est que récemment que des instruments analytiques permettent une caractérisation et une quantification précise des composés volatils à l'origine de l'odeur corporelle. La GC-MS est notamment l'outil de référence dans ce domaine. La préparation des échantillons pour l'analyse par GC-MS est très variable en fonction de la matrice (sueur, air expiré ou urine), mais l'un des points communs à ces matrices, sont les techniques d'extractions utilisées, basées sur l'analyse de l'espace de tête (*headspace*). L'extraction par SPME est actuellement la technique la plus utilisée pour identifier et quantifier les biomarqueurs de pathologies. L'utilisation d'une séparation GC bidimensionnelle, et de spectromètres de masse à haute résolution, combinée à des techniques d'extraction optimisées, augmente d'autant plus la sensibilité et la spécificité des analyses, pour ouvrir la voie à des applications cliniques.

Cependant, malgré les dernières avancées technologiques, des limites méthodologiques subsistent. La plupart du temps, les études ne sont pas reproduites dans d'autres laboratoires, et les résultats reportés pour une même pathologie varient de manière significative.

Le manque de normalisation des protocoles de prélèvement, de conservation et de traitements des échantillons (air expiré, sueur, urine) est notamment l'une des causes de la faible reproductibilité des études. Ce manuscrit n'apporte pas de réponses définitives aux problématiques de conservation des échantillons biologiques, mais fournit à partir de la revue de la littérature, des lignes directrices à prendre en compte dans les études futures. L'originalité des revues bibliographiques présentées dans les deux premiers chapitres, réside dans le fait qu'elles se concentrent à la fois sur les approches biologiques (chiens de détection) et analytiques (GC-MS).

Les chiens possèdent un odorat extrêmement développé et peuvent être entraînés à identifier des composés volatils spécifiques associés à certaines pathologies. L'entraînement des chiens de détection nécessite un dispositif de capture des COVs, pouvant prendre la forme d'un tissu (compresse médicale, t-shirt, coton ...) pour la collecte de la sueur, ou encore d'un matériau à base de polymère adsorbant (PDMS, dispositifs brevetés).

Le dispositif d'échantillonnage doit répondre à plusieurs critères essentiels. Sur le plan pratique, le dispositif doit être facile à utiliser, préconditionné pour éliminer toute contamination, et emballé individuellement sous vide pour éviter les contaminations croisées. En matière de sélectivité, il doit être capable de collecter une large gamme de composés volatils (polaires et apolaires).

D'autre part, la stabilité des échantillons est essentielle. La possibilité de stocker les échantillons pendant la durée de la collecte de l'ensemble des échantillons d'une même étude, est idéale pour permettre l'analyse des échantillons sur un intervalle de temps court, en réduisant ainsi la variabilité instrumentale entre les séries d'analyses.

Dans cette étude, les performances de cinq matériaux pertinents pour l'olfaction canine sont comparées, à l'aide d'un mélange d'étalons analytiques de COVs typique de la sueur humaine, et un protocole standardisé (COVs mis en contact avec les dispositifs pendant 1 h dans un contenant fermé thermostaté à 30°C). Les résultats mettent en avant la sensibilité et l'exhaustivité du tube Getxent analysé par DHS-GC-ToF-MS, et du Twister, analysé par TD-GC-ToF-MS, permettant le prélèvement de quantités de COVs de l'ordre du ng, pour différentes familles chimiques (à l'exception des thiols).

Cependant, il est important de noter que dans cette expérience, la mise en contact des COVs avec les dispositifs favorise les échanges sous forme gazeuse. Il n'est pas exclu que les matériaux comme la compresse et le tube Sorbstar offrent de meilleurs performances pour le prélèvement des COVs en utilisant un protocole différent (par exemple, par immersion dans une solution aqueuse contenant les COVs en solution). Par ailleurs, ce modèle n'est pas idéal pour mimer l'usage réel des compresses médicales, qui sont en pratique utilisées en contact direct avec la peau et absorbent également l'eau et le sébum.

La collaboration entre les différents acteurs (maitres-chiens, vétérinaires, chimistes), est indispensable dans la mise au point de protocoles pour l'olfaction canine. Ainsi, en partenariat avec l'Institut Curie dans le cadre du projet K-DOG (financé par la fondation Royal Canin), un document vulgarisé se basant sur les résultats de ces travaux de thèse est en cours d'élaboration. Ce document se présentera sous la forme d'un livret électronique, et visera à sensibiliser les maîtres chien et vétérinaires, à la complexité de l'analyse de l'odeur corporelle, ainsi qu'aux problématiques analytiques que nous pouvons rencontrer.

L'une des applications les plus concevables de l'usage de l'olfaction canine, réside dans la détection des maladies infectieuses lors d'une pandémie, grâce au nombre important d'échantillons disponibles pour l'entrainement des chiens de détection, indispensable pour leur apprentissage et le maintien de leurs performances, dans un tel contexte [8,75]. Un dépistage réalisé, en favorisant si nécessaire la sensibilité de la méthode à sa spécificité, serait alors pertinent pour isoler très rapidement les personnes contagieuses, et limiter la propagation de l'épidémie. Le diagnostic des individus testés positivement par olfaction canine serait ensuite confirmé ou non, avec la méthode de référence pour la pathologie concernée.

Le second axe de recherche de ces travaux de thèse aborde la détection et l'identification de biomarqueurs de pathologies dans la sueur. Dans le dernier chapitre de ce manuscrit, un exemple d'application pour identifier les potentiels COVs associés à la pathologie de la COVID-19, est présenté. Cette étude expérimentale est réalisée à partir d'échantillons de sueur de 160 personnes, dont 100 positives et 60 négatives au SARS-CoV-2 (confirmées par PCR), à l'aide de la technique DHS-GC-ToF-MS. Les échantillons, collectés via des compresses médicales, ont été conservés congelés à - 20°C pendant 24 à 30 mois avant d'être analysés. Les composés profils volatils ont été comparés entre groupes (positifs symptomatiques, positifs asymptomatiques, et négatifs) en utilisant des analyses statistiques, révélant trois biomarqueurs potentiels du SARS-CoV-2 : le styrène, l'acétylacétone et le toluène. La méthode d'analyse développée pour cette application est semi-automatisée et facilement reproductible. Elle pourrait ainsi être appliquée à d'autres études liées au virus du SARS-CoV-2, ou à d'autres pathologies.

## **Perspectives**

## Travaux axés sur les matériaux et méthodes de prélèvement des COVs issus du corps humain

#### > Limites de la phase adsorbante utilisée pour l'extraction par DHS

Pour les extractions réalisées par DHS, le Tenax TA a été sélectionné dans nos travaux comme phase adsorbante car il s'agit d'un polymère efficace pour adsorber une large gamme de composés volatils. Il présente tout de même des limites, en particulier pour piéger les composés très volatils (avec des températures d'ébullition ≤ 100°C). Il existe 3 types d'adsorbants compatibles avec notre système de thermodésorption : les polymères poreux (Tenax), les Carbones Moléculaires Sieves (CMS), et les carbones graphites.

Pour permettre une extraction plus exhaustive comprenant les COVs très volatils, mais également les COVs piégés par le Tenax TA, l'une des solutions possibles est l'utilisation de la technique du *multi-trapping*. Cette méthode consiste à utiliser successivement plusieurs tubes adsorbants, contenant différentes phases. Dans le cadre de notre étude, cette perspective semble pertinente.

Techniquement, il est possible avec notre système automatisé (DHS, Gerstel) de réaliser plusieurs piégeages successifs dans différents tubes puis de désorber thermiquement (jusqu'à 300°C) un à un les différents tubes. Les composés volatils désorbés sont piégés à froid (jusqu'à - 30°C) dans l'injecteur à température programmable. Une fois que tous les tubes sont désorbés, les analytes sont injectés dans le système GC-MS. Cette méthode se nomme *MVM* pour *Multi Volatile Method* est a été utilisée comme preuve de concept, avec 3 tubes adsorbants par Ochiai *et al* [76]. Les composés les plus volatils sont piégés en premier puis les moins volatils ensuite. Pour la thermodésorption, on procède dans l'ordre inverse. Le tube utilisé pour piéger les COVs les moins volatils est désorbé en premier. Les composés sont alors piégés à froid dans l'injecteur, le temps de désorber le tube suivant contenant les composés les plus volatils. De cette manière, les composés les plus volatils restent moins longtemps dans l'injecteur.

Des essais de *multi-trapping* ont été expérimentés au cours de la thèse, en combinant des tubes Tenax TA, à des tubes de Carbone Moléculaire Sieves-III (CMS-III), particulièrement recommandés par le fournisseur pour le piégeage des composés très volatils (C2 - C4, point d'ébullition : 60 - 80°C). Les tubes de CMS-III aux dimensions de notre système (tubes de 60 mm x 6 mm, (4 mm diamètre interne), pour TDU, Gerstel) ne sont pas commercialisés. Les matériaux utilisés ici ont été commandés sur mesure (Camsco), et contiennent 60 mg de CMS-III.

Un conditionnement de minimum 6 h à 300°C sous un flux d'azote (50 mL/min) a été nécessaire avant la première utilisation du tube en CMS-III. Après l'extraction et l'analyse d'échantillons (compresses CQI, préparés comme décrit dans le chapitre 4, section 1.1.4), nous observons une désorption difficile des COVs, à la température maximale du système de thermodésorption. Un conditionnement de 4 h à 300°C sous un flux d'azote (50 mL/min) est nécessaire, pour ne pas observer de recouvrements entre les échantillons. Ce processus est très chronophage. De plus, l'azote utilisé au laboratoire provenant de bouteilles, une consommation importante de gaz (lors du reconditionnement des tubes) induit la nécessité de remplacer fréquemment la bouteille, ce qui est contraignant pour le laboratoire sur le long terme. Pour ces raisons pratiques, les essais de *multi-trapping* ont finalement été abandonnés.

Une optimisation de la préparation de ces tubes adsorbants pourrait éventuellement permettre de réduire le temps de désorption des composés, notamment en évaluant l'effet de la masse de phase CMS-III par tube, qui nous semble ici trop importante. En trouvant la masse de phase CMS-III idéale par tube adsorbant, offrant un bon compromis entre le piégeage sensible et spécifique des COVs très volatils, et minimisant la durée de thermodésorption, le multi-trapping (CMS-III/Tenax TA) serait alors une solution idéale pour maximiser la non-sélectivité de l'extraction.

## Optimisation de la mise en contact des COVs de la sueur avec les dispositifs de prélèvement

Les prélèvements de COVs réalisés dans l'étude comparative des dispositifs de capture d'odeurs, sont effectués pendant 1 h, à une température de 30°C. Par la suite, la mise en contact des COVs présents dans la solution étalon de sueur pourrait être optimisée, notamment en évaluant pour chaque dispositif, l'effet de la durée de mise en contact des COVs, et la température d'incubation des contenants. Cette expérience

permettrait de déterminer si une mise en contact prolongée (de plus d'une heure) ou, au contraire, une durée plus courte peut maximiser le prélèvement des COVs. D'autre part, il serait intéressant d'étudier l'effet du volume d'air autour du dispositif, en comparant les performances de prélèvement des COVs réalisés avec des vials de différents volume (10 mL, 100 mL, 1 L, ou plus).

#### > Optimisation des supports nanostructurés pour le prélèvement des thiols

La détection des thiols volatils reste un défi, malgré la sensibilité de la GC-MS. Dans ces travaux, nous avons conçu des supports innovants à base de PDMS nanostructurés avec des nanoparticules d'or pour piéger les thiols plus efficacement, via des interactions fortes entre l'or et le soufre. Ces supports de prélèvement restent à être optimisés, notamment en modifiant le matériau utilisé comme base, par exemple en choisissant un polymère plus résistant thermiquement.

D'autre part, dans cette étude, des nanoparticules d'or sphériques sont utilisées, mais le choix d'un autre type d'AuNPs est également une perspective à envisager. Les nanoparticules d'or colloïdales présentent en effet des propriétés chimiques, catalytiques et électromagnétiques uniques, qui dépendent de leur taille, de leur morphologie et de leur composition [77].

### Travaux axés sur la recherche de biomarqueurs de pathologies

La recherche des composés volatils associés à la COVID-19, notamment dans l'air expiré, a pris de l'ampleur depuis 2019 en raison de la crise sanitaire mondiale [78]. Dans ces travaux, nous avons analysé des échantillons de sueur, et comparé nos résultats avec les précédentes études réalisées sur cette même matrice. Il serait également intéressant d'explorer, par une revue de la littérature, les liens entre les COVs de la sueur et ceux de l'air expiré, dans le but d'observer une éventuelle complémentarité des matrices biologiques.

Dans le futur, des études combinant plusieurs sources de prélèvement de l'odeur corporelle pourraient offrir une vision plus complète et précise des profils de biomarqueurs [79].

En parallèle, le développement croissant de l'intelligence artificielle (IA) dans le domaine de la volatolomique ouvre des perspectives d'amélioration pour l'identification et la classification des biomarqueurs de pathologies. Dans l'étude présentée dans le chapitre 4, des méthodes statistiques assez courantes ont été utilisées (ACP, *t-test*, *ANOVA*, algorithme de *Random Forest*), mais nous pourrions approfondir le traitement des données en explorant des méthodes de classification plus avancées. Par exemple, l'utilisation de réseaux de neurones convolutifs serait intéressant, car ces algorithmes sont particulièrement adaptés aux ensembles de données de grande dimensionalité [80], comme retrouvés en volatolomique, où chaque échantillon peut être associé à des centaines de variables (ensemble des COVs détectés).

## Références

- [1] D.K. Trivedi, E. Sinclair, Y. Xu, D. Sarkar, C. Walton-Doyle, C. Liscio, P. Banks, J. Milne, M. Silverdale, T. Kunath, R. Goodacre, P. Barran, Discovery of Volatile Biomarkers of Parkinson's Disease from Sebum, ACS Cent Sci 5 (2019) 599– 606. https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00879.
- [2] E. Sinclair, C. Walton-Doyle, D. Sarkar, K.A. Hollywood, J. Milne, S.H. Lim, T. Kunath, A.M. Rijs, R.M.A. de Bie, M. Silverdale, D.K. Trivedi, P. Barran, Validating differential volatilome profiles in Parkinson's disease, ACS Cent Sci 7 (2021) 300–306. https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01028.
- [3] S. Giannoukos, A. Agapiou, B. Brkić, S. Taylor, Volatolomics: A broad area of experimentation, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 1105 (2019) 136–147. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.12.015.
- [4] X. Fan, R. Zhong, H. Liang, Q. Zhong, H. Huang, J. He, Y. Chen, Z. Wang, S. Xie, Y. Jiang, Y. Lin, S. Chen, W. Liang, J. He, Exhaled VOC detection in lung cancer screening: a comprehensive meta-analysis, BMC Cancer 24 (2024). https://doi.org/10.1186/s12885-024-12537-7.
- [5] C. V. Berenguer, F. Pereira, J.A.M. Pereira, J.S. Câmara, Volatilomics: An Emerging and Promising Avenue for the Detection of Potential Prostate Cancer Biomarkers, Cancers (Basel) 14 (2022). https://doi.org/10.3390/cancers14163982.
- [6] M. Leemans, P. Bauër, V. Cuzuel, E. Audureau, I. Fromantin, Volatile Organic Compounds Analysis as a Potential Novel Screening Tool for Breast Cancer: A Systematic Review, Biomark Insights 17 (2022). https://doi.org/10.1177/11772719221100709.
- [7] E.K. Jenkins, M.T. DeChant, E.B. Perry, When the nose doesn't know: Canine olfactory function associated with health, management, and potential links to microbiota, Front Vet Sci 5 (2018). https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00056.
- [8] P. Bauër, M. Leemans, E. Audureau, C. Gilbert, C. Armal, I. Fromantin, Remote Medical Scent Detection of Cancer and Infectious Diseases With Dogs and Rats: A Systematic Review, Integr Cancer Ther 21 (2022). https://doi.org/10.1177/15347354221140516.
- [9] S. Jadoon, S. Karim, M.R. Akram, A. Kalsoom Khan, M.A. Zia, A.R. Siddiqi, G. Murtaza, Recent developments in sweat analysis and its applications, Int J Anal Chem 2015 (2015). https://doi.org/10.1155/2015/164974.
- [10] L.B. Baker, Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health, Temperature 6 (2019) 211–259. https://doi.org/10.1080/23328940.2019.1632145.
- [11] H. Haick, Y.Y. Broza, P. Mochalski, V. Ruzsanyi, A. Amann, Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers, Chem Soc Rev 43 (2014) 1423–1449. https://doi.org/10.1039/c3cs60329f.
- [12] S. Rankin-Turner, C.J. McMeniman, A headspace collection chamber for whole body volatilomics, Analyst 147 (2022) 5210–5222. https://doi.org/10.1039/d2an01227h.
- [13] Y. Hasegawa, M. Yabuki, M. Matsukane, Identification of New Odoriferous Compounds in Human Axillary Sweat, n.d.
- [14] P. Mochalski, J. King, K. Unterkofler, H. Hinterhuber, A. Amann, Emission rates of selected volatile organic compounds from skin of healthy volunteers, J

Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 959 (2014) 62–70. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.04.006.

- [15] A.C. Medrano, A. Cantu, E.O. Aviles-Rosa, N.J. Hall, M.N. Maughan, J.D. Gadberry, P.A. Prada-Tiedemann, Chemical Characterization of Human Body Odor Headspace Components, Separations 11 (2024) 85. https://doi.org/10.3390/separations11030085.
- [16] L. Dormont, J.M. Bessière, A. Cohuet, Human Skin Volatiles: A Review, J Chem Ecol 39 (2013) 569–578. https://doi.org/10.1007/s10886-013-0286-z.
- [17] D. Smith, C. Turner, P. Spanel, Volatile metabolites in the exhaled breath of healthy volunteers: Their levels and distributions, J Breath Res 1 (2007). https://doi.org/10.1088/1752-7155/1/1/014004.
- [18] F. Pirrone, M. Albertini, Olfactory detection of cancer by trained sniffer dogs: A systematic review of the literature, Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research 19 (2017) 105–117. https://doi.org/10.1016/j.jveb.2017.03.004.
- [19] F. Soggiu, J. Sabbatinelli, A. Giuliani, R. Benedetti, A. Marchegiani, F. Sgarangella, A. Tibaldi, D. Corsi, A.D. Procopio, S. Calgaro, F. Olivieri, A. Spaterna, R. Zampieri, M.R. Rippo, Sensitivity and specificity of in vivo COVID-19 screening by detection dogs: Results of the C19-Screendog multicenter study, Heliyon 9 (2023). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15640.
- [20] J. Girard, Rôle des reins dans l'homéostasie du glucose. Implication du cotransporteur sodium–glucose SGLT2 dans le traitement du diabète, Nephrologie et Therapeutique 13 (2017) S35–S41. https://doi.org/10.1016/j.nephro.2017.01.006.
- [21] V. Latini Keller, N. Junod Perron, J.-D. Graf, C. Stoermann Chopard, Analyse d'urines : l'ABC du praticien, Rev Med Suisse (2009) 1870–1875. www.revmed.ch (accessed November 1, 2024).
- [22] S. Bouatra, F. Aziat, R. Mandal, A.C. Guo, M.R. Wilson, C. Knox, T.C. Bjorndahl, R. Krishnamurthy, F. Saleem, P. Liu, Z.T. Dame, J. Poelzer, J. Huynh, F.S. Yallou, N. Psychogios, E. Dong, R. Bogumil, C. Roehring, D.S. Wishart, The Human Urine Metabolome, PLoS One 8 (2013). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073076.
- [23] Jae Kwak, George Preti, Chapter 21 Challenges in the Investigation of Volatile Disease Biomarkers in Urine, in: Anton Amann, David Smith (Eds.), Volatile Biomarkers Non-Invasive Diagnosis in Physiology and Medicine, Elsevier, 2013: pp. 394–404. https://doi.org/10.1016/B978-0-44-462613-4.00021-0.
- [24] A. Amann, B.D.L. Costello, W. Miekisch, J. Schubert, B. Buszewski, J. Pleil, N. Ratcliffe, T. Risby, The human volatilome: Volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva, J Breath Res 8 (2014). https://doi.org/10.1088/1752-7155/8/3/034001.
- [25] M.N. Maughan, J.D. Gadberry, C.E. Sharpes, P.E. Buckley, A.E. Miklos, K.G. Furton, L.E. DeGreeff, N.J. Hall, R.R. Greubel, K.B. Sloan, Calibrating canines a universal detector calibrant for detection dogs, Frontiers in Allergy 5 (2024). https://doi.org/10.3389/falgy.2024.1366596.
- [26] S.F. Gallegos, E.O. Aviles-Rosa, M.T. DeChant, N.J. Hall, P.A. Prada-Tiedemann, Explosive odor signature profiling: A review of recent advances in technical analysis and detection, Forensic Sci Int 347 (2023). https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2023.111652.
- [27] M. Charles, D. Ruszkiewicz, E. Eckbo, E. Bryce, T. Zurberg, A. Meister, L. Aksu, L. Navas, R. Myers, The science behind the nose: correlating volatile organic

compound characterization with canine biodetection of COVID-19, ERJ Open Res (2024) 00007–02024. https://doi.org/10.1183/23120541.00007-2024.

- [28] Federica Pirrone, Patrizia Piotti, Massimo Galli, Roberto Gasparri, Aldo La Spina, Lorenzo Spaggiari, Mariangela Albertina, Sniffer dogs performance is stable over time in detecting COVID-19 positive samples and agrees with the rapid antigen test in the field, Nature (2023). https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-023-30897-1.
- [29] M.N. Maughan, E.M. Best, J.D. Gadberry, C.E. Sharpes, K.L. Evans, C.C. Chue, P.L. Nolan, P.E. Buckley, The Use and Potential of Biomedical Detection Dogs During a Disease Outbreak, Front Med (Lausanne) 9 (2022). https://doi.org/10.3389/fmed.2022.848090.
- [30] F. Soggiu, J. Sabbatinelli, A. Giuliani, R. Benedetti, A. Marchegiani, F. Sgarangella, A. Tibaldi, D. Corsi, A.D. Procopio, S. Calgaro, F. Olivieri, A. Spaterna, R. Zampieri, M.R. Rippo, Sensitivity and specificity of in vivo COVID-19 screening by detection dogs: Results of the C19-Screendog multicenter study, Heliyon 9 (2023). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15640.
- [31] Alison G. Simon, Analysis of non-hazardous canine training aids for triacetone triperoxide (TATP), Forensic Chemistry 30 (2022). https://doi.org/10.1016/j.forc.2022.100440.
- [32] K. Dettmer, W. Engewald, Adsorbent materials commonly used in air analysis for adsorptive enrichment and thermal desorption of volatile organic compounds, Anal Bioanal Chem 373 (2002) 490–500. https://doi.org/10.1007/s00216-002-1352-5.
- [33] N. Aguinaga, N. Campillo, P. Viñas, M. Hernández-Córdoba, Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in milk and related products using solidphase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry, Anal Chim Acta 596 (2007) 285–290. https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.06.005.
- [34] Ludovic Tuduri, Valérie Desauziers, Jean Louis Fanlo, Potential of Solid-Phase Microextraction Fibers for the Analysis of Volatile Organic Compounds in Air, J Chromatogr Sci 39 (2001). https://doi.org/https://doi.org/10.1093/chromsci/39.12.521.
- [35] N. Drabińska, C. Flynn, N. Ratcliffe, I. Belluomo, A. Myridakis, O. Gould, M. Fois, A. Smart, T. Devine, B.D.L. Costello, A literature survey of all volatiles from healthy human breath and bodily fluids: The human volatilome, J Breath Res 15 (2021). https://doi.org/10.1088/1752-7163/abf1d0.
- [36] M. Gallagher, C.J. Wysocki, J.J. Leyden, A.I. Spielman, X. Sun, G. Preti, Analyses of volatile organic compounds from human skin, British Journal of Dermatology 159 (2008) 780–791. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08748.x.
- [37] C.L. Jenkins, H.D. Bean, Dependence of the staphylococcal volatilome composition on microbial nutrition, Metabolites 10 (2020) 1–15. https://doi.org/10.3390/metabo10090347.
- [38] S. Chuachaina, I. Thaveesangsakulthai, P. Sinsukudomchai, P. Somboon, J. Traipattanakul, P. Torvorapanit, K. Chatdarong, C. Kulsing, T. Nhujak, Identification of Volatile Markers in Sweat for COVID-19 Screening by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, ChemistrySelect 9 (2024). https://doi.org/10.1002/slct.202304388.
- [39] M. Kanlayavattanakul, N. Lourith, Body malodours and their topical treatment agents, Int J Cosmet Sci 33 (2011) 298–311. https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2011.00649.x.

- [40] A.G. James, J. Casey, D. Hyliands, G. Mycock, Fatty acid metabolism by cutaneous bacteria and its role in axillary malodour, 2004.
- [41] H.J. Martin, M.A. Turner, S. Bandelow, L. Edwards, S. Riazanskaia, C.L.P. Thomas, Volatile organic compound markers of psychological stress in skin: A pilot study, J Breath Res 10 (2016). https://doi.org/10.1088/1752-7155/10/4/046012.
- [42] E. Gallego, F.J. Roca, J.F. Perales, X. Guardino, Comparative study of the adsorption performance of a multi-sorbent bed (Carbotrap, Carbopack X, Carboxen 569) and a Tenax TA adsorbent tube for the analysis of volatile organic compounds (VOCs), Talanta 81 (2010) 916–924. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.01.037.
- [43] S. Riazanskaia, G. Blackburn, M. Harker, D. Taylor, C.L.P. Thomas, The analytical utility of thermally desorbed polydimethylsilicone membranes for invivo sampling of volatile organic compounds in and on human skin, Analyst 133 (2008) 1020–1027. https://doi.org/10.1039/b802515k.
- [44] V. Cuzuel, Développement d'une stratégie de caractérisation chimique de la signature odorante d'individus par l'analyse chimiométrique de données issues de méthodes séparatives multidimensionnelles, n.d. https://tel.archivesouvertes.fr/tel-01680821v2.
- [45] Furton Kenneth G., Napoli James J., Identification of humans through characteristic compounds detected in human scent, 2007.
- [46] L.E. Degreeff, K.G. Furton, Collection and identification of human remains volatiles by non-contact, dynamic airflow sampling and SPME-GC/MS using various sorbent materials, Anal Bioanal Chem 401 (2011) 1295–1307. https://doi.org/10.1007/s00216-011-5167-0.
- [47] T. Koehler, I. Ackermann, D. Brecht, F. Uteschil, J. Wingender, U. Telgheder, O.J. Schmitz, Analysis of volatile metabolites from in vitro biofilms of Pseudomonas aeruginosa with thin-film microextraction by thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry, Anal Bioanal Chem 412 (2020) 2881– 2892. https://doi.org/10.1007/s00216-020-02529-4.
- [48] C. Starkenmann, Analysis and Chemistry of Human Odors, in: n.d.: pp. 921– 936.
- [49] K. Takeuchi, M. Yabuki, Y. Hasegawa, Review of odorants in human axillary odour and laundry malodour: The importance of branched C7 chain analogues in malodours perceived by humans, Flavour Fragr J 28 (2013) 223–230. https://doi.org/10.1002/ffj.3130.
- [50] M. Troccaz, C. Starkenmann, Y. Niclass, M. Van De Waal, A.J. Clark, 3-Methyl-3-sulfanylhexan-1-ol as a Major Descriptor for the Human Axilla-Sweat Odour Profile, (2004). https://doi.org/10.1002/cbdv.200490077.
- [51] A. Natsch, S. Derrer, F. Flachsmann, J. Schmid, A Broad Diversity of Volatile Carboxylic Acids, Released by a Bacterial Aminoacylase from Axilla Secretions, as Candidate Molecules for the Determination of Human-Body Odor Type, n.d.
- [52] S. Haze, Y. Gozu, S. Nakamura, Y. Kohno, K. Sawano, H. Ohta, K. Yamazaki<sup>2</sup>, 2-Nonenal Newly Found in Human Body Odor Tends to Increase with Aging, n.d.
- [53] Y. Liu, S.R. Cho, N.D. Danielson, Solid-phase microextraction and on-line Methylation gas chromatography for aliphatic carboxylic acids, Anal Bioanal Chem 373 (2002) 64–69. https://doi.org/10.1007/s00216-002-1271-5.
- [54] D. Shooter, N. Jayatissa, N. Renner, Volatile reduced sulphur compounds in butter by solid phase microextraction, Journal of Dairy Research 66 (1999) 115– 123. https://doi.org/10.1017/S002202999800329X.

- [55] G.A. Bagiyan, I.K. Koroleva, N. V Soroka, A. V Ufimtsev, B.P. Konstantinov, Oxidation of thiol compounds by molecular oxygen in aqueous solutions, 2003.
- [56] F. Dallo, D. Battistel, R. Piazza, J. Gabrieli, J.J. Filippi, N. Baldovini, C. Barbante, Direct immersion solid-phase microextraction with gas chromatography and mass spectrometry for the determination of specific biomarkers of human sweat in melted snow, J Sep Sci 39 (2016) 1300–1309. https://doi.org/10.1002/jssc.201501097.
- [57] D. Mana Kialengila, K. Wolfs, J. Bugalama, A. Van Schepdael, E. Adams, Full evaporation headspace gas chromatography for sensitive determination of high boiling point volatile organic compounds in low boiling matrices, J Chromatogr A 1315 (2013) 167–175. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.058.
- [58] A. Tangerman, Measurement and biological significance of the volatile sulfur compounds hydrogen sulfide, methanethiol and dimethyl sulfide in various biological matrices, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 877 (2009) 3366–3377. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.05.026.
- [59] M. Berthou, I. Clarot, J. Gouyon, D. Steyer, M.A. Monat, A. Boudier, A. Pallotta, Thiol sensing: From current methods to nanoscale contribution, Microchemical Journal 183 (2022). https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107994.
- [60] M. Berthou, Monitoring de S-nitrosothiols dans des matrices biologiques grâce à des sondes nanostructurées, 2022.
- [61] Célia BOUKOUFI, Caractérisation des propriétés catalytiques de nanoparticules d'or immobilisées, Université de Lorraine, 2023.
- [62] M. Berthou, A. Pallotta, J. Beurton, T. Chaigneau, A. Athanassiou, C. Marcic, E. Marchioni, A. Boudier, I. Clarot, Gold nanostructured membranes to concentrate low molecular weight thiols, a proof of concept study, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 1198 (2022). https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123244.
- [63] A.D. Subali, L. Wiyono, M. Yusuf, M.F.A. Zaky, The potential of volatile organic compounds-based breath analysis for COVID-19 screening: a systematic review & meta-analysis., Diagn Microbiol Infect Dis 102 (2022). https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115589.
- [64] M.M. McCartney, E. Borras, D.E. Rojas, T.L. Hicks, K.L. Hamera, N.K. Tran, T. Tham, M.M. Juarez, E. Lopez, N.J. Kenyon, C.E. Davis, Predominant SARS-CoV-2 variant impacts accuracy when screening for infection using exhaled breath vapor, Communications Medicine 2 (2022). https://doi.org/10.1038/s43856-022-00221-5.
- [65] Lucas Zhou, Samuel K. Ayeh, Vignesh Chidambaram, Petros C. Karakousis, Modes of transmission of SARS-CoV-2 and evidence for preventive behavioral interventions, BMC Infect Dis (2021). https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12879-021-06222-4.
- [66] R.A. van den Berg, H.C.J. Hoefsloot, J.A. Westerhuis, A.K. Smilde, M.J. van der Werf, Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data, BMC Genomics 7 (2006). https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142.
- [67] Y. Sekine, S. Sato, K. Kimura, H. Sato, S. Nakai, Y. Yanagisawa, Detection of tobacco smoke emanating from human skin surface of smokers employing passive flux sampler – GCMS system, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 1092 (2018) 394–401. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.038.

- [68] DAB.W, La sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives, in: La Sensibilité, La Spécificité et Les Valeurs Prédictives, Presses de l'EHESP, 2021: pp. 113– 117.
- [69] J. Crespo-Cajigas, V.A. Gokool, A. Ramírez Torres, L. Forsythe, B.S. Abella, H.K. Holness, A.T.C. Johnson, R. Postrel, K.G. Furton, Investigating the Use of SARS-CoV-2 (COVID-19) Odor Expression as a Non-Invasive Diagnostic Tool— Pilot Study, Diagnostics 13 (2023) 707. https://doi.org/10.3390/diagnostics13040707.
- C. Callewaert, M. Pezavant, R. Vandaele, B. Meeus, E. Vankrunkelsven, P. Van [70] Goethem, A. Plumacker, B. Misset, G. Darcis, S. Piret, L. De Vleeschouwer, F. Staelens, K. Van Varenbergh, S. Tombeur, A. Ottevaere, I. Montag, P. Vandecandelaere, S. Jonckheere, L. Vandekerckhove, E. Tobback, G. Wieers, J.C. Marot, K. Anseeuw, L. D'Hoore, S. Tuyls, B. De Tavernier, J. Catteeuw, A. Lotfi, A. Melnik, A. Aksenov, D. Grandjean, M. Stevens, F. Gasthuys, H. Guyot, Sniffing out safety: canine detection and identification of SARS-CoV-2 infection from armpit sweat. Front Med (Lausanne) 10 (2023). https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1185779.
- [71] N. Tungkijanansin, S. Phusrisom, K. Chatdarong, P. Torvorapanit, P. Sirinara, T. Nhujak, C. Kulsing, Gas chromatography-flame ionization detector for sweat based COVID-19 screening, Anal Chim Acta 1280 (2023). https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341878.
- [72] N. Tungkijanansin, R.T. Giebelhaus, S.A. Schmidt, T. Nhujak, K. Chatdarong, P. Torvorapanit, J.J. Harynuk, C. Kulsing, Identification of coronavirus disease marker compounds in sweat with comprehensive two dimensional gas chromatography using multiloop splitter-based non-cryogenic artificial trapping modulation system, Journal of Chromatography Open 5 (2024). https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2023.100113.
- [73] Hantz Sébastien, Diagnostic biologique de l'infection à Sars-CoV-2: stratégies et interprétation des résultats, Limoges, 2020.
- [74] R. Mahieu, V. Dubée, Diagnosis of SARS-CoV-2 infection: available tests and strategy in the Intensive Care Unit, Medecine Intensive Reanimation 30 (2021) 19–26. https://doi.org/10.37051/MIR-00076.
- C. Guest, S.Y. Dewhirst, S.W. Lindsay, D.J. Allen, S. Aziz, O. Baerenbold, J. [75] Bradley, U. Chabildas, V. Chen-Hussey, S. Clifford, L. Cottis, J. Dennehy, E. Foley, S.A. Gezan, T. Gibson, C.K. Greaves, I. Kleinschmidt, S. Lambert, A. Last, S. Morant, J.E.A. Parker, J. Pickett, B.J. Quilty, A. Rooney, M. Shah, M. Somerville, C. Squires, M. Walker, J.G. Logan, R. Jones, A. Assis, E. Borthwick, L. Caton, R. Edwards, J. Heal, D. Hill, N. Jahan, C. Johnson, A. Kaye, E. Kirkpatrick, S. Kisha, Z. Ledeatte Williams, R. Moar, T. Owonibi, B. Purcell, C. Rixson, F. Spencer, A. Stefanidis, S. Stewart, S. Tytheridge, S. Wakley, S. Wildman, C. Aziz, H. Care, E. Curtis, C. Dowse, A. Makepeace, S.A. Oultram, J. Smith, F. Shenton, H. Hutchins, R. Mart, J.A. Cartwright, M. Forsey, K. Goodsell, L. Kittridge, A. Nicholson, A. Ramos, J. Ritches, N. Setty, M. Vertue, M. Bergstrom, Z. Chaudhary, A. De Wilton, K. Gaskell, C. Houlihan, I. Jones, M. Margaritis, P. Miralhes, L. Owens, T. Rampling, H. Rickman, M. Boffito, C. Fernandez, B. Cotterell, A.M. Guerdette, G. Tsaknis, M. Turns, J. Walsh, L. Frankland, R. West, M. Holland, N. Keenan, H. Wassall, M. Young, J. Rangeley, G. Saalmink, S. Adlakha, P. Buckley, L. Allsop, S. Smith, D. Sowter, A. Campbell, J. Jones, S. Laird, S. O'toole, C. Ryan, J. Evans, J. Rand, N. Schumacher, T. Hazelton, A. Dodgson, S. Glasgow, D. Kadiu, O. Lopuszansky,

A. Oommen, J. Prabhu, M. Pursell, J. Turner, H. Walton, R. Andrews, I. Cruickshank, C. Thompson, T. Wainwright, A. Roebuck, T. Lawrence, K. Netherton, C. Hewitt, S. Shephardson, W.A. Crasto, J. Lake, R. Musanhu, R. Walker, K. Burns, A. Higham, J. Le Bas, N. Mackenzie, H. Thatcher, S. Beadle, S. Buckley, G. Castle, A. Fletcher, S. Holbrook, P. Kane, K. Lindley, T. Lowry, S. Lupton, S. Oddy, L. Slater, M. Sylvester, K. Agwuh, V. Maxwell, S. Ryder, K. Topham, O. Egbuniwe, R. Matthews, A. Arenas-Pinto, P. Prymas, A. Severn, A. Shaw, S. Begum, D. Lenton, J. Scriven, L. Leeman, K. Rudge, E. Storr, A. Alvarez, K. Forster, D. Hind, N. Cook, R. Peeling, P. Carey, A. Wilson, J. Davis, Using trained dogs and organic semi-conducting sensors to identify asymptomatic and mild SARS-CoV-2 infections: an observational study, J Travel Med 29 (2022). https://doi.org/10.1093/jtm/taac043.

- [76] N. Ochiai, J. Tsunokawa, K. Sasamoto, A. Hoffmann, Multi-volatile method for aroma analysis using sequential dynamic headspace sampling with an application to brewed coffee, J Chromatogr A 1371 (2014) 65–73. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.074.
- [77] M. Gadogbe, S.M. Ansar, G. He, W.E. Collier, J. Rodriguez, D. Liu, I.W. Chu, D. Zhang, Determination of colloidal gold nanoparticle surface areas, concentrations, and sizes through quantitative ligand adsorption, Anal Bioanal Chem 405 (2013) 413–422. https://doi.org/10.1007/s00216-012-6489-2.
- [78] M. Abumeeiz, L. Elliott, P. Olla, Use of Breath Analysis for Diagnosing COVID-19: Opportunities, Challenges, and Considerations for Future Pandemic Responses, Disaster Med Public Health Prep 16 (2022) 2137–2140. https://doi.org/10.1017/dmp.2021.317.
- [79] M. Zhou, Q. Wang, X. Lu, P. Zhang, R. Yang, Y. Chen, J. Xia, D. Chen, Exhaled breath and urinary volatile organic compounds (VOCs) for cancer diagnoses, and microbial-related VOC metabolic pathway analysis: a systematic review and meta-analysis, Int J Surg 110 (2024) 1755–1769. https://doi.org/10.1097/JS9.00000000000999.
- [80] J.N. Thomas, J. Roopkumar, T. Patel, Machine learning analysis of volatolomic profiles in breath can identify non-invasive biomarkers of liver disease: A pilot study, PLoS One 16 (2021). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260098.