



Prélèvement et analyse des composés organiques volatils dans l'air expiré : apport des microtechnologies et de la chromatographie multidimensionnelle

Thomas Chappuis

► To cite this version:

Thomas Chappuis. Prélèvement et analyse des composés organiques volatils dans l'air expiré : apport des microtechnologies et de la chromatographie multidimensionnelle. Chimie analytique. Université Paris sciences et lettres, 2018. Français. NNT : 2018PSLET035 . tel-02512281

HAL Id: tel-02512281

<https://pastel.hal.science/tel-02512281>

Submitted on 19 Mar 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres
PSL Research University

Préparée à l'ESPCI Paris

Prélèvement et analyse des composés organiques volatils dans l'air expiré, apport des microtechnologies et de la chromatographie multidimensionnelle

École doctorale n° 388

CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE ANALYTIQUE DE PARIS CENTRE

Spécialité Chimie analytique

Soutenue le 8 novembre 2018 par
Thomas **CHAPPUIS**

Dirigée par **Didier Thiébaut et
Bertrand Boursin**

COMPOSITION DU JURY :

M. Franck Launay, professeur
Sorbonne Université, président du jury,
examinateur

Mme Valérie Agasse, maitresse de
conférence, Université de Rouen Normandie,
rapporteuse

M. Jean-Paul Viricelle, professeur
Mines de Saint-Etienne, rapporteur

Mme Soumeia Bekri, professeure
CHU Rouen Normandie, examinatrice

Mme Emmanuelle Laurenceau, maitresse de
conférences, École centrale de Lyon,
examinatrice

M. Didier Thiébaut, directeur de recherche
ESPCI Paris, directeur de thèse

M. Bertrand Boursin
CEA LETI, co-directeur de thèse

M. Jérôme Vial, maître de conférences,
ESPCI Paris, membre invité

*Pas le temps pour les regrets
les erreurs n'appartiennent qu'à nous-mêmes,
né pour amener ma part de progrès*
—Lunatic

*Je pense pas à demain
parce que demain c'est loin*
—IAM

Résumé

L'air expiré présente un intérêt pour des applications médicales comme le dépistage, le suivi de pathologies ou d'expositions. En effet, cet échantillon contient des marqueurs volatils endogènes ou exogènes et son prélèvement est non invasif. Même si le prélèvement est simple, la complexité et la variabilité de l'air expiré expliquent le peu de tests autorisés par les autorités sanitaires.

Cette thèse s'est intéressée à deux outils analytiques pour l'analyse de l'air expiré : une puce de préconcentration et la chromatographie en phase gazeuse intégralement bidimensionnelle. Ces deux techniques, peu explorées jusqu'à présents dans ce domaine, peuvent présenter un intérêt en simplifiant le prélèvement et en permettant une analyse plus exhaustive des marqueurs

Le travail effectué sur la puce de préconcentration a montré que les micropréconcentrateurs fabriqués au laboratoire prélèvent et injectent des mélanges de gaz modèles et des échantillons d'air expiré avec des variabilités proches des systèmes de laboratoires. De plus, nos travaux ont montré que ces micropréconcentrateurs présentent deux avantages majeurs en réduisant les volumes d'échantillon nécessaires et en s'intégrant dans des systèmes simples, portables et fonctionnant sur batterie. Afin d'illustrer leur intérêt sur un cas réel simple, nous avons utilisé ces micropréconcentrateurs pour étudier trois marqueurs du tabagisme dans l'air expiré de trois fumeurs et de trois non-fumeurs et suivre les cinétiques de ces composés dans l'air expiré d'une personne. Finalement, nous avons effectué un travail préliminaire d'intégration dans des échantillonneurs dédiés afin d'exploiter les avantages des micropréconcentrateurs pour le prélèvement de l'air expiré et tenter d'obtenir un prélèvement sur une expiration unique.

Nous avons ensuite choisi et reproduit une architecture de modulateur fluidique simple, pertinente pour la miniaturisation, basée sur un Dean's switch. Nous avons montré que ce modulateur décrit en 2016 était compatible avec une injection par thermodésorption et comparé ses performances à la GC simple pour l'analyse d'un même échantillon d'air expiré. Ceci a montré que cette architecture présente un intérêt en modulant des composés exhalés très volatils ce qui permet de nombreuses levées de coélution. Finalement, nous avons

montré, grâce à des plans d'expériences, que l'amélioration des performances de ce modulateur nécessitait un contrôle minutieux des paramètres.

Enfin, nous avons confronté nos outils à des échantillons d'une malade atteinte d'une maladie rare, la phénylcétonurie. Des échantillons d'espace de tête d'urine et d'air expiré de la patiente ont été prélevés. Les résultats, incomplets à ce stade, sont discutés dans le manuscrit.

Remerciement

Malgré tous mes efforts, je n'ai pas réussi à éviter l'effet « liste de course » de la partie qui suit. Par avance, excusez-moi.

Tout d'abord, merci à celles et ceux que je vais oublier. L'absence de votre nom est ainsi compensée par l'honneur d'avoir été remercié en premier.

Cette thèse est le fruit d'une collaboration avec un trio d'encadrement. Merci à Bertrand pour sa présence pendant ces trois années et pour avoir pris des décisions et le temps de discuter lors des moments de doutes. Je ne retiendrai qu'une seule blague par présentation suffit largement, mais tu n'as jamais rien dit sur les remerciements de thèse. Merci au duo parisien composé de Didier et Jérôme, extrêmement différents mais particulièrement complémentaires. La dernière année aura été agitée, merci pour votre implication à tous les trois car sans vous, ce manuscrit n'aurait jamais existé.

Merci à tous les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail et pour les discussions qui ont suivi la défense. J'espère ce que cette thèse pluridisciplinaire aura présenté un intérêt dans chacun de vos domaines.

Ce travail est avant tout collectif. Sans les personnes suivantes, aucun des résultats présentés n'aurait jamais pu exister. Ainsi, je remercie Florence, Mohamed, Morgan, Anatole, Simon, Olivier, Manu, Amélie, François, Bruno, Vincent R, Martine, Catherine, Thomas, Charly et toutes les personnes qui travaillent en salle blanche. Une pensée spéciale à Bao An pour tous les trucs qu'il m'a transmis en électronique / bricolage / bidouille et son flegme qui mériterait d'être légendaire. Merci également à Florence pour m'avoir introduit dans le monde du labo gaz et avoir supporté ma manière différente de ranger ma paillasse.

Merci à Christelle Corne et Gérard Besson pour nous avoir ouvert les portes du CHU. Sans vous, ce travail aurait été beaucoup moins intéressant.

Thermodesorbeur : machine d'injection en GC dotée d'une volonté propre. Tombe souvent en panne quand on en a besoin. Heureusement que Roland était toujours disponible pour une réparation express ou un conseil téléphonique avisé.

La thèse est faite de moment de doutes. Merci à Perrine, Céline, Marianne, Élise, Nathan et Béatrice pour le soutien pendant ces périodes.

Un laboratoire de recherche connaît de nombreux départs et de nombreuses arrivées. Merci à Céline, Roxanne, Thibaut, Maxime, Giacomo, Vivian, Morgan, Claire, David, David, Clémentine, Morgane, Antoine, Éloïse, Charlotte, Maxime. Finalement, merci à tout le DTBS de m'avoir accueilli et supporté, les bureaux ne devraient plus connaître des invasions intempestives de lentilles, toiles d'araignées, boules de Noël et autres joyeusetés.

Merci à Aafke qui a relu deux fois ce manuscrit. Merci également à Manon qui a parsemé ses corrections de commentaires pédagogiques et motivants. Enfin, merci à Roxanne et Maxime pour la recherche d'ultimes coquilles. Si le nombre de fautes d'orthographe de ce manuscrit est acceptable, c'est grâce à vous.

La thèse c'est aussi ne pas y penser. Merci à Marianne et Élise, j'espère pouvoir continuer à être votre porteur d'eau. Merci à Nathan, Marie Laure, Nicolas, Cécile, Arthur, Delphine et Alice de m'avoir accepté comme colocataire. La batucada a représenté une bouffée d'air frais au cours de la troisième année, merci à celles et ceux qui permettent cela chaque semaine.

Enfin merci à celles et ceux qui sont venus voir ma soutenance pour ne pas comprendre grand-chose : Manon, Adèle, Eliot, Thibaut, Diola, Baptiste, Sarah, Francis, Stéphanie, Philippe, Laure, Martine, Fernando, Théo, Julia, Véro, Aafke, Oma.

Pour conclure, merci pour ces moments.

Table des matières

Introduction générale	25
1 L'analyse de l'air expiré, un problème complexe, étude bibliographique	33
1.1 Introduction : applications autorisées par les autorités sanitaires et utilisées en clinique.....	33
1.2 L'air expiré, un échantillon complexe et variable.....	35
1.2.1 Air expiré, définition.....	35
1.2.2 L'air expiré, un échantillon complexe.....	36
1.2.3 Variabilité de l'air expiré chez des individus sains	37
1.2.4 Facteurs influençant la composition de l'air expiré.....	40
1.2.4.1 Facteurs physiologiques	40
1.2.4.2 Facteurs environnementaux	42
1.2.5 L'air expiré, un échantillon complexe, conclusion.....	44
1.3 Prélèvement, préconcentration et analyse de l'air expiré.....	44
1.3.1 Prélèvement et préconcentration	44
1.3.1.1 Conditions de prélèvement.....	44
1.3.1.2 Partie de l'air expiré prélevée	46
1.3.1.3 Préconcentration	48
1.3.1.4 Propositions de standardisation du prélèvement.....	49
1.3.2 Analyse de l'air expiré	51
1.3.2.1 Chromatographies en phase gazeuse.....	51
1.3.2.2 Autres méthodes analytiques	52
1.4 Validations de marqueurs chez les individus malades	56
1.4.1 Méthodologie pour la découverte de marqueurs dans l'air expiré	56

1.4.2	Limites actuelle pour la validation de marqueurs dans l'air expiré	56
1.4.2.1	Variabilité de l'air expiré	56
1.4.2.2	Influence de l'air environnant	57
1.4.2.3	Existence de facteurs confondants	59
1.4.2.4	Taille des cohortes et validation externe	61
1.4.2.5	Spécificité des marqueurs	62
1.5	Conclusion, vers la chromatographie multidimensionnelle et la miniaturisation des systèmes analytiques	64
2	Miniaturisation du prélèvement sur puce	67
2.1	Introduction générale	67
2.2	La thermodésorption	68
2.2.1	Concept de la thermodésorption	68
2.2.2	Limites de la thermodésorption de laboratoire pour un instrument portable ...	69
2.3	Miniaturisation de la thermodésorption sur puce, étude bibliographique et résultats existants	73
2.3.1	Miniaturisation des systèmes analytiques	73
2.3.2	Les micropréconcentrateurs dans la littérature	75
2.3.2.1	Réduction de la consommation électrique.....	75
2.3.2.2	Simplification de l'architecture des systèmes	76
2.3.2.3	Utilisation des micropréconcentrateurs	77
2.3.3	Les micropréconcentrateurs pour l'analyse de l'air expiré	78
2.3.4	Les micropréconcentrateurs au laboratoire	82
2.3.4.1	Description du micropréconcentrateur	82
2.3.4.2	Première version du prototype	83
2.3.4.3	Deuxième version du prototype	84

2.3.4.4	Résultats existants	85
2.3.5	Conclusion sur les micropréconcentrateurs dans la littérature.....	86
2.4	Résultats expérimentaux : caractérisation du micropréconcentrateur et du système Primosamp sur mélanges modèles et échantillons réels	88
2.4.1	Introduction	88
2.4.2	Un prototype portable alimenté par batterie	88
2.4.2.1	Présentation du système Primosamp	88
2.4.2.2	Débogage du système Primosamp.....	90
2.4.3	Matériel et méthodes.....	92
2.4.3.1	Calcul des débits	92
2.4.3.2	Échantillonnage des gaz	92
2.4.3.3	Système de GC-MS.....	92
2.4.3.4	Injection avec Primosamp	93
2.4.3.5	Thermodésorption de laboratoire	93
2.4.4	Caractérisation du système Primosamp et comparaison à la thermodésorption de laboratoire pour l'analyse d'un mélange simple	93
2.4.4.1	Thermodésorption avec un système portable fonctionnant sur batterie ...	94
2.4.4.2	Consommation d'échantillon : micropréconcentrateur versus thermodésorption de laboratoire	96
2.4.4.3	Variabilité du prélèvement et de l'injection avec un micropréconcentrateur pour l'analyse de mélanges simples	98
2.4.4.4	Comparaison de la variabilité du micropréconcentrateur et de la thermodésorption de laboratoire pour l'analyse de mélanges simples	100
2.4.4.5	Variabilité de fabrication des puces.....	101
2.4.5	Préconcentration et injection d'air expiré avec un micropréconcentrateur et comparaison avec la thermodésorption de laboratoire	102

2.4.5.1	Variabilité du micropréconcentrateur pour la préconcentration et l'injection d'air expiré.....	102
2.4.5.2	Comparaison du micropréconcentrateur et du thermodésorbeur de laboratoire pour la préconcentration et l'injection d'air expiré.....	104
2.4.5.3	Quantité d'eau injectée, thermodésorption de laboratoire versus micropréconcentrateur	107
2.5	Conclusion du chapitre	109
3	Chromatographie intégralement bidimensionnelle pour l'analyse de l'air expiré	111
3.1	Introduction.....	111
3.2	Bibliographie.....	113
3.2.1	Chromatographie intégralement bidimensionnelle	113
3.2.1.1	Pourquoi la GC × GC.....	113
3.2.1.2	Principe de fonctionnement de la GC × GC	114
3.2.2	GC × GC pour l'analyse de l'air expiré	118
3.2.3	Les modulateurs en GC × GC.....	126
3.2.3.1	Les modulateurs cryogéniques	127
3.2.3.2	Modulateurs fluidiques.....	129
3.2.3.3	Choix d'une architecture de modulateur	133
3.2.3.4	Description du modulateur utilisé	134
3.2.4	Conclusion sur la partie bibliographique.....	137
3.3	Résultats expérimentaux	139
3.3.1	Matériel et méthode	139
3.3.1.1	Instrument de GC-MS	139
3.3.1.2	Mélange de molécules standards	139
3.3.1.3	Prélèvement d'air expiré	139
3.3.1.4	Injection en voie liquide	139

3.3.1.5	Injection par thermodésorption.....	139
3.3.1.6	Modulateur	140
3.3.1.7	Paramètres de GC-MS	140
3.3.1.8	Paramètres de GC × GC-MS.....	140
3.3.2	Duplication du modulateur	141
3.3.2.1	Mise en place du modulateur	141
3.3.2.2	Premiers résultats sur mélange de molécules simples.....	142
3.3.3	Couplage de la thermodésorption et de la GC × GC-MS	143
3.3.4	Analyse d'air expiré avec le modulateur reproduit	144
3.3.4.1	Analyse d'air expiré par GC × GC-MS.....	144
3.3.4.2	GC × GC-MS et GC-MS pour l'analyse des COV exhalés, comparaison	145
3.3.5	Étude de la robustesse du modulateur fluidique	151
3.3.5.1	Adaptation des paramètres pour une détection FID	151
3.3.5.2	Étude de la robustesse des paramètres de modulation	155
3.4	Conclusion du chapitre	157
4	Utilisation de la GC × GC et du micropréconcentrateur sur des cas réels	159
4.1	Introduction.....	159
4.2	Recherche de marqueurs de la phénylcétonurie dans l'air expiré.....	159
4.2.1	Introduction	159
4.2.2	Structure des marqueurs	160
4.2.3	Analyse des marqueurs purs.....	162
4.2.3.1	Analyse par GC	162
4.2.3.2	Essais d'analyse des marqueurs par GC × GC.....	167
4.2.4	Prélèvement sur Tenax.....	168
4.2.4.1	Influence du micropréconcentrateur sur la forme des pics	168

4.2.4.2	Étude du volume de fuite	170
4.2.5	Test sur des échantillons réels d'urine	171
4.2.5.1	Étude de l'espace de tête d'une solution d'eau dopée	172
4.2.5.2	Analyse d'un échantillon réel d'urine	174
4.2.6	Test sur échantillons d'air expiré d'une malade	176
4.2.6.1	Influence du prélèvement sur sac Tedlar	176
4.2.6.2	Analyse de l'air expiré d'une malade	178
4.2.7	Conclusion.....	179
4.3	Analyse des marqueurs du tabagisme dans l'air expiré avec un micropréconcentrateur.....	181
4.3.1	Introduction	181
4.3.2	Bibliographie	182
4.3.3	Résultats.....	188
4.3.3.1	Matériel et méthode.....	188
4.3.3.2	Blancs de puce et blancs de prélèvements	190
4.3.3.3	Recherche des marqueurs du tabagisme dans l'air expiré	194
4.3.3.4	Recherche des marqueurs du tabagisme	197
4.3.3.5	Cinétique des trois marqueurs dans l'air expiré d'un fumeur	201
4.3.4	Conclusion sur les marqueurs du tabagisme dans l'air expiré	204
4.4	Intégration du micropréconcentrateur dans un échantillonneur d'air expiré, stage de Morgan Cellier	206
4.4.1	Introduction	206
4.4.2	Une architecture basée sur le suivi du taux de CO ₂	207
4.4.2.1	Description du dispositif.....	207
4.4.2.2	Fabrication du dispositif	208

4.4.2.3	Résultats obtenus avec le dispositif	209
4.4.2.4	Retours sur l'utilisation du prototype	211
4.4.3	Avantages et inconvénient des systèmes existants.....	212
4.4.3.1	Analyse des dispositifs existants	212
4.4.3.2	Cahier des charges	214
4.4.4	Vers un prélèvement sur expiration unique	215
4.4.4.1	Description de l'architecture	215
4.4.4.2	Fabrication du dispositif basé sur un sac à trois voies	216
4.4.4.3	Résultats préliminaires avec des sacs Tedlar deux voies	217
4.4.5	Conclusion sur les échantillonneurs d'air expiré	221
	Conclusion générale et perspectives.....	225
	Références	231
	Annexes.....	259

Liste des communications

Communication orale

Thomas Hector Chappuis, Boa An Pham Ho, Manuel Alessio, Morgan Ceillier, Jean Francois Beche, Simon Sacchet, Bruno Truong, Amelie Bellemin Comte, Gérard Besson, Christelle Corne, Florence Ricoul, Jérôme Vial, Didier Thiébaut, Bertrand Bourlon.

Breath sampling on chip : tracking of tobacco markers, Présentation orale, ISC 2018, Septembre 2018, Cannes Mandelieu, France

Miniaturization of breath sampling with silicon chip: application to volatile tobacco markers analysis tracking, Présentation Orale, Breath Summit 2018, Juin 2018, Maastricht, Pays-Bas

Communication par poster

T. H. Chappuis, C. Corne, B. Pham Ho, F. Ricoul, O. Constantin, G. Besson, J. Vial, D. Thiébaut, B. Bourlon. Développement d'un scanner d'haleine haute résolution pour le diagnostic. Premiers travaux sur une pathologie modèle, la phénylcétonurie. Poster, réunion de printemps de la SFEIM, juin 2016, Grenoble, France

T. H. Chappuis, C. Corne, B. Pham Ho, F. Ricoul, O. Constantin, G. Besson, J. Vial, D. Thiébaut, B. Bourlon. Développement d'un scanner d'haleine haute résolution pour le diagnostic. Premiers travaux sur une pathologie modèle, la phénylcétonurie. Poster, journée de l'ED 388, mai 2016, Paris, France

Acte de conférences

Bourlon, B., B. A. P. Ho, F. Ricoul, T. Chappuis, A. Bellemin Comte, O. Constantin, et B. Icard. « Revisiting gas sampling and analysis with microtechnology: Feasability of low cost handheld gas chromatographs ». In 2016 IEEE SENSORS, 1 3, 2016.
<https://doi.org/10.1109/ICSENS.2016.7808672>.

Publication

Chappuis, Thomas Hector, Bao An Pham Ho, Morgan Ceillier, Florence Ricoul, Manuel Alessio, Jean-François Beche, Christelle Corne, Gérard Besson Jérôme Vial, Didier Thiébaut, Bertrand Bourlon « Miniaturization of Breath Sampling with Silicon Chip: Application to Volatile Tobacco Markers Tracking ». Journal of Breath Research, 2018. <https://doi.org/10.1088/1752-7163/aad384>.

Brevet

B. Bourlon, M. Cellier, T. Chappuis, « Système de prélèvement d'un échantillon d'air expiré par un être vivant », France 1852212, 14 mars 2018

Liste des abréviations

¹D : première dimension de séparation

1D: monodimensionnel

²D : deuxième dimension de séparation

2D: bidimensionnel

BTEX : benzène, toluène, éthylbenzène, xylène

COV : composé organique volatil

CV : coefficient de variation

GC: *gas chromatography*, chromatographie en phase gazeuse

GC × GC: chromatographie intégralement bidimensionnelle

Mix 4 : mélange de pentane d'heptane de toluène et d'octane

MS: *mass spectrometry*, spectrométrie de masse

ppmv : partie par million en volume, 10^{-6}

ppbv : partie par milliard en volume, 10^{-9}

pptv : partie par billion en volume, 10^{-12}

RSB : rapport signal sur bruit

SPME : *solid phase micro extraction*, micro extraction sur phase solide

TD : thermodésorption

TIC : *total ion current*, courant ionique total

μPC : micropréconcentrateur

Introduction générale

L'air expiré pour des applications biomédicales

Chaque minute, une personne au repos inspire et expire entre 12 et 20 fois. Ce processus permet de prélever le dioxygène nécessaire au fonctionnement du corps dans les poumons lors de l'inspiration et de rejeter le sous-produit que représente le dioxyde de carbone lors de l'expiration. L'air expiré est constitué majoritairement de diazote contenu dans l'air inspiré, de dioxyde de carbone excrété dans les poumons, de dioxygène non assimilé et d'eau. Le tableau 1 détaille les concentrations de ces composés.

Tableau 1. Composition moyenne des molécules majoritaires dans l'air inspiré et l'air expiré chez l'humain

	N ₂	O ₂	CO ₂	H ₂ O	COV
Air inspiré	79 %	21 %	< 0,2 %	0 - 5 %	< 1 %
Air expiré	75 %	13 %	≈ 5 %	6 %	< 1 %

Les composés organiques volatils, COV, constituent, quant à eux, moins de 1 % de l'air expiré [1]. La directive 1999/13/CE, relative à la réduction des émissions de composés organiques volatils dus à l'utilisation de solvants organiques dans certaines activités et installations du conseil européen définit les composés organiques volatils comme « tout composé organique ayant une pression de vapeur de 0,01 kPa ou plus à une température de 293,15 K ou ayant une volatilité correspondante dans les conditions d'utilisation particulières » et « tout composé contenant au moins l'élément carbone et un ou plusieurs des éléments suivants : hydrogène, halogène, oxygène, soufre, phosphore, silicium ou azote, à l'exception des oxydes de carbone et des carbonates et bicarbonates inorganiques » [2].

Depuis la première analyse des COV contenus dans l'air expiré en 1971 [3], de nombreuses études ont tenté d'établir un lien entre ces COV exhalés et certaines maladies afin d'utiliser cet échantillon biologique pour des applications biomédicales. En effet, les COV exhalés sont, entre autres, le reflet du métabolisme cellulaire. Ces COV sont produits directement dans les poumons ou bien par d'autres organes et transportés jusqu'aux poumons par le sang. En cas de dysfonctionnement, les types de COV produits ou la quantité pourraient varier et signaler des pathologies.

Les COV exhalés peuvent également être exogènes, produits par des bactéries ou des microorganismes, pathogènes [4] ou non [5], directement dans les poumons, ou ailleurs dans le corps et transportés par le sang jusqu'aux poumons.

Finalement, les COV exhalés peuvent aussi refléter l'exposome. Lorsqu'ils proviennent de l'environnement [6], ils peuvent être inspirés puis expirés directement. Ils sont également assimilables par la peau ou la nourriture et sont ensuite transportés jusqu'aux alvéoles pulmonaires par le sang. Lors du transport des COV par le sang, un transfert de phase a lieu dans les alvéoles pulmonaires et certaines molécules présentes dans le sang passent, en partie ou en totalité, dans la phase gazeuse en fonction de leurs propriétés physicochimiques.

Tirer parti de ces processus est possible afin de se servir de l'air expiré pour des applications biomédicales. En effet, les avantages potentiels de l'air expiré sont nombreux par rapport aux autres échantillons biologiques, sang, urine, selles, salive. Contrairement au prélèvement de ces derniers, celui de l'air expiré est à la fois non invasif, simple, peu pathogène, possible chez toutes les personnes et répétable à une fréquence élevée.

Plus généralement, en fonction des maladies ou du type d'exposition, différents types de marqueurs se retrouvent préférentiellement dans certains fluides biologiques au regard de leurs propriétés physicochimiques et du lieu de production ou d'assimilation [7,8]. L'utilisation de l'air expiré en complément des autres fluides biologiques ouvrirait le champ des possibilités en détectant et en analysant certains marqueurs plus aisément.

De fait, le suivi cinétique de processus biologiques par l'analyse de l'air expiré peut présenter un grand intérêt grâce à la fréquence de respiration qui varie entre 12 et 20 fois par minute au repos. Si une expiration suffit pour effectuer l'analyse, la résolution temporelle accessible est bien supérieure à celle des autres fluides biologiques.

Les avantages potentiels que nous venons de présenter expliquent les nombreux cas étudiés qui concernent en premier lieu les pathologies respiratoires. Des marqueurs sont proposés dans la littérature pour l'asthme [9–13], le cancer du poumon [14–16] ou la bronchopneumopathie chronique obstructive [17–19]. Des exemples existent également pour des infections pulmonaires dues à *Pseudomonas aeruginosa* [20–22] et pour la tuberculose [4,23,24]. Concernant les marqueurs proposés de maladies transportés par le sang et qui parviennent aux poumons, nous citerons le cancer du sein [25], le cancer de la thyroïde [26],

le diabète [27] et le cancer colorectal [28,29]. Cette liste ne se veut pas exhaustive et de nombreux autres exemples existent.

En dehors de maladies, l'analyse de l'air expiré permet également d'étudier l'exposome en recherchant, par exemple, directement les composés auxquels un individu a été exposé. C'est le cas pour certains COV dans les cigarettes [30–33], le propan-2-ol [34] ou le sévoflurane [34] en milieu hospitalier, ou l'acétonitrile en laboratoire de chimie [35]. Les métabolites de certains médicaments sont également détectables [36–38]. Finalement, une variation de profil de l'air expiré peut également être observée comme lors de l'exposition au diesel [39] ou à des rayonnements ionisants [40,41].

L'air expiré pour des applications biomédicales, un problème complexe

Malgré les avantages qui viennent d'être présentés et les nombreuses études qui semblent démontrer un lien entre la composition de l'air expiré et certaines maladies, très peu de tests sont actuellement autorisés et utilisés en clinique. De nombreux facteurs peuvent expliquer le peu de tests autorisés.

L'air expiré est un échantillon complexe qui peut contenir beaucoup de molécules. Le chiffre de 1000 COV revient souvent dans la littérature [7]. De plus, la structure de ces composés est variée [7] et les concentrations s'étendent de la partie par million en volume, ppmv, à la partie par billion en volume, pptv. En plus d'être complexe, l'air expiré présente une grande variabilité. De nombreux facteurs environnementaux et physiologiques influencent sa composition aussi bien au sein d'un groupe [42] que chez un individu unique : âge, poids, régime alimentaire, manière de respirer.

Le prélèvement et la préconcentration s'effectuent grâce à différentes méthodes [43]. Elles peuvent être très simples, souffler une seule expiration dans un sac, ou beaucoup plus compliquées, des masques de prélèvements avec des capteurs de CO₂ pour pomper directement l'échantillon sur des outils de préconcentration. Selon le mode de prélèvement, l'air extérieur contamine plus ou moins l'échantillon, ce qui complique beaucoup la gestion des données par la suite. Plus généralement, l'air environnant influence fortement la composition de l'air expiré et la gestion de cette influence, aussi bien lors du prélèvement que lors du traitement des données, reste complexe et peu standardisée.

Différentes approches existent pour l'analyse des COV [44–47]. Il s'agit principalement de chiens, de nez électronique, de capteurs simples pour une seule espèce, de méthodes de spectrométrie de masse directe ou de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, GC-MS. À part la GC-MS, aucune de ces méthodes d'analyse ne permet à la fois d'analyser ces mélanges très complexes, à des concentrations qui varient de la ppmv à la pptv, tout en identifiant les molécules contenues dans le mélange. Les chiens et les nez électroniques permettent de comparer des échantillons, mais pas d'obtenir la composition détaillée. Les capteurs spécifiques n'analysent que quelques molécules à la fois. Les méthodes de spectrométrie de masse directe présentent un intérêt pour analyser les composés les plus concentrés ou quelques composés spécifiques. Seule la GC-MS peut en partie résoudre la composition d'échantillons complexes comme l'air expiré. Cependant cet instrument reste un système de laboratoire et la composition de l'air expiré, environ 1000 composés, se situe aux limites de la capacité résolutive de la GC-MS.

Un dernier point bloquant réside dans la méthodologie utilisée pour déterminer des marqueurs de maladie dans l'air expiré. Cette méthodologie nécessite de comparer scrupuleusement les COV exhalés des groupes malades et des groupes sains pour faire ressortir des variables discriminantes. Cette méthode nécessite donc des outils analytiques large spectre, qui ne sont pas toujours mis en œuvre. La composition et la taille des groupes s'avèrent extrêmement importantes pour obtenir des informations valables et les études publiées ne répondent pas nécessairement à ces critères. De plus, la comparaison de résultats de différentes études s'avère impossible car les méthodes d'échantillonnage et d'analyse varient [48]. Même si des marqueurs sont proposés dans la littérature, les étapes de validation externe et de résolution des processus biochimiques sous-jacents ont rarement lieu. Pour finir, la spécificité des marqueurs ne semble pas évidente. En effet, des marqueurs identiques sont proposés pour différentes maladies [49] ce qui laisse penser que ces COV sont signe d'un état de santé dégradé plutôt que d'une pathologie spécifique.

Deux approches existent pour prélever l'air expiré. La première consiste à prélever la phase gazeuse émise lors de l'expiration qui permet d'échantillonner préférentiellement les molécules les plus volatiles. L'analyse de ces échantillons s'effectue majoritairement par des techniques en phase gazeuse. La seconde approche consiste à prélever le condensat de l'air expiré. Le refroidissement de l'air expiré fait condenser cet échantillon très concentré en eau

dans la phase vapeur. Des techniques analytiques en phase liquide suivent principalement ce mode de prélèvement. Comme le savoir-faire et les briques technologiques du laboratoire au sein du LETI se concentrent sur des systèmes de chromatographie en phase gazeuse, nous nous sommes concentrés sur l'analyse des COV.

Objectif de cette thèse et organisation du manuscrit

Au milieu de ce problème complexe, cette thèse porte sur le développement et l'utilisation de nouveaux outils analytiques pour l'analyse de l'air expiré. Ainsi, durant cette thèse, nous avons spécifiquement étudié l'intérêt de deux techniques peu utilisées pour l'analyse des COV exhalés alors que nous pensons qu'elles pourraient présenter un grand intérêt pour résoudre certains points qui bloquent le développement de l'analyse de l'air expiré. Il s'agit du prélèvement et de la préconcentration sur micropréconcentrateur, μ PC, et l'analyse par chromatographie intégralement bidimensionnelle, GC $\times$ GC.

Les μ PC permettent de miniaturiser l'étape de prélèvement et d'injection [50] et pourraient, à terme, représenter une technologie clé dans le développement d'un système portable d'analyse de l'air expiré. Comme dans la microélectronique, la miniaturisation des systèmes analytiques permet de diminuer l'encombrement, les coûts et les volumes d'échantillons nécessaires. Ce dernier paramètre pourrait permettre des prélèvements sur une seule expiration. De manière générale, peu de travaux ont étudié l'intérêt des microtechnologies pour l'analyse des COV dans l'air expiré.

La GC $\times$ GC constitue la technique de référence pour l'analyse de mélanges gazeux extrêmement complexes [51] et pourrait s'avérer très utile pour élucider la composition de l'air expiré. En effet, couplée à la spectrométrie de masse, elle permet d'atteindre des capacités de pics de l'ordre de la dizaine de milliers. Au début de cette thèse, en 2015, une dizaine de publications existait à propos de l'utilisation de la GC $\times$ GC pour l'analyse de l'air expiré [40,41,52–59].

Ce manuscrit est organisé autour de quatre chapitres pour expliquer l'intérêt des μ PC et de la GC $\times$ GC pour l'analyse de l'air expiré et présenter les résultats obtenus avec ces deux techniques durant cette thèse.

Le premier chapitre sera consacré à une étude générale de la littérature existante à propos de l'analyse de l'air expiré et fera ressortir de manière générale, les points qui limitent

actuellement l'utilisation de l'air expiré pour les analyses biomédicales. Pour plus de clarté et pour alléger ce chapitre, l'état de l'art concernant spécifiquement les μ PC, la GC $\times$ GC et les différentes applications sont renvoyés dans les chapitres respectifs les concernant. Néanmoins, nous nous sommes efforcés de différencier clairement les études bibliographiques de nos résultats.

Le deuxième chapitre sera dédié à la caractérisation d'un μ PC développé au sein du laboratoire et à la présentation des résultats obtenus avec ce dispositif durant cette thèse. Avant de présenter ces résultats, nous décrirons les avantages sur le plan de l'architecture et de la consommation électrique permis par l'utilisation des μ PC grâce à une étude de la littérature. Nous montrerons également que malgré ces avantages, très peu de résultats existent pour l'analyse de l'air expiré en utilisant des μ PC. Enfin, nous présenterons des résultats obtenus durant cette thèse qui montreront que les μ PC permettent de préconcentrer et d'injecter des échantillons modèles et des échantillons réels d'air expiré dans des systèmes de GC-MS avec des performances proches des méthodes de laboratoire comme la thermodésorption, TD. Nous montrerons également que les μ PC peuvent être intégrés dans un système portable qui fonctionne sur batterie et qu'ils permettent de réduire le volume d'échantillon nécessaire pour obtenir des résultats proches de la TD. Ce dernier avantage s'avère spécialement intéressant pour l'analyse d'échantillons biologiques.

Dans le troisième chapitre, nous décrirons l'utilisation d'une méthode de GC $\times$ GC pour augmenter l'espace de séparation disponible pour l'analyse de l'air expiré. Nous commencerons par lister les avantages de la GC $\times$ GC, puis une étude des résultats décrits dans la littérature montrera que, malgré ses avantages, cette technique demeure peu utilisée pour l'analyse de l'air expiré. Finalement, nous justifierons le choix d'une architecture très simple mais peu commune de modulateur fluidique récemment décrit dans la littérature par une explication des différents processus de modulations possibles en GC $\times$ GC et par les thématiques de recherche du laboratoire. Nous comparerons cette méthode de modulation à une séparation simple. Cela montrera que ce modulateur permet bien d'augmenter l'espace de séparation, même pour les molécules très volatiles contenues dans l'air expiré. Nous décrirons ensuite le travail effectué pour tenter d'améliorer les performances de ce modulateur en utilisant des plans d'expériences et conclurons sur le travail qu'il reste à

accomplir pour que les performances de ces systèmes simples atteignent celles des systèmes de laboratoire.

Enfin, le dernier chapitre montrera l'utilisation de la GC × GC et des μ PC pour l'analyse de l'air expiré grâce à deux exemples pour lesquels les marqueurs sont déjà décrits. Nous commencerons par une première illustration de l'utilisation des μ PC et de la GC × GC pour l'analyse de marqueurs de la phénylcétonurie dans l'air expiré et l'urine d'une patiente atteinte de phénylcétonurie. Nous présenterons ensuite des résultats obtenus pour la recherche de marqueurs du tabagisme dans l'air expiré de fumeurs et de non-fumeurs en utilisant le μ PC pour le prélèvement et l'injection d'échantillon dans un système de GC-MS. Des résultats de cinétiques des marqueurs après la consommation d'une cigarette par un fumeur seront également présentés. Nous finirons par décrire le travail préliminaire d'intégration du μ PC dans un système d'échantillonnage dédié à l'air expiré.

1 L'analyse de l'air expiré, un problème complexe, étude bibliographique

1.1 Introduction : applications autorisées par les autorités sanitaires et utilisées en clinique

L'analyse de l'air expiré semble très prometteuse en raison de la simplicité du prélèvement et des nombreuses applications possibles citées dans l'introduction générale. Malgré cela, les autorités sanitaires comme la FDA autorisent peu de tests. Le tableau 1.1 résume les tests approuvés en présentant l'application et les molécules marqueurs utilisées.

Tableau 1.1. Tests médicaux basés sur l'analyse d'air expiré autorisés par des autorités sanitaires, adapté de [60]

Test	Molécules
Détection d' <i>Helicobacter pylori</i> par l'urée marquée ^{13}C [61]	$^{13}\text{CO}_2$
Jaunisse néonatale [62]	CO
Adsorption déficiente des disaccharides	H_2 , CH_4
Suivi des traitements de l'asthme [63,64]	NO
Détection du rejet de transplantation cardiaque [65,66]	Alcanes
Test respiratoire fumeurs [67,68]	CO
Contrôle routier	Éthanol

L'injection d'urée marquée au ^{13}C permet la détection d'*Helicobacter pylori*. En effet, la bactérie dégrade l'urée marquée ^{13}C en $^{13}\text{CO}_2$ excrété par l'air expiré. En présence de la bactérie, le profil isotopique du dioxyde de carbone dans l'air expiré est modifié.

Le test respiratoire des fumeurs et les contrôles routiers d'alcoolémie constituent un exemple de détermination d'exposition à un facteur environnemental, respectivement le tabac et l'alcool. Le suivi du NO chez les asthmatiques aide à déterminer l'efficacité des traitements et de prévoir les prochaines crises. L'analyse des alcanes contenus dans l'air expiré permet de détecter le rejet de transplantation cardiaque car ils sont des marqueurs de stress oxydatif important.

Les tests autorisés décrits dans le tableau 1.1 concernent uniquement quelques molécules simples et quelques maladies alors que la littérature décrit beaucoup plus de diversité dans la composition de l'air expiré et dans ses applications. En réalité, la validation des marqueurs proposés dans la littérature a rarement lieu [49]. Ce chapitre, fondé sur une étude de la littérature, tentera de faire ressortir, de manière générale, les problèmes qui limitent actuellement l'utilisation de l'air expiré comme fluide biologique pour les analyses biomédicales.

Dans ce chapitre, nous commencerons par une description plus détaillée de l'air expiré, de sa complexité et des sources de variabilité. Nous détaillerons ensuite les méthodes analytiques utilisées, du prélèvement à l'analyse, et montrerons que la majorité d'entre elles présentent des limitations pour l'analyse de cet échantillon complexe. Puis nous montrerons que la validation de marqueurs de maladie ou d'exposition dans l'air expiré est un processus complexe et que de nombreux paramètres limitent cette validation. Nous expliquerons enfin comment les développements analytiques que nous proposons autour de la chromatographie multidimensionnelle et de la miniaturisation du système de prélèvement et de préconcentration pourraient répondre à certains problèmes qui ralentissent le développement de l'analyse de l'air expiré pour des applications biomédicales.

1.2 L'air expiré, un échantillon complexe et variable

1.2.1 Air expiré, définition

Les échanges qui ont lieu dans les alvéoles pulmonaires et qui permettent la respiration expliquent la constitution de l'air expiré en deux parties. La première correspond au volume de gaz contenu dans les voies aériennes, pharynx, trachée, bronches et bronchioles. Ce volume de gaz ne subit pas les échanges dans les alvéoles pulmonaires et possède une composition proche de celle de l'air inspiré, c'est-à-dire de l'air environnant. La seconde partie correspond au volume de gaz qui accède aux alvéoles pulmonaires et subit les échanges avec le sang. Cette seconde partie est enrichie en dioxyde de carbone, appauvrie en dioxygène et contient des COV relargués par le sang. Cependant, lors de l'expiration, les deux parties peuvent se mélanger. Les termes appropriés sont donc «air de début d'expiration» et «air de fin d'expiration» [43], même si le terme impropre «air alvéolaire» peut encore apparaître dans certains documents. Pour une meilleure visualisation, la figure 1.1 présente un schéma simplifié du système respiratoire. L'air de début d'expiration est contenu dans les organes indiqués en rouge, l'air de fin d'expiration est contenu dans les alvéoles pulmonaires indiqués en vert.

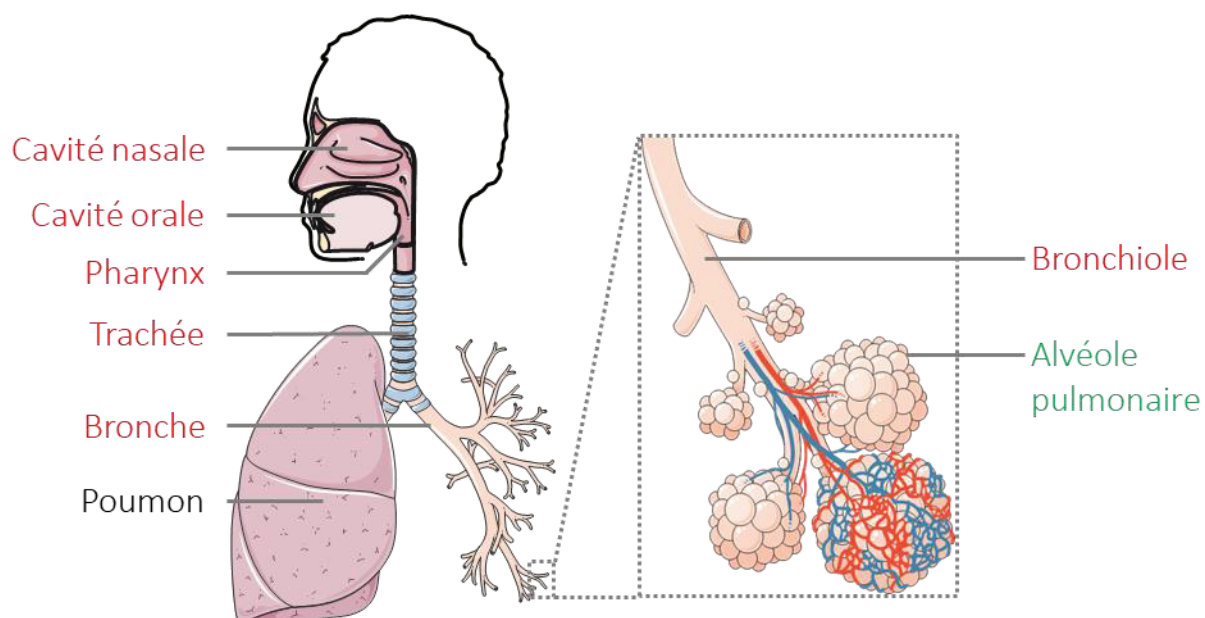


Figure 1.1. Schéma simplifié de l'appareil respiratoire; l'air contenu dans les organes en rouge représente l'air de début de respiration, l'air contenu dans les alvéoles pulmonaires, en vert, représente l'air de fin de respiration

Ces deux parties peuvent être différenciées en mesurant la concentration du dioxyde de carbone dans l'air expiré. L'air de fin d'expiration subit les échanges gazeux avec le sang et

contient donc plus de dioxyde de carbone que l'air de début de respiration. La figure 1.2 montre un exemple d'évolution du taux de dioxyde de carbone au cours de la respiration.

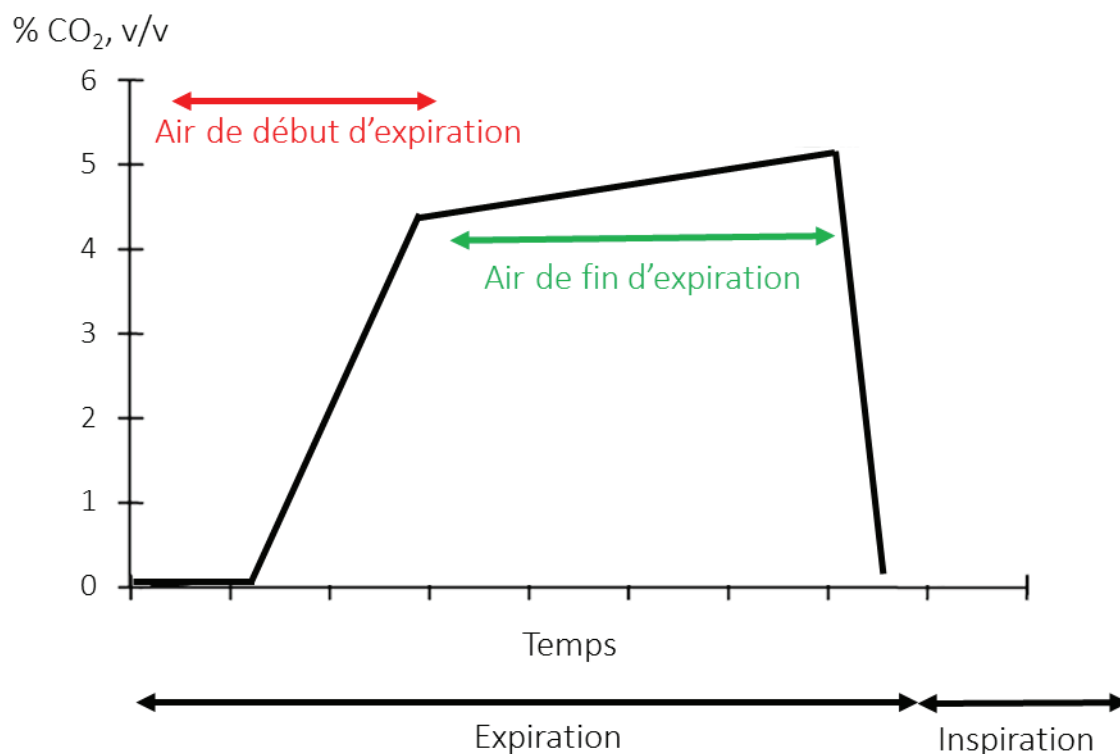


Figure 1.2. Exemple de concentration en CO₂ dans l'air expiré au cours du temps explicitant la séparation entre air de début et de fin d'expiration en fonction du taux de CO₂ d'après [69]

L'air inspiré contient peu de CO₂ ce qui explique la faible concentration au début de l'expiration. La concentration augmente au cours de l'expiration jusqu'à atteindre un plateau qui correspond à l'air de fin de respiration. Les concentrations maximales en CO₂ varient d'une personne à l'autre ainsi que la durée de l'expiration.

Au repos, une expiration normale représente un volume d'environ 400 à 600 ml. Ce volume se répartit à peu près de manière égale entre air de début et de fin d'expiration. En fonction du processus qui est étudié, il peut être plus intéressant de prélever l'air de début d'expiration, ou de fin d'expiration, ou un mélange des deux de manière indifférenciée.

1.2.2 L'air expiré, un échantillon complexe

Les multiples sources des COV dans l'air expiré, respiration cellulaire, microorganismes, environnement, peuvent expliquer le grand nombre de molécules retrouvées ainsi que la grande gamme de concentration et la diversité des structures chimiques. Un article de revue de 2014 [7] référençant tous les COV retrouvés dans les fluides biologiques chez l'humain fait

état de 872 COV différents détectés dans l'air expiré. Les concentrations varient de la centaine de ppmv à quelques pptv. La figure 1.3 montre la diversité des structures chimiques des molécules retrouvées dans l'air expiré.

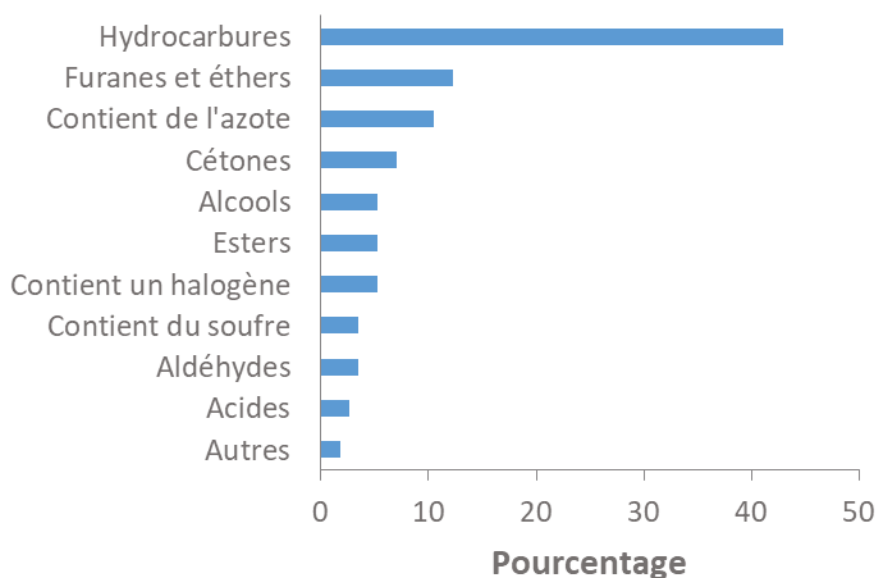


Figure 1.3. Répartition des molécules contenues dans l'air expiré selon les fonctions chimiques présentes, d'après [7]

Parmi ces 872 molécules, l'injection de la molécule pure en plus de la spectrométrie de masse a permis de confirmer 200 structures. Les structures des molécules restantes doivent être considérées avec plus de précautions, elles sont proposées en effet uniquement grâce à la spectrométrie de masse et la confrontation à des bases de données de spectres. Ces résultats illustrent cependant bien la diversité et la complexité de la composition de l'air expiré.

1.2.3 Variabilité de l'air expiré chez des individus sains

La connaissance de la composition normale de l'air expiré constitue la première étape nécessaire pour la validation de marqueurs dans l'air expiré. Différentes études se sont intéressées à la répartition de ces molécules au sein d'une population et à la variabilité des concentrations au sein d'une population et chez des individus uniques.

Une première étude de 1999 proposait 3000 COV différents au sein d'une population de 50 personnes avec seulement 27 COV communs à tous les individus [70]. Cependant, le chiffre de 3000 paraît élevé au regard des études publiées depuis. Une étude de 2014 décrit 1270 COV dans un groupe composé de 47 personnes saines [57]. Parmi ces 1270 COV, 129 sont détectés chez au moins 50 % des personnes et 41 chez toutes les personnes. Une autre étude

de 2013 [56] détecte 2000 COV différents dans un groupe de 34 personnes saines. Parmi ces 2000 COV, seuls 48 sont retrouvés chez plus de 90 % des personnes. Une autre étude de 2013 [71] trouve 37 COV communs à l'air expiré de 30 personnes. Le nombre total de COV détectés dans l'air expiré n'est pas précisé. Le détail des molécules communes n'est pas toujours présenté et ne permet donc pas de connaître les recouvrements des molécules communes entre ces études. Une dernière étude effectuée sur 13 babouins [72] trouve 1059 COV uniques parmi lesquels 148 sont retrouvés chez chacun des treize individus. Parmi ces 148 COV, les auteurs en considèrent 72 comme étant des contaminants ou d'origine non biologique. Ainsi, la composition des COV dans l'air expiré présente une grande variabilité entre individus : peu de COV sont détectés chez tous les individus alors que de nombreux COV sont retrouvés.

D'autres études s'intéressent à la concentration des COV communs à une population [73–82]. Elles démontrent l'existence de larges gammes de concentrations pour un même composé au sein d'une population supposément saine pour l'éthanol, l'acétone, l'isoprène, l'acétonitrile, le diméthylsulfure, l'ammoniac, le propanol ou l'acétaldéhyde. Par exemple, la concentration en acétone varie entre 100 et 1300 partie par milliard volumique, ppbv, pour une population de 68 individus dans une première étude [74]. Elle varie entre 110 et 2900 ppbv, pour une population de 200 enfants âgés de 6 et 17 ans [79] dans une deuxième étude, et entre 100 et 1000 ppbv, pour une cohorte de 26 adultes [80] dans une troisième étude. L'existence d'une large gamme de concentrations au sein d'une population ne représente pas un problème en soi. Cela nécessite de connaître la variabilité normale, mais ces gammes ne sont pour l'instant déterminées que pour quelques COV.

D'autres études se sont également intéressées à la variation des concentrations de certains composés au cours du temps chez un même individu [82]. Chez un individu les variations de concentration des molécules communes dans l'air expiré sont faibles à une échelle de temps de l'ordre de la minute, mais beaucoup plus grandes lorsque ces molécules sont analysées durant plusieurs jours. La figure 1.4 illustre ces phénomènes pour six molécules. D'autres études décrivent le même genre de comportement [77,81,83–86].

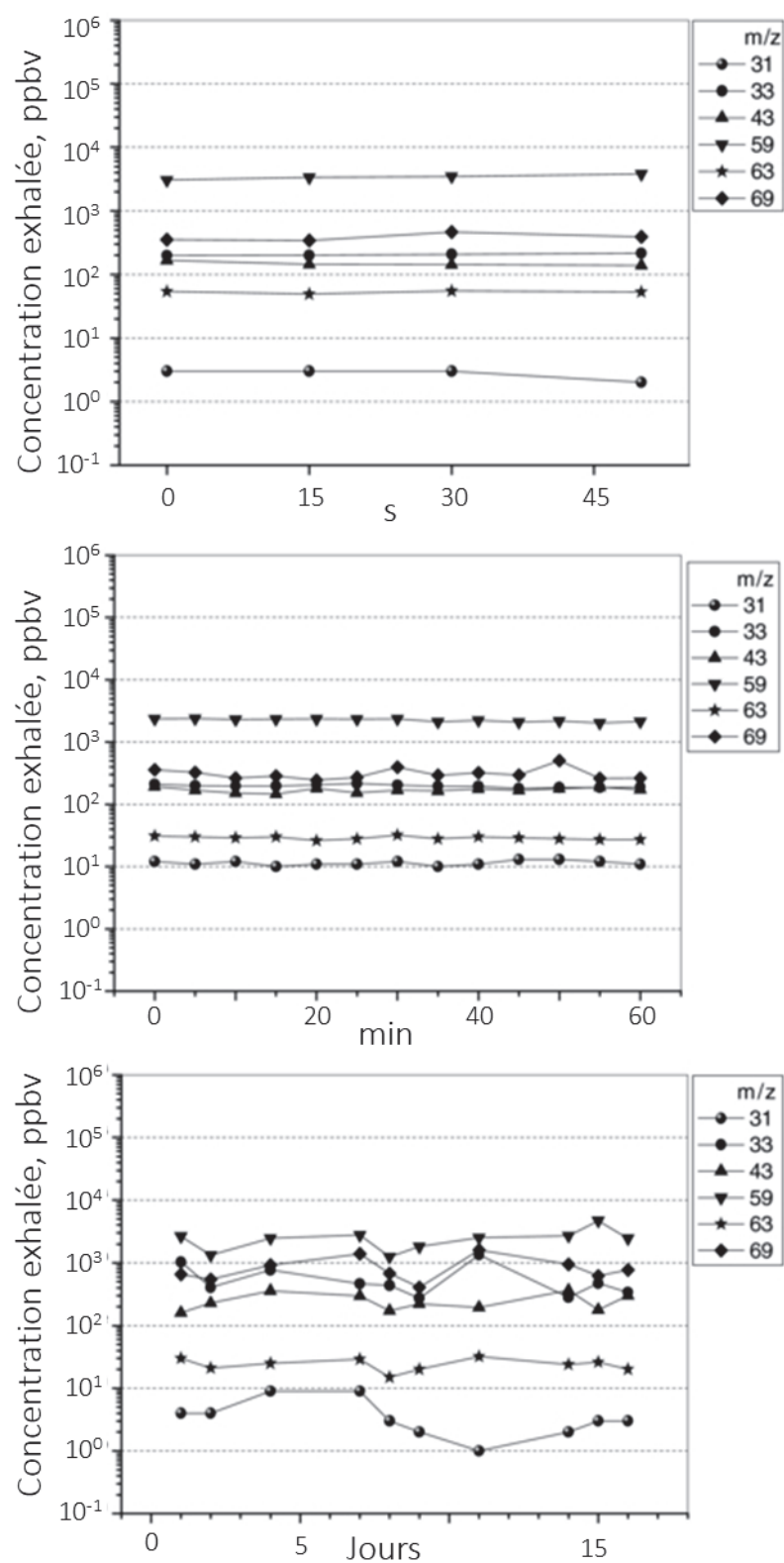


Figure 1.4. Suivi des ions 31, 33, 43, 59, 63, et 69 par *Selected Ion Flow Tube-MS* au cours du temps chez un individu unique. Les ions observés sont respectivement attribués au formaldéhyde, méthanol, propanol, acétone, cluster d'acétaldéhyde, isoprène. Ces trois figures montrent la variabilité au cours du temps de ces composés chez un individu unique, adapté de [82].

Ainsi les COV retrouvés dans l'air expiré varient beaucoup au sein d'une population, avec un grand nombre de molécules retrouvées, mais peu de COV sont communs à tous les individus. Parmi les COV communs, une grande variabilité des concentrations est observée au sein des populations avec jusqu'à trois ordres de grandeur de différence dans le cas de l'acétone par exemple. De plus, même chez une personne unique la variabilité des concentrations au cours du temps de certaines molécules peut être importante et représenter jusqu'à un ordre de grandeur. Cette variabilité peut compliquer la détermination de marqueurs de maladie. De plus, son importance, observée aussi bien au sein d'une population que chez un individu, suggère l'influence de nombreux facteurs environnementaux et physiologiques. C'est pourquoi la partie suivante s'intéresse à l'influence de différents facteurs sur la composition en COV dans l'air expiré.

1.2.4 Facteurs influençant la composition de l'air expiré

1.2.4.1 Facteurs physiologiques

L'étude indépendante de l'influence des facteurs environnementaux et physiologiques s'avère souvent complexe. Pour limiter l'influence possible de facteurs environnementaux et s'intéresser uniquement aux facteurs physiologiques, des chèvres ont été élevées dans des conditions identiques et leurs COV exhalés ont été analysés pendant un an [87]. Pour cela, toutes les chèvres sont élevées dans le même hangar et reçoivent la même nourriture. La figure 2.2 présente l'échantillonneur spécifique développé pour cette étude.

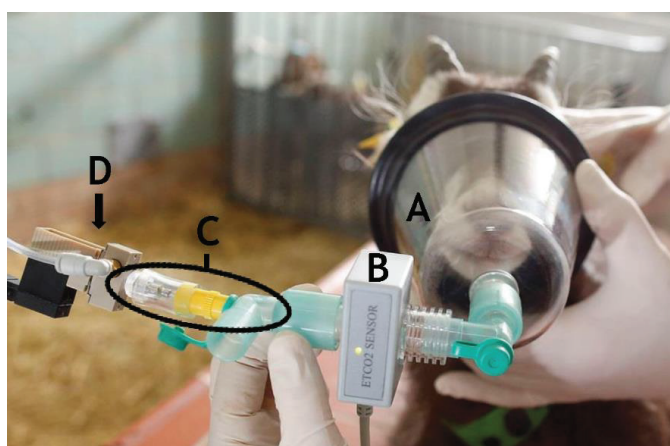


Figure 1.5. Échantillonneur d'air expiré pour chèvre, composé de, A un masque, B un capteur de CO₂, C un système de préconcentration, D une vanne asservie au taux de CO₂, adapté de [87]

Les concentrations de certains COV dans l'air expiré de ces chèvres sont présentées dans le tableau 1.2. L'existence de gammes de concentration montre une différence de concentration dans l'air expiré pour plusieurs molécules. Ainsi, même en imposant des

paramètres environnementaux identiques, les concentrations de certaines molécules retrouvées dans l'air expiré présentent une certaine variabilité. Dans cette étude, Fischer et coll. tentent de relier ces variations à des variations des paramètres sanguins comme la concentration en glucose, la concentration en albumine et la concentration totale en protéine.

Tableau 1.2. Concentration de certains COV mesurés dans l'air expiré de chèvres au cours du temps. Les concentrations sont exprimées sous la forme « valeur médiane (gamme) ». Le nombre de mesures varie en fonction des semaines, car le prélèvement chez toutes les chèvres n'était pas toujours possible. Seules les molécules dont les concentrations sont considérées comme statistiquement différentes entre les individus sont présentées. Adapté de[87].

Concentration en COV, valeur médiane (gamme), ppbv							
	Semaine 4, n = 15	Semaine 8, n = 11	Semaine 21, n = 13	Semaine 32, n = 8	Semaine 36, n = 10	Semaine 44, n = 7	Semaine 51, n = 7
Hexanal	0,9 (0,4)	0,55 (0,7)	0,81 (0,4)	0,51 (0,3)	0,32 (0,1)	0,61 (0,46)	0,62 (0,48)
Nonanal	4,4 (3,4)	3,4 (4,4)	2,4 (1,8)	1,7 (2,7)	0,94 (0,92)	2,2 (3,0)	3,5 (2,1)
Acétone	24 (31)	26 (24)	40 (29)	47 (47)	30 (16)	23 (15)	26 (23)
2-Butanone	0,4 (0,7)	0,5 (0,37)	1 (2,1)	0,63 (0,52)	0,76 (1,1)	0,59 (0,59)	0,44 (0,31)
Benzène	0 (0,7)	0 (0,81)	0,52 (0,67)	0,59 (0,74)	1 (1,2)	0,78 (0,47)	0 (0,83)
Styrène	1,5 (12)	0,61 (2,2)	0,03 (3,1)	0,12 (1,1)	0,21 (4,3)	0,13 (0,65)	0,06 (0,70)

Pour certaines molécules, comme le styrène, la concentration est considérée comme statistiquement différente au cours du temps. En vieillissant, les chèvres n'émettent plus la même quantité de certains COV. Le sevrage pourrait expliquer le changement de profil de COV dans l'air expiré, par le passage d'un régime alimentaire à base de lait à un régime alimentaire à base de fourrage. L'intérêt de cette étude réside dans le fait qu'elle permet en partie de décorrélérer facteurs physiologiques et facteurs environnementaux.

D'autres études analysent l'air expiré d'animaux élevés dans des conditions proches. Par exemple, des primates [72,88] et des souris [89] élevés dans le même laboratoire présentent peu de molécules en commun par rapport au nombre de COV identifiés pour les groupes. De nouveau, dans ces études une grande variabilité existe dans la composition de l'air expiré alors que ces animaux sont élevés dans des conditions proches. La question de la validité du modèle caprin ou primate et le petit nombre d'individus, entre sept et quinze, tempèrent

cependant l'impact des conclusions. Évidemment, ce genre d'étude serait plus complexe à mener chez des humains.

D'autres paramètres physiologiques semblent influencer la composition de l'air expiré : sexe [42,57,90], cycle menstruel [91], manière de respirer [92], débit expiratoire [93], âge [76,79], intensité de l'activité physique [86,94].

1.2.4.2 Facteurs environnementaux

Comme évoqué dans l'introduction générale, les COV exhalés permettent d'étudier l'exposition à des facteurs environnementaux. Plus généralement, différents facteurs environnementaux semblent influencer la composition des COV dans l'air expiré.

Différents médicaments peuvent se retrouver directement ou sous forme de métabolites dans l'air expiré. C'est le cas du salbutamol [37] ou de l'acide valproïque [36]. Des anesthésiants comme le fentanyl [95] le propofol [96–99] et le sévoflurane [34,96,100] sont également retrouvés dans l'air expiré.

D'autres médicaments, comme les anti-inflammatoires et les antihypertenseurs semblent modifier le profil général de l'air expiré [42]. Ces médicaments n'entraînent pas l'apparition d'un marqueur spécifique mais ils modifient le profil des COV exhalés. Cependant, l'étude précise également qu'il est pour le moment complexe de savoir si c'est la maladie ou la médication qui entraîne la modification du profil des COV dans l'air expiré.

La prise de nourriture peut modifier à court terme la concentration de certaines molécules dans l'air expiré. Encore chez des chèvres, six COV présentent des concentrations considérées comme statistiquement différentes avant et après un repas [101].

De manière plus spécifique, la consommation d'aspartame entraîne une augmentation du méthanol dans l'air expiré. En effet, l'hydrolyse de l'aspartame produit du méthanol excrété par l'air expiré [102]. La figure 1.6 illustre ce propos pour trois personnes.

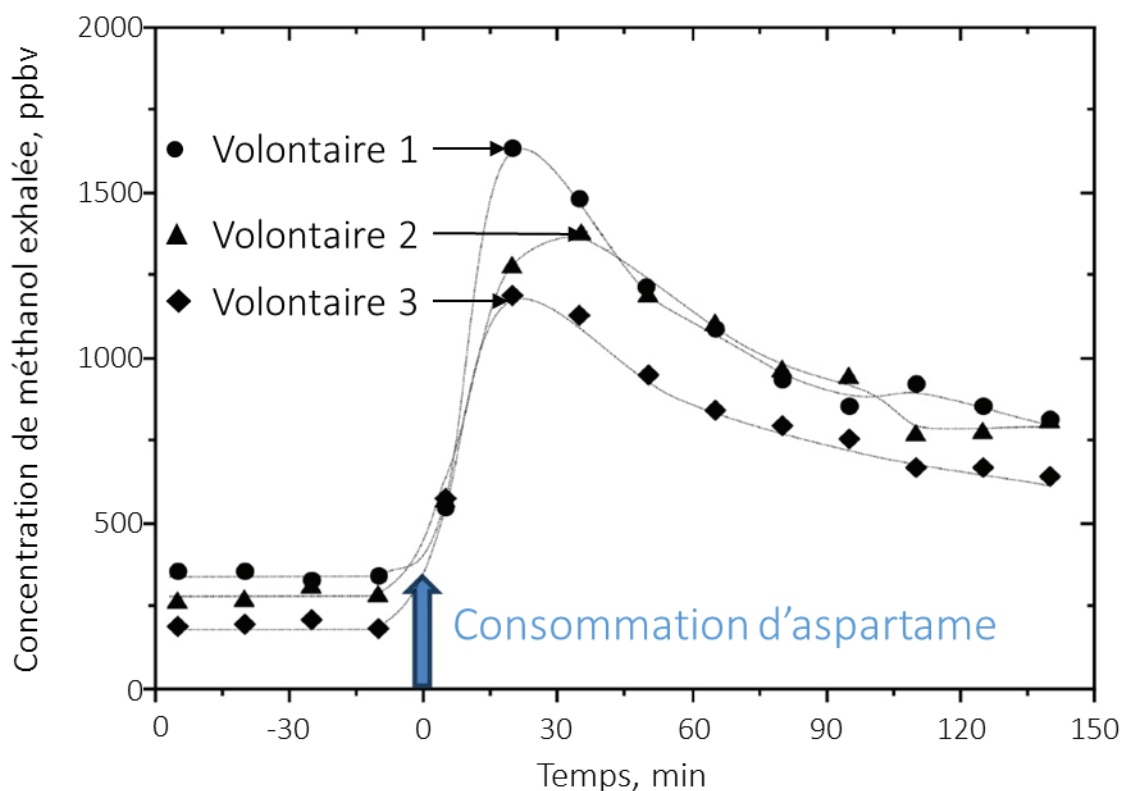


Figure 1.6. Évolution de la concentration de méthanol dans l'air expiré pour trois volontaires après avoir consommé de l'aspartame. Adapté d'après [102].

Environ 30 minutes après l'ingestion d'aspartame la concentration en méthanol dans l'air expiré est multipliée au moins par trois. Deux heures et trente minutes après l'ingestion d'aspartame, la concentration en méthanol est toujours au moins 50 % plus élevée chez les trois personnes.

Le régime alimentaire semble également influencer la composition de l'air expiré sur le long terme [103], de même que l'indice de masse corporelle [42]. Cependant, comme dans le cas de la médication, il est difficile de savoir si les différences observées sont liées à l'indice de masse corporelle ou à des régimes alimentaires différents qui entraînent des indices de masse corporelle différents.

Le stress et plus généralement les émotions semblent également influencer la composition de l'air expiré [104,105]. Ces paramètres influencent la fréquence cardiaque et respiratoire, ce qui modifie les équilibres entre le sang et l'air expiré.

L'influence du tabagisme sur la composition des COV exhalés fait l'objet de nombreuses recherches [106–111] et des COV retrouvés dans l'air expiré sont proposés comme marqueurs de consommation de cigarettes [42]. L'exposition de pompiers à des incendies

[112] lors d'interventions modifie également le profil des COV exhalés. Des produits liés aux combustions, comme des hydrocarbures aromatiques polycycliques, sont retrouvés dans leur air expiré malgré les équipements de protection. L'exposition à des radiations semble aussi modifier le profil des COV dans l'air expiré [40,41] par augmentation du stress oxydatif.

1.2.5 L'air expiré, un échantillon complexe, conclusion

Nous venons de montrer que de nombreux facteurs influencent la composition de l'air expiré. Ces facteurs peuvent avoir une origine physiologique ou environnementale et concerner une molécule spécifique ou le profil général des COV. En fonction du facteur, l'effet peut durer de quelques secondes à plusieurs années. Certains facteurs environnementaux présentent un intérêt et d'autres non, mais l'influence individuelle de chaque facteur est encore mal comprise. En effet, peu d'études tiennent compte de nombreux facteurs en même temps ou mettent en place des stratégies pour limiter l'influence de ces facteurs.

Les faibles concentrations, la variabilité, et la diversité des structures des COV exhalés nécessitent des méthodes analytiques adaptées. Dans la partie suivante, nous décrirons les méthodes utilisées et l'influence sur les résultats des conditions de prélèvement, des modes d'échantillonnage et de préconcentration et des techniques analytiques utilisées.

1.3 Prélèvement, préconcentration et analyse de l'air expiré

1.3.1 Prélèvement et préconcentration

1.3.1.1 Conditions de prélèvement

La partie de l'air expiré prélevée doit être sélectionnée avec soin, même lorsque le prélèvement consiste à souffler directement dans une machine. Plus généralement, les conditions d'échantillonnage influencent la qualité des résultats. Cette partie s'intéresse donc à l'échantillonnage de l'air expiré et les paramètres physiologiques et environnementaux à contrôler.

Précédemment, nous avons montré que l'alimentation et le tabac pouvaient modifier à court terme la composition de l'air expiré. Dans différentes études, un délai entre le dernier repas et le prélèvement peut être imposé. Ce délai varie selon les études, 1 h [80,108,113], 3 h [114], 9 h [105] et n'est pas systématiquement appliqué. Mettre en place un ensemble de contraintes standardisées imposées aux personnes avant un prélèvement semblerait extrêmement intéressant. C'est déjà le cas pour les prises de sang où il faut se présenter à

jeun, ou pour les tests d'exposition au poste de travail au benzène pour lesquels il ne faut pas fumer 12 h avant le prélèvement. Imposer des contraintes draconiennes aux personnes pour limiter au maximum l'influence de nombreux facteurs est tentant. Cependant, un risque existe alors que les personnes ne respectent pas ces obligations trop contraignantes. De plus, déterminer quels facteurs doivent être contrôlés et quels facteurs n'ont pas d'importance s'avère actuellement difficile puisque l'influence relative de chaque facteur est mal connue.

D'autres paramètres comme le rythme cardiaque et la fréquence respiratoire semblent influencer la composition des COV dans l'air expiré. Ces paramètres, ainsi que d'autres paramètres biochimiques, pourraient être relevés pour compenser leur influence sur la composition de l'air expiré. Cependant, ils sont contrôlés de manière très variable selon les études.

Pour s'affranchir des COV environnementaux dans l'air inspiré, analyser les COV contenus dans l'air ambiant est indispensable. Cette analyse n'a pas toujours lieu et, même si elle est effectuée, l'utilisation des résultats ne semble pas toujours appropriée. Certaines études proposent de faire respirer un air propre, ou d'effectuer le prélèvement au même endroit pour toutes les personnes. Cependant, cela ne permet pas de tenir compte de la persistance de certains COV contenus dans l'air inspiré. De plus, les pratiques divergent beaucoup selon les études.

Pour prélever les quantités d'échantillon nécessaires à l'analyse, certaines études prélèvent plusieurs expirations. D'autres études demandent une expiration forcée. Une expiration forcée consiste à expirer plus que le volume respiratoire normal constitué de 400 à 600 ml. C'est ce qui a lieu lorsqu'une personne doit remplir un sac d'un litre en une expiration. Cependant, la manière dont le sujet respire peut changer la composition des COV contenus dans l'air expiré et les instructions diffèrent beaucoup selon les études. Par exemple, expirer par le nez ou par la bouche modifie les concentrations de certains COV [115,116]. La figure 1.7 présente des résultats obtenus sur trois volontaires pour l'ammoniac.

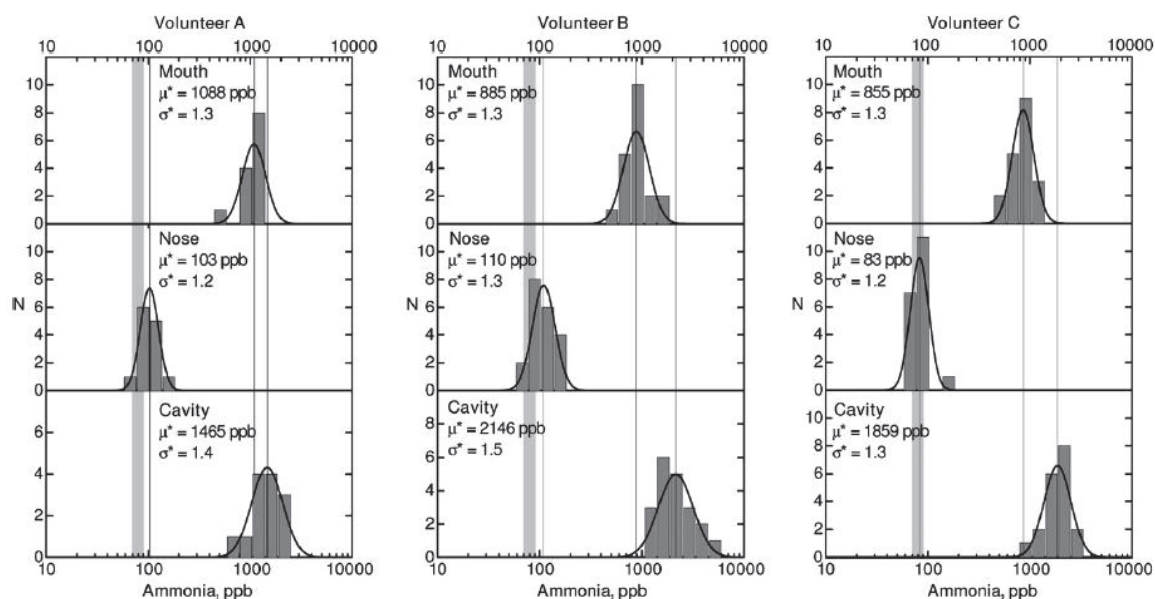


Figure 1.7. Variation de la concentration d'ammoniac détectée dans l'air expiré de 3 individus en fonction d'une expiration par le nez, la bouche ou un prélèvement direct en fond de gorge, d'après [115]

Les différents paramètres évoqués influencent la composition des COV dans l'air expiré mais ils ne sont pas contrôlés ou mesurés de la même manière dans toutes les études. Cela complique voire empêche la comparaison des résultats entre les différentes études.

1.3.1.2 Partie de l'air expiré prélevée

Au début de ce chapitre, nous avons montré que l'air expiré était composé de l'air de début de respiration et de l'air de fin de respiration. Un large consensus existe pour dire que, sauf dans les cas de l'asthme et d'halitose, c'est l'air de fin de respiration qui intéresse pour le dépistage. Cependant, pour différentes raisons, l'air de fin de respiration est parfois prélevé en même temps que l'air de début de respiration. L'air extérieur pollue alors l'échantillon d'intérêt. Les conclusions de ces études sont donc à prendre avec précaution en fonction des applications visées.

Lorsque l'air de fin de respiration est ciblé, différentes méthodes existent dans la littérature pour sélectionner cette partie spécifique. La méthode utilisée pour prélever l'air de fin de respiration peut aussi influencer les résultats.

De nombreuses études utilisent des sacs Tedlar pour le prélèvement de l'air expiré [43]. Ils existent en plusieurs tailles, ce qui permet de choisir le volume adapté. La figure 1.8 montre une photographie d'un sac Tedlar de 1 l.



Figure 1.8. Photographie d'un sac Tedlar de 1 l

Lors du prélèvement du seul air de fin de respiration, les individus commencent parfois à souffler dans le sac après un certain délai [43]. Cependant, le prélèvement est difficilement répétable dans ces conditions. La totalité des systèmes de préconcentration ou des systèmes d'analyse qui ne nécessitent pas d'étape de préconcentration sont compatibles avec les sacs Tedlar. Cependant, les échantillons se dégradent rapidement, en moins de 3 h [117] en cas de stockage dans des sacs Tedlar.

LE BIO-VOC, commercialisé par Markes, constitue un autre instrument simple dédié au prélèvement de l'air de fin de respiration. La figure 1.9 montre ce dispositif. Il s'agit d'un tube dont le volume de 150 ml est choisi spécifiquement.



Figure 1.9. Photographie du système BIO-VOC

En effet, une expiration représente un volume d'environ 600 ml décomposés en 300 ml d'air de début de respiration et 300 ml d'air de fin de respiration. Avec une expiration, l'air de fin de respiration pousse l'air de début de respiration en dehors du tube. Au vu des volumes du BIO-VOC et de l'air de début de respiration et de fin de respiration, le BIO-VOC contient en

théorie uniquement l'air de fin de respiration. Ce système s'avère difficilement compatible avec tous les systèmes de préconcentration et le volume prélevable est fixé. De plus, pendant l'expiration dans le tube, l'air de début et de fin de respiration peuvent se mélanger. Ce système permet d'analyser uniquement 150 ml d'air de fin de respiration mélangé à de l'air ambiant.

Comme le montre la figure 1.2, page 36, une concentration de CO₂ plus élevée que dans l'air de début de respiration constitue une caractéristique de l'air de fin de respiration. Cette portion de l'air expiré peut donc être sélectionnée en mesurant le taux de CO₂ en continu. Lors de la détection de l'air de fin de respiration, l'échantillon est envoyé vers un système de prélèvement ou de préconcentration ou directement vers l'instrument d'analyse en fonction du système utilisé. Les systèmes de spectrométrie de masse en temps réel de type *selection ion flow tube* ou *proton transfer reaction* permettent même de suivre directement l'apparition de l'air de fin de respiration grâce aux spectres de masse [118]. Les systèmes basés sur le suivi du taux de CO₂ paraissent les plus adaptés pour des prélèvements répétables de l'air de fin de respiration. Des systèmes commerciaux existent pour ce genre de prélèvements [119,120], mais de nombreux laboratoires développent également leurs propres instruments.

La description des méthodes utilisées dans la littérature montre donc que les conditions de prélèvement de l'air expiré varient beaucoup. La comparaison d'études qui utilisent des systèmes de prélèvement différents semble complexe, voire impossible.

1.3.1.3 Préconcentration

La TD est la méthode de préconcentration la plus utilisée [43]. Un tube contient un matériau adsorbant. L'air expiré est pompé à travers le tube, directement ou après prélèvement dans un BIO-VOC ou un sac Tedlar par exemple. Cela permet de piéger une certaine gamme de COV en fonction des propriétés de l'adsorbant utilisé. Le tube est ensuite chauffé pour désorber et injecter les COV prélevés dans le système d'analyse adéquat. Les échantillons peuvent être conservés au moins deux semaines une fois prélevés sur le tube de TD [121,122]. Différents matériaux sont utilisés comme adsorbants : Tenax, Carbograph 5TD carboxen. Les familles de COV analysables varient en fonction des adsorbants.

La SPME est la deuxième méthode de préconcentration la plus utilisée [43]. Une fibre fonctionnalisée avec un matériau adsorbant est exposée à l'échantillon à analyser. Le prélèvement et la préconcentration se alors font de manière passive, par simple équilibre entre l'environnement et l'adsorbant. La mise en œuvre diffère donc de celle utilisée en TD. L'injection a lieu en chauffant la fibre. Différents matériaux peuvent être utilisés pour fonctionnaliser la fibre, polydiméthylsiloxane, polyacrylate, divinylbenzene. Les types de matériaux et leur épaisseur permettent l'analyse d'une gamme plus ou moins grande de COV.

La comparaison de résultats obtenus en SPME et en TD s'avère complexe car la mise en œuvre de l'adsorption diffère. De plus, même en utilisant une technique de préconcentration identique, les matériaux choisis comme adsorbant peuvent être différents. Si la nature des matériaux diffère, la comparaison des résultats est également complexe, car ils ne permettent pas de préconcentrer la même gamme de COV. Finalement, peu de publications émanant de groupes de recherches différents décrivent des résultats obtenus en utilisant à la fois des modes de prélèvement, un système de préconcentration et des matériaux adsorbants identiques. C'est pour ces raisons que différentes propositions de standardisation existent, nous les présentons dans la partie suivante.

1.3.1.4 Propositions de standardisation du prélèvement

Les méthodes de prélèvement et de préconcentration varient beaucoup entre les études et peuvent en partie expliquer le peu de tests qui utilisent l'air expiré. De nombreuses réflexions existent autour de la standardisation et des critères que doit remplir un échantillonneur d'air expiré [123]. Cependant, ces réflexions ne concernent généralement que la partie de l'air expiré prélevée et la manière de préconcentrer, elles n'incluent pas du tout l'état général des personnes : se rincer la bouche, ne pas manger, prélèvement le matin, le soir... Cette absence de proposition gêne d'autant plus que ces facteurs influencent les COV détectés [117,124].

La plus ancienne proposition commerciale d'échantillonneur à notre connaissance a été effectuée par Menssena research [119]. La figure 1.10 montre ce dispositif.



Figure 1.10. BCA fabriqué par Menssana research, inc, d'après [125]

Elle permet de prélever la fin de l'air expiré sur un tube de TD ainsi qu'un échantillon d'air environnant. La présence de filtres et de nombreux raccords peut entraîner des pollutions ou bien des adsorptions parasites de COV. À notre connaissance, ce système est peu utilisé dans la littérature.

Le système ReCIVA d'Owlstone [120] est un autre dispositif disponible commercialement. Il inclut le prélèvement et la préconcentration et date de 2015. La figure 1.11 présente une photographie et un schéma du système.

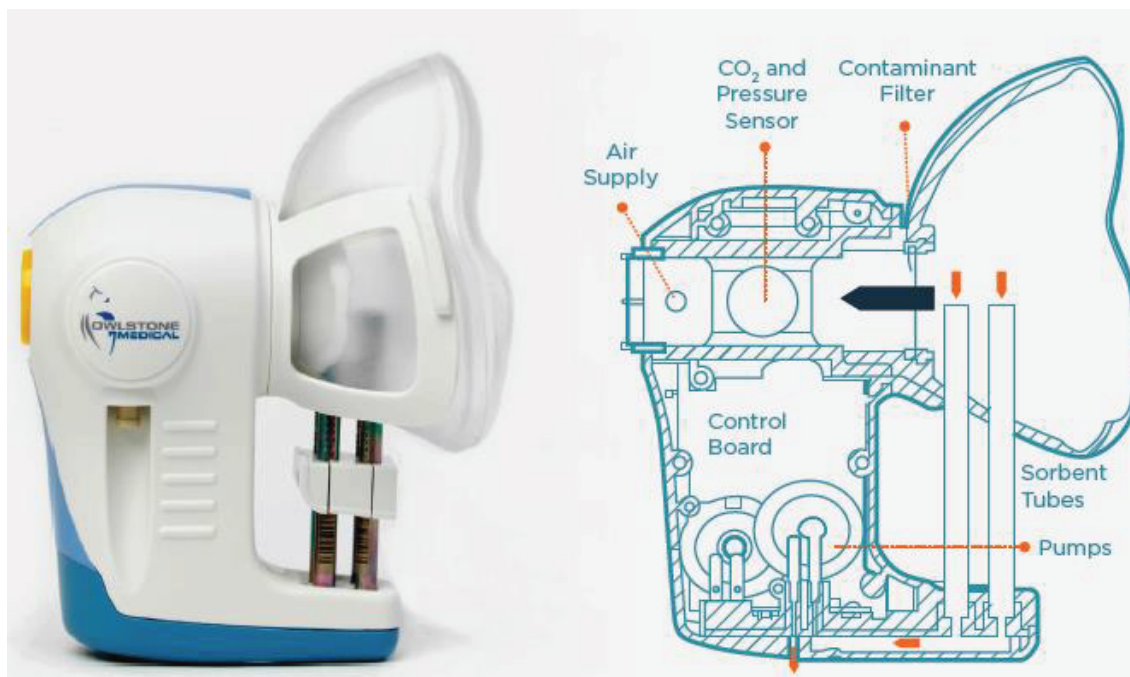


Figure 1.11. Système de prélèvement ReCIVA, d'après [120]

L'architecture provient d'une réflexion collective de nombreux chercheurs et des demandes de brevet ont été déposées [126,127]. L'échantillon est directement prélevé sur un tube de TD, ce qui limite les risques de contamination. Le prélèvement sélectif de l'air de fin de respiration est accompli grâce au suivi du taux de CO₂. Le système permet également de prélever d'autres parties de l'air expiré. Un prélèvement complet nécessite de porter le masque pendant environ une dizaine de minutes. Ainsi, prélever l'air expiré mobilise la personne pendant un certain temps et n'est pas aussi peu invasif qu'espéré. Peu de résultats obtenus grâce à ce dispositif existent pour le moment en raison de sa relative jeunesse. Cependant, de nombreux essais cliniques ont actuellement lieu avec cet instrument, ce qui devrait bientôt délivrer des résultats intéressants [128–130].

Les deux propositions de standardisation disponibles commercialement, qui incluent prélèvement et préconcentration, sont basées sur un suivi du taux de CO₂ pour le prélèvement sélectif de la partie de l'air désirée et sur une préconcentration directe sur un tube de TD. Ce sont a priori les systèmes les plus complexes, mais puisque le prélèvement influence beaucoup les résultats cette complexité semble nécessaire.

La société européenne respiratoire a missionné un groupe de travail, afin de proposer des recommandations pour la standardisation du prélèvement des COV dans l'air expiré. Un document qui restitue les réflexions et les propositions a été publié en 2017 [131]. Le besoin de standardiser les pratiques tout en gardant un cadre souple pour permettre de s'adapter aux différentes applications et éviter la mise en place de protocoles trop contraignants constitue un consensus au sein de la communauté. Cependant, comme expliquée ci-dessus, l'influence de nombreux facteurs environnementaux et des divers comportements des individus sur la composition de l'air expiré empêche pour le moment de faire ressortir des recommandations concrètes.

1.3.2 Analyse de l'air expiré

1.3.2.1 *Chromatographies en phase gazeuse*

Nous avons vu dans les parties précédentes que l'air expiré contient de nombreuses molécules à des concentrations différentes et variables au sein d'une population et chez un individu au cours du temps. Ainsi, la composition et les variations des COV dans l'air expiré restent mal appréhendées. De plus, peu de marqueurs ou d'ensembles de marqueurs très spécifiques semblent exister à l'heure actuelle. Pour ces raisons, l'utilisation d'une méthode

très large spectre qui permet d'analyser la plus grande gamme de molécules possible reste majoritaire. Ainsi, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse reste la méthode d'analyse la plus utilisée [44]. En effet, c'est l'une des seules techniques analytiques capables de résoudre la complexité de mélanges gazeux contenant plusieurs centaines de molécules dans des gammes allant de la ppmv à la pptv. De plus, la validation biochimique des marqueurs nécessite de connaître leur structure et donc l'identification des COV permise par la spectrométrie de masse. Par exemple, un article de revue de 2015 [132] qui s'intéresse spécifiquement à des publications sur la recherche de marqueurs du cancer montre que parmi les 73 articles retenus, 35 utilisent la GC-MS seule et 6 utilisent la GC-MS plus une autre technique d'analyse.

Les limites de détection des méthodes de GC-MS rendent l'étape de préconcentration indispensable pour une analyse exhaustive des COV exhalés. Cette technique d'analyse a été utilisée massivement [44] pour l'étude de COV dans l'air expiré pour de nombreuses maladies : cancer du poumon [133–135], bronchopneumopathie chronique obstructive [17,18,136], asthme [103,137], cancer du sein [25]. Malgré le fait que de nombreuses recherches aient eu lieu en GC-MS, peu de ces résultats ont été transférés vers des applications à l'hôpital ou en laboratoire d'analyse.

Plusieurs explications peuvent être proposées et seront détaillées plus tard : taille des groupes, facteurs confondants, mauvais échantillonnage. Une autre explication possible serait que la GC-MS ne permet pas de résoudre complètement la composition des COV dans l'air expiré et que de l'information existe encore qu'elle n'arrive pas à faire apparaître. L'utilisation de la GC × GC-MS a confirmé cela en trouvant plus de COV grâce à l'augmentation de l'espace de séparation [56] et la détectabilité.

1.3.2.2 Autres méthodes analytiques

De nombreuses autres méthodes ont été utilisées pour l'analyse de l'air expiré. Cependant, dans le cadre de la découverte de nouveaux marqueurs où une vision globale de la composition des COV dans l'air expiré est indispensable, ces méthodes ne semblent pas les plus adaptées pour le moment. Elles s'avèrent cependant utiles pour d'autres applications, comme détaillé dans les parties suivantes.

1.3.2.2.1 Chien et nez électronique

Ces deux méthodes analytiques, même si elles sont différentes, sont basées sur le même principe : un réseau de capteurs non spécifique analyse le mélange gazeux.

L'analyse de l'air expiré par des chiens a été effectuée dans différents cas : cancer du poumon [138–141], cancer du sein [140,141], cancer colorectal [142], mélanome [141]. C'est également le cas pour les nez électroniques utilisés pour étudier les COV dans l'air expiré pour l'asthme [143–146], le cancer du poumon [147–150], et de nombreuses autres pathologies [124].

Malgré les centaines de publications concernant ces méthodes pour l'analyse de l'air expiré, rien n'est encore transféré en clinique car elles présentent des limites pour la validation des marqueurs. Tout d'abord, comme les COV ne sont pas identifiés, les COV qui permettent la différenciation des groupes sains et malades ne sont pas déterminés. La séparation entre les groupes peut alors être le fruit de facteurs confondants et ces méthodes ne permettent pas de les distinguer. De plus, pour être définitivement validés, les processus biochimiques qui expliquent l'apparition de marqueurs dans l'air expiré doivent être résolus. Comme ces méthodes d'analyse ne permettent pas d'identifier les composés qui séparent les groupes, l'étape de validation devient impossible.

L'élevage et les soins nécessaires pour les chiens sont complexes et chers. Les capacités de concentration d'un chien sont limitées et peuvent grandement affecter les résultats obtenus. Pour ces raisons, des recherches ont lieu pour développer des méthodes analytiques complémentaires aux chiens, comme pour la reconnaissance de suspects dans des enquêtes criminelles par leur odeur par exemple [151].

1.3.2.2.2 Capteurs sélectifs

De nombreux types de capteurs sélectifs existent, capables d'analyser une seule molécule ou une seule famille de molécules, ou un mélange de quelques molécules. Les phénomènes mis en jeu peuvent être de type optique [152], gravimétrique [153] etc. En fonction des phénomènes physiques utilisés, les concentrations détectées peuvent aller jusqu'à la pptv. Cela rend possible la détection des molécules sans étape de préconcentration. Ce sont souvent des capteurs plus simples que les nez électroniques ou les techniques chromatographiques, miniaturisables et potentiellement intégrables dans des systèmes

transportables. Des exemples existent dans la littérature pour l'analyse de l'acétone [153,154] ou de l'ammoniac [155].

Comme dit précédemment, pour le moment peu de marqueurs spécifiques de maladie sont connus. De plus, de nombreux articles qui présentent des capteurs pour l'analyse de COV spécifiques dans l'air expiré ne montrent que des résultats obtenus sur des mélanges étalons et très rarement sur des échantillons réels. Ainsi ils ne tiennent pas compte des possibles effets de mélange ou des interférences possibles avec les autres nombreuses molécules contenues dans l'air expiré. L'intérêt de ces capteurs spécifiques semble, pour l'instant, limité. Cependant, une fois que des marqueurs ou des gammes de concentrations seront déterminés pour des maladies, ces capteurs présenteront un intérêt pour amener l'analyse auprès des personnes pour des applications spécifiques.

1.3.2.2.3 Méthodes spectrométriques

Différentes techniques de spectrométrie de masse sans méthode séparative en amont permettent l'analyse des COV exhalés. Pour cela, différents types de sources, *selected ion flow tube proton transfer reaction, electrospray ionization, desorption electrospray ionization, secondary electrospray ionization*, ionisation électronique, ont été couplées à différents types d'analyseurs en masse, quadripôle et TOF [37,75,84–86,111,156–163].

Si une unique molécule est ciblée lors d'une analyse, des limites de détection de l'ordre de la ppbv sont atteignables. Cela permet souvent de s'affranchir de l'étape de préconcentration. De plus, ces méthodes permettent d'effectuer jusqu'à plusieurs analyses par minute et se révèlent extrêmement utiles pour étudier en temps réel les variations des molécules les plus concentrées communes aux populations : acétone, méthanol, éthanol... Lors de l'utilisation de sources de type SIFT ou PTR, les concentrations de nombreuses molécules peuvent être déterminées directement sans étalonnage. Ces instruments se sont également révélés très utiles pour étudier l'influence de la concentration de certains COV dans l'air inspiré sur les concentrations retrouvées dans l'air expiré.

Ces méthodes permettent surtout d'observer les COV les plus concentrés. Pour les molécules les plus lourdes, des problèmes d'identifications existent à cause des composés isobares. Des expériences de type MS^n ou bien des fragmentations peuvent être réalisées, mais cela se fait alors au détriment de la fréquence d'acquisition.

Ces instruments peuvent aussi être utilisés avec une étape de préconcentration [164]. Cela augmente la complexité des résultats puisqu'un plus grand nombre de COV est observé. La comparaison des profils sous forme de spectres de masse permet alors de séparer les groupes sains et malades. L'identification des molécules qui permettent la distinction entre les groupes devient alors plus complexe. Les problèmes de facteurs confondants et de validation biochimique peuvent à nouveau être rencontrés comme pour le chien et le nez électronique.

Les méthodes directes de spectrométrie de masse avec ou sans préconcentration présentent donc un intérêt dans les cas où un marqueur ou un petit groupe de marqueurs spécifiques existent. C'est par exemple le cas pour les marqueurs du tabagisme. Ces méthodes s'avèrent également intéressantes pour le suivi en temps réel de certaines molécules. Cependant, l'utilisation de ce genre de techniques pour la découverte de marqueurs ou de profils de COV marqueurs de maladie semble plus limitée.

1.4 Validations de marqueurs chez les individus malades

1.4.1 Méthodologie pour la découverte de marqueurs dans l'air expiré

Afin de mieux comprendre les problématiques détaillées dans la suite de la bibliographie, nous décrivons rapidement la méthodologie utilisée pour déterminer de nouveaux marqueurs de maladie. L'air expiré d'un groupe de personnes saines et l'air expiré d'un groupe de personnes malades sont analysés, généralement grâce à une méthode analytique à large spectre. La taille du groupe et la distribution entre personnes malades et saines représentent des paramètres extrêmement importants [117]. Généralement, il est admis que le nombre de personnes doit être au minimum égal à dix fois le nombre de variables [117,165]. À la suite de ces analyses, les compositions de l'air expiré des personnes saines et malades sont comparées et différents tests statistiques sont utilisés pour faire ressortir une ou des variables qui séparent les groupes [117,166,167]. Les variables discriminantes peuvent alors correspondre à un changement d'intensité d'un ou plusieurs composés. La séparation entre les deux groupes peut alors se faire grâce à des marqueurs spécifiques avec des concentrations limites, ou bien grâce à l'existence de profils différents. Ce n'est plus un marqueur spécifique qui différencie les groupes, mais un ensemble de COV dont les concentrations augmentent ou diminuent. Un groupe de personnes saines et malades qui n'ont pas participé lors de la détermination des marqueurs permet ensuite de tester la validité de ces marqueurs, c'est l'étape de validation externe. Finalement, la validation définitive de ces marqueurs nécessite l'élucidation des processus biochimiques pour expliquer la présence de ces marqueurs dans l'air expiré.

1.4.2 Limites actuelle pour la validation de marqueurs dans l'air expiré

1.4.2.1 Variabilité de l'air expiré

Nous avons montré que l'air expiré est une matrice complexe, dont la composition varie à cause de nombreux facteurs environnementaux et physiologiques. Cependant, peu d'études tiennent compte de plusieurs facteurs en même temps. Comprendre l'influence individuelle de chaque facteur sur la variabilité de la composition en COV de l'air expiré est donc difficile. Comme les facteurs qui influencent la composition de l'air expiré sont mal appréhendés, la composition normale de l'air expiré est mal connue. Comme la méthodologie de découverte de marqueurs est basée sur une comparaison entre un groupe sain et un groupe malade, la mauvaise connaissance des facteurs qui influencent une composition normale d'air expiré

limite la validation de marqueurs de maladie dans l'air expiré. La mauvaise connaissance de la composition normale de l'air expiré, en partie liée à la mauvaise compréhension des nombreux facteurs qui l'influencent, peut être proposée comme un des premiers points qui limitent le développement de l'analyse de l'air expiré pour des applications biomédicales.

1.4.2.2 Influence de l'air environnant

La composition en COV de l'air ambiant influence la composition de l'air expiré, spécialement lors du prélèvement simultané de l'air de début et de fin de respiration. Différentes stratégies sont proposées dans la littérature pour gérer les COV contenus dans l'air inspiré.

Une manière simple proposée pour s'affranchir de la potentielle pollution par l'air ambiant consiste à l'analyser également et de calculer un gradient alvéolaire [54,168–170]. La concentration émise au niveau des poumons est alors définie comme la différence entre la concentration de la molécule dans l'air de fin de respiration et la concentration de la molécule dans l'air ambiant. Cette approche présente cependant des limites. Elle ne tient pas compte des phénomènes complexes mis en jeu lors de la respiration. La manière de respirer peut contaminer l'air de fin de respiration avec de l'air de début d'expiration [168]. L'absorption et l'émission de COV dans les poumons dépendent du gradient de COV dans les poumons [168]. Un gradient alvéolaire ne tient pas compte de ces phénomènes complexes ou d'une exposition antérieure dont la cinétique de décontamination serait lente [172].

Une autre stratégie proposée pour s'affranchir de l'influence de l'air extérieur consiste à faire respirer aux individus pendant un certain temps de l'air filtré nettoyé en COV [113,169,173]. Cependant, la cinétique de « nettoyage » des poumons semble très variable en fonction des molécules et de leurs propriétés physicochimiques [113,171,172]. Ainsi même au bout d'une heure, les poumons contiennent encore certains COV liés à l'air inspiré.

Une autre proposition retrouvée dans la littérature consiste à éliminer du traitement statistique tous les COV dont la concentration dans l'air inspiré dépasse un certain seuil par rapport à l'air expiré. Une discussion est alors nécessaire à propos de ce qui est considéré comme une concentration trop élevée. Schubert et coll. [174] proposent de ne pas tenir compte de toutes les molécules dont la concentration dans l'air inspiré dépasse 5 % de l'air expiré. D'autres études proposent un seuil à 25 % [175] ou 50 % [176]. Ces seuils sont choisis

arbitrairement et ne possèdent pas nécessairement de fondements théoriques ou expérimentaux. Cela risque donc d'éliminer arbitrairement certains composés intéressants.

Ce phénomène de contamination et de persistance des composés présents dans l'environnement dans l'air expiré représente, selon les cas, un problème ou un avantage. Ils peuvent interférer avec les résultats ou justement représenter une finalité pour étudier l'exposition des personnes. Pour ces raisons, comprendre l'influence de la composition de l'air inspiré sur la composition de l'air expiré est indispensable.

Des expériences ont permis d'étudier l'influence de la concentration de COV dans l'air inspiré sur la concentration dans l'air de fin de respiration [177]. Pour cela, des volontaires respirent un air qui contient une concentration connue de certains COV et la concentration dans l'air de fin de respiration est mesurée. La figure 1.12 présente un exemple de graphe obtenu pour l'acétone et le méthanol.

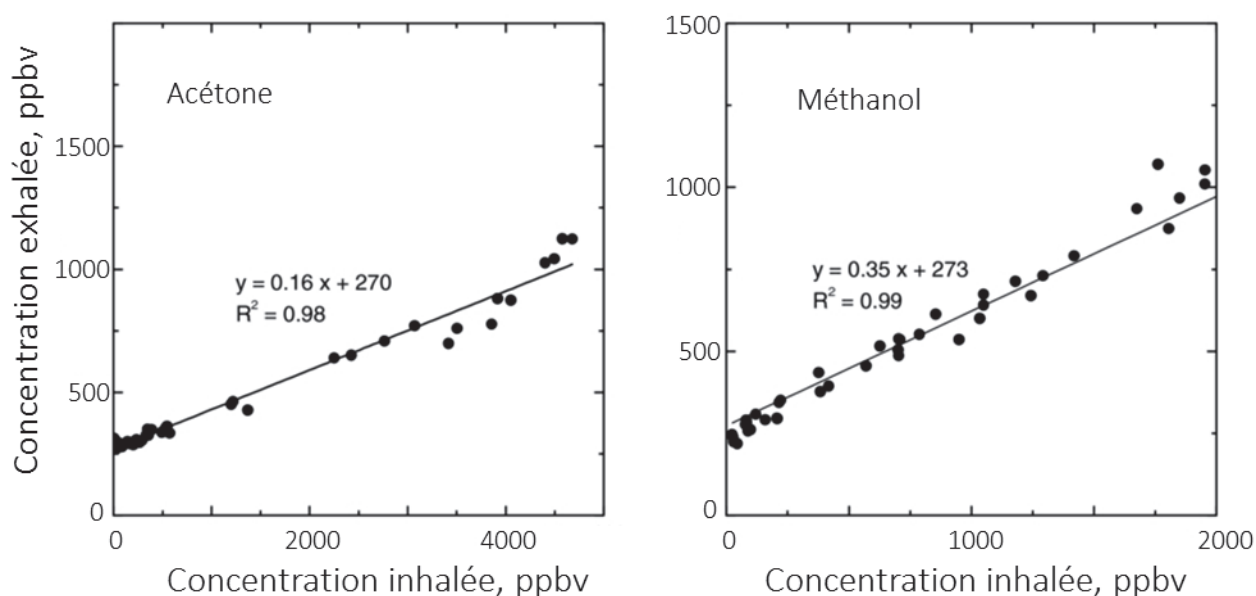


Figure 1.12. Résultats expérimentaux montrant la relation entre la concentration dans l'air inspiré et la concentration dans l'air expiré de deux molécules, l'acétone et le méthanol, d'après [177]

La relation entre les concentrations des composés inspirés via l'air ambiant et expiré semble de type affine. La valeur des coefficients dépend des propriétés physicochimiques de chaque molécule et plus particulièrement de la constante de Henry [177–179]. Elle représente la distribution de la molécule entre le sang et l'air contenu dans les alvéoles pulmonaires. De plus, les valeurs des coefficients semblent varier entre individus. Cette méthode présente un

grand intérêt mais risque de rester limitée à des COV peu toxiques ou dont la présence dans l'air ambiant est connue.

Des modèles théoriques existent en complément de ces résultats expérimentaux. Un système à deux boîtes permet de décrire le comportement des molécules avec une constante de Henry faible [178]. Ce système comporte trois boîtes pour les molécules avec des constantes de Henry plus élevées [179]. En dérivant l'équation de Farhie [180], les études retrouvent également des relations de type affines en accord avec les résultats expérimentaux évoqués précédemment. Ces travaux confirment cependant que l'approche de type «gradient alvéolaire» est valable pour certaines molécules. La valeur du coefficient directeur de la droite qui modélise la relation entre concentration inspirée et concentration expirée vaut alors 1. C'est le cas pour les alcanes par exemple.

Ces travaux présentent un grand intérêt pour mieux comprendre l'influence de l'air inspiré sur la composition de l'air expiré. Cependant, le nombre de COV étudiés reste faible et le nombre de validations expérimentales est limité pour le moment. De plus, cela ne tient compte que de l'air inspiré au moment du prélèvement et pas de l'air inspiré auparavant. En effet, les cinétiques d'élimination dans l'air expiré peuvent être lentes, et des COV peuvent être retrouvés plusieurs heures après l'inspiration [107,181,182].

1.4.2.3 Existence de facteurs confondants

De nombreux facteurs influencent la composition de l'air expiré. S'ils ne sont pas considérés correctement, des variables confondantes [117] peuvent être négligées. Le tabagisme constitue une variable confondante habituellement décrite [183] et dont la majorité des études commence à tenir compte, mais d'autres facteurs confondants existent sûrement. Ainsi l'une des plus grandes études longitudinales effectuée sur un groupe de 1417 personnes montre que séparer en partie la cohorte en deux groupes composés de fumeurs et de non-fumeurs est possible [42]. Le graphe présenté dans la figure 1.13 illustre ces propos.

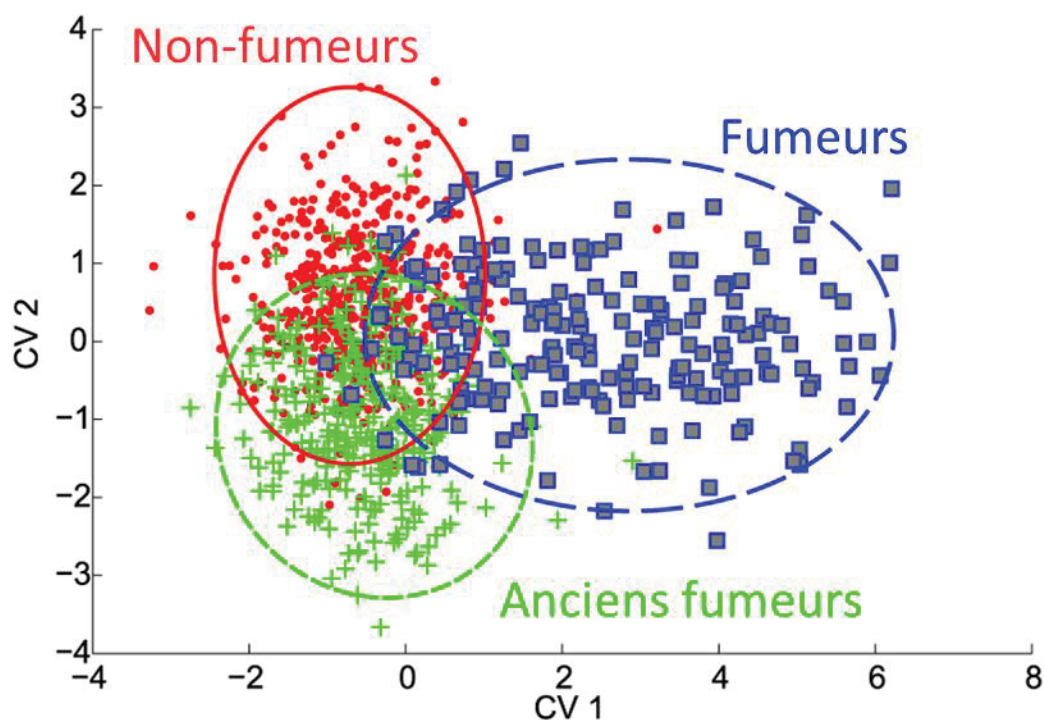


Figure 1.13. Séparation d'une population de 1417 individus en fonction de leur consommation tabagique grâce à l'analyse des COV contenus dans l'air expiré, d'après [42]

De nombreuses études se sont intéressées à la recherche de marqueurs du cancer du poumon dans l'air expiré [14,58,133,134,143,149,184–192]. En effet, peu de marqueurs précoces existent actuellement pour cette pathologie. La détection de ce cancer a souvent lieu à un stade avancé ce qui limite les chances de survie des malades. Celles-ci valent 75 % lorsque lors d'une détection au stade 1 et uniquement de 5 % au stade 4. Cependant, environ 80 % malades du cancer du poumon sont des fumeurs ou d'anciens fumeurs. Il se pose alors la question de savoir si les marqueurs proposés dans ces études sont des marqueurs de cancers des poumons, des marqueurs du tabagisme ou des marqueurs d'autres pathologies qui touchent souvent les personnes qui fument comme les bronchites chroniques ou la bronchopneumopathie chronique obstructive [183]. Parmi les molécules les plus citées comme marqueurs du cancer du poumon [16,193] on retrouve des molécules également proposées comme marqueurs du tabagisme tel que le benzène ou le toluène [107,108,194].

La composition de l'air extérieur n'est pas étudiée systématiquement et pourrait également constituer un facteur confondant. Les personnes malades sont souvent hospitalisées et les personnes saines habitent chez elles. Nous avons montré que l'environnement hospitalier était source de COV spécifiques dans l'air expiré [34]. De plus, les personnes hospitalisées possèdent peut-être toutes le même régime alimentaire, car elles sont nourries à l'hôpital.

Ainsi, si l'influence de l'air extérieur et de l'environnement est mal étudiée, la séparation entre groupe sain et malade pourrait être liée à des différences environnementales dans lesquelles se trouvent ces deux groupes plutôt qu'à des COV marqueurs de maladie [183].

1.4.2.4 Taille des cohortes et validation externe

De nombreux marqueurs sont tout de même proposés dans la littérature. Cependant, au vu de la taille des cohortes, la force statistique de ces résultats semble souvent limitée. En effet, les plus grands groupes représentent actuellement environ 1500 personnes [42] et au minimum 800 molécules sont décrites dans l'air expiré [7]. Une réduction de la dimensionnalité des variables est possible mais le nombre de variables mesurées risque de rester bien supérieur au nombre de patients. Cette différence entre nombre de variables et nombres de mesures peut entraîner l'apparition de corrélations «voodoo» [117,165]. Des variables peuvent alors différencier des groupes sains et des groupes malades par hasard et non à cause d'une maladie.

De plus, la combinaison de données obtenues dans différentes études semble complexe car les conditions de prélèvement ainsi que les méthodes d'échantillonnage, de préconcentration et d'analyse présentent une grande diversité. Cependant, des études qui utilisent le système de prélèvement ReCIVA couplé à une même méthode d'analyse par GC-MS ont lieu actuellement, comme expliqué dans la partie 1.3.1.4. Le nombre exact de personnes impliquées est hypothétique, mais au vu des différentes informations le chiffre d'au moins 3000 semble crédible [128–130,195]. Ces études concernent, entre autres, le cancer du poumon, l'asthme et le cancer colorectal dans des études multicentriques.

Une fois des marqueurs proposés, ils doivent passer une étape de validation externe. Cette étape de validation externe s'effectue avec des populations qui n'ont pas participé à la détermination des marqueurs. Cette étape manque dans de nombreuses études. De plus, même quand la validation externe a lieu, elle ne permet pas systématiquement de valider les marqueurs [136]. La variabilité instrumentale est proposée comme origine de la non-validation. 1793 variables sont utilisées lors du traitement de données. Chaque variable correspond à un pic et son aire associée. Le nombre élevé de variables par rapport au faible nombre de personnes, 97, peut aussi être à l'origine de la non-validation externe. Cependant, des facteurs confondants mal appréhendés pourraient également être la cause de cette non-validation externe.

1.4.2.5 Spécificité des marqueurs

Malgré ces différents problèmes, des marqueurs identiques sont proposés pour des maladies différentes dans plusieurs études. Un résumé des marqueurs décrits dans la littérature pour différentes maladies et adapté de [49] est présenté dans le tableau 1.3.

Tableau 1.3. Résumé des COV proposés comme marqueurs de maladie dans différentes études pour différentes maladies, adapté de [49]

Pathologies	COV proposés	Ref
Asthme	NO, pentane, éthane, 8-isopropane	[196–198]
Cancer du sein	Alcanes, alcanes monométhylés	[25]
Fibrose kystique	Disulfure de carbone, alcanes, hydrocarbures C ₅ -C ₁₆	[199,200]
Diabète	Acétone, éthanol, méthylnitrate, Alcanes linéaires C ₄ -C ₂₀ et dérivés monométhylés, éthylbenzène, xylène	[201–204]
Maladie inflammatoire chronique de l'intestin	Éthane, propane, pentane	[205]
Rejet de transplantation cardiaque	Alcanes et alcanes méthylés	[66,206]
Polyarthrite rhumatoïde	Pentane	[207]
Schizophrénie	Pentane, éthane, disulfure de carbone	[208,209]
Tuberculose	Benzène, alcanes	[4]

Comme le montre ce tableau, des marqueurs identiques sont proposés pour des maladies différentes touchant des organes différents. Cela concerne surtout les alcanes linéaires, comportant entre cinq et vingt carbones et leurs isomères ramifiés. Ces marqueurs ne semblent donc pas spécifiques à une maladie. Différentes études considèrent ces alcanes comme des marqueurs de stress oxydatif important [49]. Des voies métaboliques qui expliquent l'apparition de ces alcanes dans l'air expiré à cause du stress oxydatif sont également proposées [168]. Les alcanes sont formés par peroxydation des lipides lors de l'augmentation du stress oxydatif. Ces marqueurs ne seraient donc pas spécifiques à une maladie mais signaleraient plutôt un état de santé dégradé. Il se pose alors la question de l'intérêt de l'analyse de l'air expiré pour déterminer la dégradation de l'état de santé d'un ou d'une malade. Cependant, ce cas de figure pourrait quand même présenter un intérêt pour suivre facilement l'évolution d'une personne dont la pathologie est déjà connue.

Finalement, pour être définitivement validée, la présence des marqueurs déterminés dans l'air expiré doit être expliquée biochimiquement ou bien la source d'exposition doit être déterminée. Cela est plus simple pour les expositions environnementales où le marqueur est la molécule à laquelle l'individu est exposé ou bien son métabolite. C'est le cas par exemple pour l'éthanol, ou les médicaments. Dans le cas d'une maladie où c'est une variation de concentration d'un ensemble de marqueurs qui est signe de maladie, l'explication des processus biochimiques s'avère plus complexe. À notre connaissance, cette validation n'a eu lieu que dans quelques rares cas.

Le nombre limité de tests qui utilisent l'analyse de l'air expiré autorisé par les autorités sanitaires s'explique, entre autres, par l'accumulation des différents facteurs que nous venons de décrire. L'air expiré constitue un mélange complexe de COV dont la composition normale est mal connue, tout comme les facteurs qui l'influencent. Les méthodes analytiques utilisées présentent des limitations aussi bien en ce qui concerne les conditions de prélèvement, le prélèvement et l'analyse. De plus, la validation de marqueurs impose des contraintes méthodologiques qui ne sont pas toujours respectées : gestion des facteurs qui influencent la variabilité, tailles des cohortes, validations externes. Finalement, la question de la spécificité des marqueurs peut être posée.

1.5 Conclusion, vers la chromatographie multidimensionnelle et la miniaturisation des systèmes analytiques

Les parties précédentes ont montré la complexité et la variabilité de l'air expiré. Même les méthodes de TD-GC-MS ne permettent pas d'élucider en totalité la composition de l'air expiré. De plus, cette technique n'a pour l'instant permis de trouver que quelques marqueurs simples pour quelques maladies. La chromatographie en phase gazeuse intégralement bidimensionnelle, GC $\times$ GC, permet d'analyser encore plus en détail des mélanges gazeux très complexes qui contiennent plusieurs milliers de molécules. Elle a été utilisée pour analyser des coupes de pétrole par exemple [210]. Les quelques études qui utilisent la GC $\times$ GC-MS pour l'analyse de l'air expiré permettent généralement de trouver plus de molécules que ce qui est décrit en GC-MS [11,53–57,59,72,137,211,212]. Parmi ces nouveaux COV pourraient se trouver des marqueurs de maladie. La GC $\times$ GC-MS semble donc être une technique intéressante pour la découverte de marqueurs spécifiques ou de profils de marqueurs dans l'air expiré.

Nous avons montré que le prélèvement et la préconcentration représentent des étapes cruciales dans l'analyse de l'air expiré. La standardisation de cette étape paraît indispensable pour un développement futur de l'analyse de l'air expiré. Les deux propositions de standardisation qui existent aujourd'hui sont basées sur de la TD de laboratoire. C'est une technologie mature, qui fonctionne bien, ce qui explique qu'elle soit majoritairement utilisée comme nous l'avons vu dans la partie précédente. Cependant, avec ces systèmes standardisés, les prélèvements complets peuvent durer une dizaine de minutes, ce qui est plutôt long. Au final, même si des propositions de standardisation existent, elles restent plutôt contraignantes ce qui pourrait freiner leur utilisation.

La miniaturisation des systèmes constitue une tendance forte dans le monde de l'analyse. Des avantages sont espérés concernant les quantités d'échantillons nécessaires, les temps d'analyse et la portabilité des instruments. Ainsi, en travaillant sur une brique miniaturisée pour le prélèvement de l'air expiré, une réduction de la taille de l'échantillon et donc du temps de prélèvement est espérée. Un échantillonnage plus simple permettrait d'effectuer plus d'analyses ce qui pourrait régler certains problèmes statistiques des différents résultats présentés.

De plus, un instrument portable qui permettrait d'analyser l'air expiré pourrait présenter de nombreux avantages pour le dépistage ou le suivi simple de pathologies. Pour aller vers ce système portable, une technique de préconcentration miniaturisée simple s'avère indispensable. Ces développements pourraient permettre à terme l'utilisation de ces systèmes d'analyse directement auprès des malades.

Très peu de résultats existent dans la littérature à propos de l'utilisation de la chromatographie multidimensionnelle pour l'analyse de l'air expiré. On compte aujourd'hui seulement une vingtaine de publications. Cela est encore plus vrai pour l'analyse de l'air expiré avec des systèmes chromatographiques en partie ou entièrement miniaturisés, thème pour lequel nous avons trouvé moins d'une dizaine de publications. C'est sur ces deux aspects, que nous pensons extrêmement intéressants pour l'analyse de l'air expiré que nous nous sommes concentrés au cours de ce travail de thèse.

Ce premier chapitre, en s'appuyant sur une étude de la littérature, s'est appliqué à décrire les points qui freinent actuellement l'utilisation de l'air expiré pour des applications médicales, malgré les nombreux avantages que présente ce fluide biologique. Nous avons plus précisément abordé les problématiques liées aux instruments analytiques et évoqué brièvement les avantages que pourraient apporter la GC $\times$ GC et la miniaturisation du prélèvement.

Dans le chapitre suivant, nous détaillerons les travaux effectués sur l'utilisation d'un μ PC pour la préconcentration et l'injection des COV exhalés. Il commencera par une étude de la bibliographie puis nous montrerons, grâce aux résultats obtenus durant cette thèse, que le μ PC permet, entre autres, de réduire le volume d'échantillon nécessaire pour une analyse.

2 Miniaturisation du prélèvement sur puce

2.1 Introduction générale

La facilité d'un prélèvement de l'air expiré couplé à une analyse au pied des malades permettrait de nombreuses analyses simples et non invasives. Cependant, les concentrations des COV dans l'air expiré sont faibles, de la ppmv à la pptv [7,213], une étape de préconcentration est donc nécessaire pour les systèmes d'analyse de l'air expiré. Ce chapitre s'intéresse spécifiquement aux travaux effectués durant cette thèse pour montrer l'intérêt et les avantages d'un système miniaturisé pour le prélèvement et l'injection des COV exhalés dans un système de laboratoire et s'articule autour de trois parties.

Nous commencerons par décrire brièvement le fonctionnement de la thermodésorption, TD, qui est la méthode de référence pour la préconcentration et l'injection des COV contenus dans l'air expiré. Nous détaillerons les limites des systèmes existants, liées à la taille des tubes de prélèvement, qui empêche l'intégration dans des dispositifs transportables.

Dans la deuxième partie, consacrée à une étude de la littérature, nous montrerons comment la miniaturisation de la TD sur puce, grâce à des micropréconcentrateurs, μ PC, permet de s'affranchir des limites de la TD de laboratoire. En effet, un μ PC permet de réduire la taille et la consommation électrique et de simplifier l'architecture. Cette partie montrera également que très peu de résultats qui combinent des μ PC et l'analyse d'air expiré existent dans la littérature, malgré le grand intérêt que pourrait présenter un système d'analyse transportable d'air expiré. Les travaux déjà effectués au CEA LETI sur l'utilisation de μ PC seront également présentés.

La troisième partie présentera les résultats obtenus au cours de cette thèse lors de l'utilisation d'un μ PC intégré dans un prototype portable alimenté par batterie, le système Primosamp. Cette partie montrera que ce système peut prélever et injecter de manière répétable des mélanges simples et des mélanges complexes comme l'air expiré. Une comparaison entre le μ PC et la TD montrera que les performances de ces deux systèmes sont proches. Cependant, le μ PC présente trois avantages majeurs : un système portable alimenté par batterie, une simplification de l'architecture de l'injecteur et une consommation réduite en échantillon.

2.2 La thermodésorption

2.2.1 Concept de la thermodésorption

La TD comme technique d'injection en GC consiste à chauffer un échantillon pour injecter les COV qu'il contient dans un système analytique. Une phase solide appelée adsorbant permet de piéger préalablement les COV lorsque l'échantillon à analyser se présente sous forme gazeuse. C'est la méthode utilisée pour l'air expiré. Pour la TD de laboratoire, les adsorbants sont conditionnés dans des tubes, comme montré dans la figure 2.1.

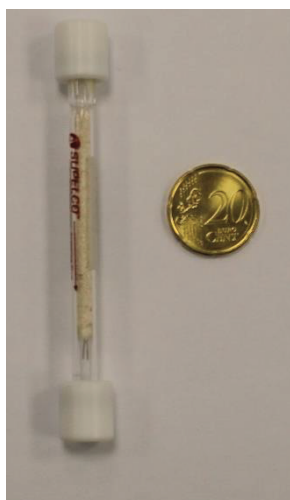


Figure 2.1. Tube de TD. L'adsorbant est la poudre à l'intérieur du tube

Des frittés ou de la laine de verre bloquent l'adsorbant sous forme de poudre dans un tube en verre. L'échantillon à analyser est pompé à travers ce dernier lors du prélèvement. La formation, à température ambiante, d'interactions faibles entre l'adsorbant et les COV piège ces derniers dans le tube. Cela permet également une préconcentration en réduisant le volume dans lequel les COV sont contenus. Le chauffage du tube sous un flux de gaz vecteur injecte les espèces piégées vers le système d'analyse car l'augmentation de la température rompt les liaisons faibles entre l'adsorbant et les composés.

La TD est la méthode la plus utilisée pour l'analyse des COV dans l'air expiré par GC [43] car elle permet de préconcentrer facilement de grands volumes d'air expiré. Cela est souvent nécessaire puisque les concentrations en COV sont faibles dans l'air expiré [7,213].

2.2.2 Limites de la thermodésorption de laboratoire pour un instrument portable

Bien que la TD représente la méthode privilégiée pour préconcentrer et injecter les COV dans l'air expiré, elle présente des limitations qui l'empêchent d'être intégrée dans des systèmes portables. Ces inconvénients sont majoritairement liés à la taille des tubes de TD.

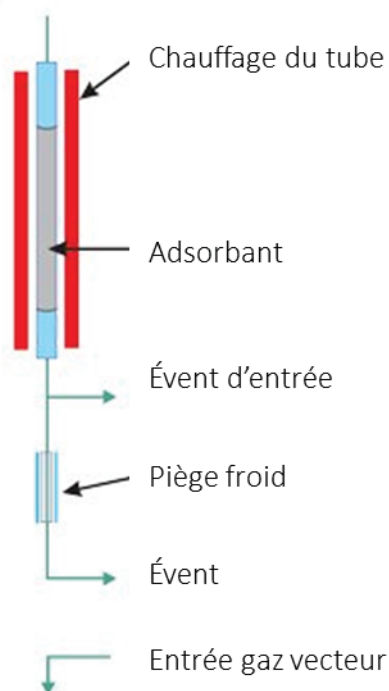
Plusieurs standards de taille de tubes existent pour la TD. Les tubes adaptés pour la machine utilisée dans notre laboratoire mesurent 89 mm de long, avec 4 mm de diamètre externe. La taille des autres standards est du même ordre de grandeur. Lors de l'injection, les tubes doivent être chauffés aux alentours de 250 °C ainsi que tout le chemin analytique, c'est-à-dire toutes les pièces en contact avec les analytes, pour éviter la présence de points froids. Pour une désorption efficace, les tubes doivent être chauffés rapidement. Ce chauffage rapide nécessite une puissance électrique importante de l'ordre du millier de watts à cause de la capacité thermique engendrée par la taille des tubes. Cela limite les possibilités de réduire la taille totale de ces systèmes.

Le volume interne des tubes de TD est de l'ordre de la centaine de millilitres. La désorption des COV contenus dans le tube nécessite donc des débits de l'ordre de la centaine de millilitres par minute [214]. Ces débits sont incompatibles avec la GC sur colonne capillaire qui supporte des débits de l'ordre du millilitre par minute. Afin de coupler TD et GC, le flux de désorption du tube peut être divisé et seule une faible partie est injectée dans la colonne. Cela est cependant dommageable pour l'analyse des composés peu concentrés parce que seule une faible quantité de matière prélevée sur le tube est finalement injectée sur la colonne.

Une solution pour augmenter la quantité d'échantillon injectée sur la colonne consiste à utiliser une architecture plus complexe qui comporte un piège froid. Celui-ci contient le même adsorbant que le tube et refocalise les COV désorbés du tube. À la suite de cette étape, les COV sont injectés dans la colonne. Le piège froid possède un volume plus faible que le tube de TD ce qui permet d'utiliser des débits plus faibles lors de l'injection. La figure 2.2 présente un schéma général d'un système de TD avec refocalisation sur un piège froid.

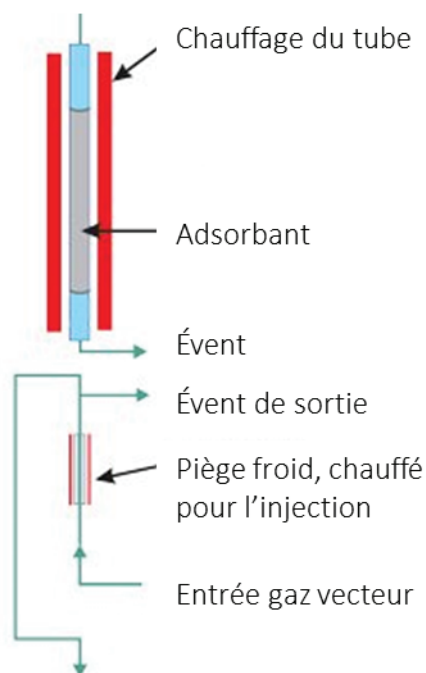
Refocalisation sur le piège froid

Entrée gaz vecteur



Vers colonne GC

Injection de l'échantillon refocalisé vers la colonne



Vers colonne GC

Figure 2.2. Schéma d'utilisation de la TD avec refocalisation sur piège froid, d'après [214]

L'ajout d'un piège froid complexifie cependant l'architecture générale de l'injecteur. La figure 2.3 montre un schéma plus détaillé d'un appareil de TD basé sur la refocalisation sur piège froid. Ce système nécessite de nombreuses vannes et connexions. Pour éviter la présence de points froids dans le système, toutes les pièces en contact avec les analytes doivent également être chauffées. Cela augmente encore la taille globale de cet instrument et sa consommation électrique ce qui limite ainsi son utilisation aux laboratoires.

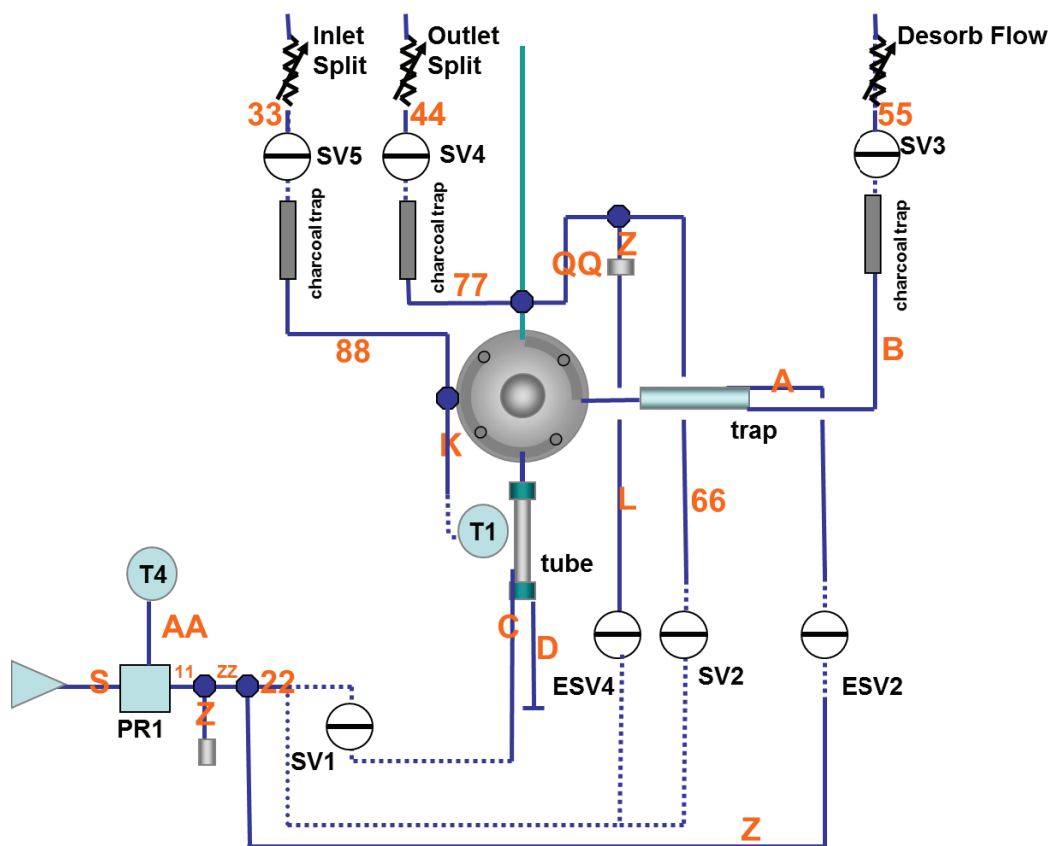


Figure 2.3. Schéma d'un thermodésorbeur TurboMatrix 150 de chez Perkin Elmer

Même en utilisant cette dernière architecture, les débits nécessaires pour désorber le piège demeurent trop élevés pour la colonne de GC. En effet, ils valent environ une dizaine de millilitres par minute. Une partie de l'échantillon est toujours envoyée vers l'évén de sortie, voir figure 2.2, pour générer une injection efficace de la bande de soluté lors de la désorption du piège froid. Cette architecture permet donc d'augmenter la proportion d'échantillon réellement injecté, mais toujours pas l'intégralité. Cela est problématique pour des échantillons comme l'air expiré qui contient des COV peu concentrés.

La TD reste cantonnée au laboratoire pour deux raisons principales : la taille de l'appareil, liée à son architecture complexe, et l'impossibilité de faire fonctionner le système sur batterie à cause des puissances électriques nécessaires, autour du millier de watts. Ces deux raisons découlent directement de la taille des tubes. La capacité thermique des tubes nécessite une puissance électrique élevée pour les chauffer rapidement et le volume interne des tubes impose des débits de désorption élevés. Ces deux éléments complexifient l'architecture de l'injecteur. Un dernier problème de la TD réside dans la perte d'échantillon lors de l'injection sur la colonne.

Une étude de la littérature, présentée dans la partie suivante, montrera que la miniaturisation de l'étape de TD sur puce permet de s'affranchir des problèmes liés au débit et à la capacité thermique. La troisième partie présentera les résultats expérimentaux obtenus durant cette thèse sur l'utilisation d'un système miniaturisé sur puce pour la TD. Ces résultats confirmeront la possibilité d'effectuer de la TD avec un système portable alimenté par batterie avec une architecture simple.

2.3 Miniaturisation de la thermodésorption sur puce, étude bibliographique et résultats existants

2.3.1 Miniaturisation des systèmes analytiques

La miniaturisation des systèmes analytiques représente une tendance forte depuis les années 1990 [215,216], encouragée par les mêmes arguments qui ont entraîné la miniaturisation des composants microélectroniques [217] : réduction de la taille, du temps d'analyse et du coût des systèmes, amélioration des performances, plus faible consommation de ressources. Elle concerne tous les types de systèmes d'analyses et ouvre la possibilité dans le cas des applications médicales à des analyses auprès des malades et à la médecine personnalisée.

La miniaturisation présente plusieurs avantages spécifiques aux systèmes de GC. Les systèmes de GC sont régulés en température mais les fours actuels sont des systèmes de paillasse et possèdent une capacité thermique élevée. Cela nécessite donc des puissances électriques élevées de l'ordre du millier de watts. La taille des puces et leur faible capacité thermique diminuent drastiquement les puissances électriques nécessaires et peuvent permettre de faire fonctionner ces systèmes sur batterie.

La réduction de la taille va dans le sens d'une meilleure efficacité des systèmes de GC. Par exemple, la réduction du diamètre interne des colonnes permet un gain d'efficacité, comme prévu par l'équation de Van Deemter [218]. La réduction de la taille des systèmes analytiques permet également de diminuer les volumes d'échantillons nécessaires, ce qui présente un grand intérêt pour les analyses biologiques.

La fabrication des composants de GC sur puce s'effectue majoritairement grâce aux techniques de fabrication collective sur silicium, transférées de l'industrie de la microélectronique [219]. La fabrication collective permet une réduction du coût de production. Elle permet également d'intégrer directement sur les briques technologiques d'autres fonctions comme le chauffage ou le contrôle de la température.

Les différents arguments qui viennent d'être présentés ouvrent la voie à des systèmes portables pour des applications où une information rapide sur le terrain s'avère essentielle : accidents industriels, sécurité défense, pollutions de l'air. Dans un contexte médical, la

réduction de la taille des systèmes analytiques permettrait d'effectuer l'analyse au pied des personnes.

Pour ces différentes raisons, de nombreuses équipes se sont intéressées à la miniaturisation des systèmes de GC. La première description d'un système de GC miniaturisé date de 1979 [220]. Une vanne d'injection et une colonne de GC sont directement gravées sur une galette de silicium. Un détecteur de conductivité thermique est fabriqué indépendamment et monté en sortie de colonne. Ce dispositif permet de séparer et de détecter des alcanes légers et possède, selon les auteurs, une limite de détection de l'ordre de la dizaine de ppmv. La figure 2.4 montre un chromatogramme obtenu grâce à ce système analytique.

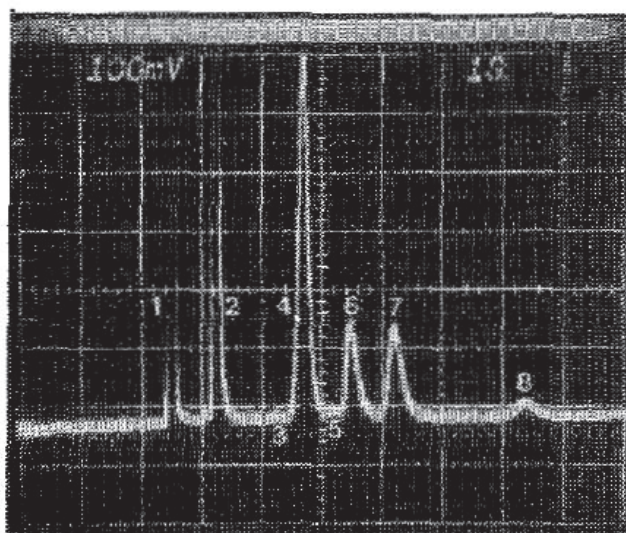


Fig. 8. Miniature GC chromatogram of hydrocarbons on OV-101 stationary phase. Peak 1 nitrogen; 2 n-pentane; 3 3-methylpentane; 4 n-hexane plus chloroform; 5 2,4-dimethyl pentane; 6 1,1,1-trichloroethane; 7 cyclohexane; 8 n-heptane.

Figure 2.4. Chromatogramme obtenu avec le premier système de GC sur silicium, une graduation correspond à une seconde sur l'abscisse, d'après [206]

Depuis, de nombreux autres systèmes ont été développés. Cela concerne aussi bien des briques spécifiques de la chaîne analytique, préconcentrateurs [50], injecteurs [221], colonnes [222–227], détecteurs [228], que des systèmes analytiques entiers [219,228–236]. Ces différents travaux ont fait ressortir les différents avantages espérés : réduction de la consommation électrique [50], possibilité de gradients de température très rapides et très bien contrôlés [224], intégration dans des systèmes portables, légers et fonctionnant sur batteries [219,228,234,237].

La suite de cette partie bibliographique consistera en une étude de la littérature disponible sur les μ PC en général et sur l'utilisation de ces derniers pour l'analyse de l'air expiré. Pour finir, nous décrirons les μ PC et les systèmes qui existaient au laboratoire avant le début de cette thèse.

2.3.2 Les micropréconcentrateurs dans la littérature

L'intérêt de miniaturiser l'étape de préconcentration des COV sur phase solide dans un système sur puce est démontré depuis la fin des années 1990 [238–242]. Les techniques de microfabrication permettent une fabrication collective. Le plus souvent, des cavités sont gravées sur une galette de silicium avec un canal d'entrée et un canal de sortie. Cette cavité est refermée avec une autre galette, puis remplie avec un matériau adsorbant. L'intégration du chauffage et du contrôle de la température se fait directement sur la puce grâce au dépôt de films métalliques qui servent de résistances chauffantes et de sonde de température. Des capillaires sont collés à l'entrée et à la sortie de la puce pour permettre les connexions fluidiques. La figure 2.5 montre une photographie de l'un des premiers μ PC décrits dans la littérature.

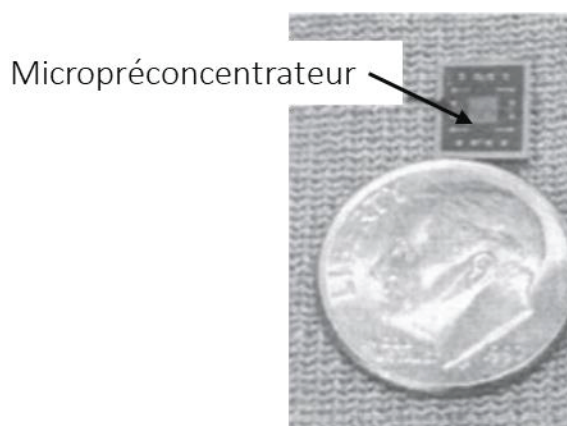


Figure 2.5. Photographie d'un des premiers μ PC décrits dans la littérature à la fin des années 1990, d'après [239]

Un des premiers articles publiés sur le sujet [238] montre déjà tous les avantages que peuvent présenter les micropréconcentrateurs sur silicium : les μ PC permettent de réduire les puissances électriques nécessaires et de simplifier l'architecture des systèmes.

2.3.2.1 Réduction de la consommation électrique

Les dimensions des puces, de l'ordre du centimètre, comme montrées dans la figure 2.5, impliquent une faible capacité thermique. Le chauffage directement intégré sur la puce limite

les déperditions de chaleur. La combinaison de ces deux caractéristiques rend possible le chauffage très rapide des puces avec une faible puissance électrique.

L'une des premières études qui utilise un μ PC [238] décrit une température de 200 °C atteinte en 10 ms avec une puissance de 100 mW. La source de courant n'est pas décrite. Normalement, des vitesses de chauffe de l'ordre de 10 °C/s suffisent pour désorber efficacement les COV piégés sur les μ PC. D'autres études décrivent des rampes de chauffe élevées avec des puissances faibles en utilisant des μ PC où le chauffage est directement intégré. Ainsi, des vitesses de chauffe de 10 °C/s avec 1 W [243], 13,4 °C/s jusqu'à 300 °C avec 2 W [244], 18 °C/s jusqu'à 260 °C avec une alimentation continue 28 V et 2,5 W [245], ou 25 °C/s jusqu'à 200 °C avec une alimentation continue de 18 V [234] sont décrites dans la littérature. Ces résultats sont obtenus avec des alimentations sur secteur mais les puissances électriques nécessaires montrent bien qu'une batterie suffirait pour obtenir ces vitesses de chauffe.

2.3.2.2 Simplification de l'architecture des systèmes

Le faible volume interne des μ PC, de l'ordre du microlitre, permet de désorber efficacement les COV piégés avec des débits directement compatibles avec des colonnes de GC. C'est l'association du faible volume interne des μ PC aux vitesses de chauffe décrites précédemment qui permet des injections efficaces des bandes de solutés par des débits directement compatibles avec la GC. Le μ PC peut alors être connecté directement à la colonne et les architectures plus complexes décrites dans la partie 3.2 sont inutiles. De plus, l'intégralité de l'échantillon est alors injectée, ce qui s'avère bénéfique pour l'analyse d'échantillons contenant des COV peu concentrés. La figure 2.6 montre un chromatogramme de méthylphosphonate de diméthyle, une molécule modèle pour l'analyse du gaz sarin, obtenu en couplant directement un μ PC et une colonne [238].

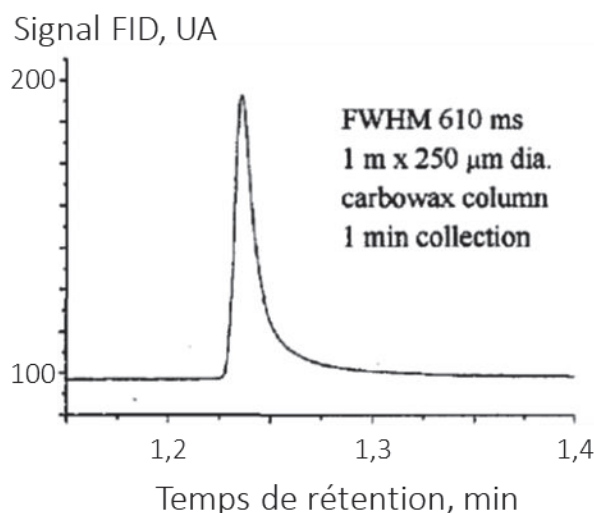


Figure 2.6. Pic de méthylphosphonate de diméthyle obtenu avec un μ PC en injectant l'échantillon directement sur une colonne de 1 m $\times$ 250 μ m DI. Débit = 2 ml/min, d'après [238]

Pour obtenir le pic montré dans la figure 2.6, le μ PC est directement connecté à une colonne de 1 m de long et de 250 μ m de diamètre interne. L'épaisseur du film de phase de type wax n'est pas précisée. Le débit de 2 ml/min est compatible avec la colonne et le pic observé après la séparation chromatographique mesure environ 5 s à la base. Cela montre bien la possibilité d'obtenir des créneaux d'injections étroits en connectant directement le μ PC à la colonne.

Un μ PC permet donc de simplifier l'architecture et de réduire la consommation électrique, grâce à la taille réduite de la puce et au faible volume interne.

2.3.2.3 Utilisation des micropréconcentrateurs

Depuis ces premiers résultats, de nombreuses autres études ont démontré l'intérêt de ces μ PC pour préconcentrer et injecter différents COV dans des systèmes analytiques [50,227,229,233,243–259]. Le benzène a beaucoup été utilisé pour caractériser des μ PC [50,257,259], tout comme des explosifs pour des applications NRBCE [258].

Différents adsorbants ont été utilisés avec des μ PC : Tenax [245,246,255,257], or [227,255], carbopack [50,257], carboxen [244], nanotubes de carbone [258]. Différentes structures de puces ont également été testées : piliers de différentes formes [227,247,250,256,259,260], «réflecteurs paraboliques» [254,255], canaux en parallèle [244,259,261] et des simples cavités [245]. Pour le moment, l'avantage d'une structure par rapport à une autre ne semble pas évident et des études plus poussées semblent nécessaires. Cependant, ces différentes structures pourront présenter des avantages pour la fonctionnalisation collective des μ PC.

Toutes ces publications ont montré l'intérêt des μ PC pour la préconcentration et l'injection de COV. Cependant, peu d'études présentent des résultats de répétitions d'analyses avec le même μ PC ou avec des μ PC différents. La variabilité semble donc représenter un problème avec ces dispositifs. Les résultats obtenus avec des μ PC sont rarement comparés à des équipements de laboratoires comme la TD ou la SPME. Malgré les possibilités d'intégrer ces systèmes dans des dispositifs portables alimentés par batterie, peu d'exemples existent dans la littérature. Pour finir, la très grande majorité des résultats publiés est obtenue avec des mélanges de molécules standard et rarement avec des échantillons réels.

2.3.3 Les micropréconcentrateurs pour l'analyse de l'air expiré

Malgré les études sur des mélanges modèles dans la littérature, peu de résultats existent, à notre connaissance, à propos de l'utilisation d'un μ PC pour préconcentrer les COV exhalés et les analyser dans des systèmes de GC. Les résultats trouvés dans la littérature sont décrits ci-après.

Dans un premier article de 2011 [252], un μ PC à base de film de Tenax est comparé à une fibre SPME PDMS-DVB pour la préconcentration et l'injection d'un même échantillon d'air expiré dans un système GC-MS. Les chromatogrammes de la figure 2.7 montrent que le μ PC à base de Tenax permettrait d'observer plus de pics que la fibre SPME.

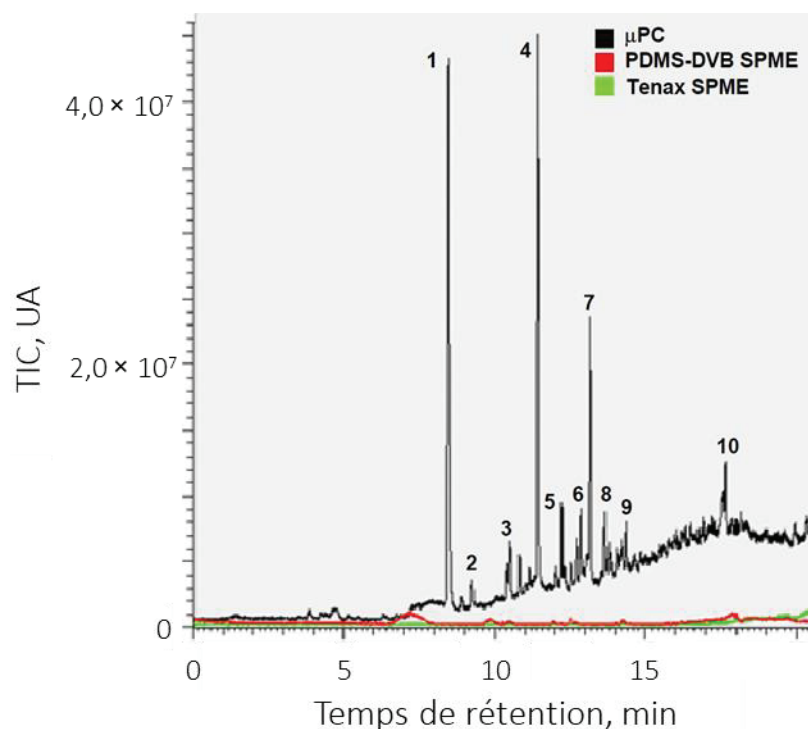


Figure 2.7. Chromatogrammes d'air expiré obtenus par 3 techniques de préconcentration différentes couplées à la GC-MS, en noir avec le μ PC, en rouge avec une fibre SPME PDMS-DVB, en vert avec une fibre SPME Tenax, 10 pics sont identifiés dans le chromatogramme obtenu avec le μ PC, (1) toluène, (2) hexanal, (3) éthylbenzène et p-xylène, (4) styrène, (5) ethylmethylfulvene, (6) ethylmethylbenzène, (7) ethyldimethylbenzène, (8), thienyl benzoate, (9) isopropylcyclohexylamine, (10) dimethylethoxy benzène, d'après [252]

L'impact de ces résultats est cependant limité. En effet, une seule analyse est présentée et aucune application réelle n'est proposée. De plus, les résultats de comparaison avec la SPME semblent assez curieux. En effet, même si l'adsorbant est différent sur la fibre SPME, les chromatogrammes obtenus avec cette technique présentent un signal faible et peu de pics. Cela est surprenant car la SPME représente pourtant la deuxième technique la plus utilisée pour préconcentrer et injecter l'air expiré [43]. Par ailleurs, ces résultats de SPME sont difficiles à analyser car malgré leur importance, les paramètres de prélèvement et d'injections ne sont pas décrits. D'autre part, le μ PC est très peu caractérisé : aucun résultat concernant des répétitions d'injections, des facteurs de préconcentrations ou des démonstrations de la reproductibilité de la fabrication n'est présenté.

Dans un deuxième article de 2013 [255], les mêmes auteurs comparent le μ PC précédent à deux autres μ PC où le Tenax est remplacé par de l'or électrodéposé ou déposé en phase vapeur sur des micropiliers. Ils servent à analyser du propofol, un anesthésiant, dans l'air expiré. La figure 2.8 présente les différents chromatogrammes obtenus.

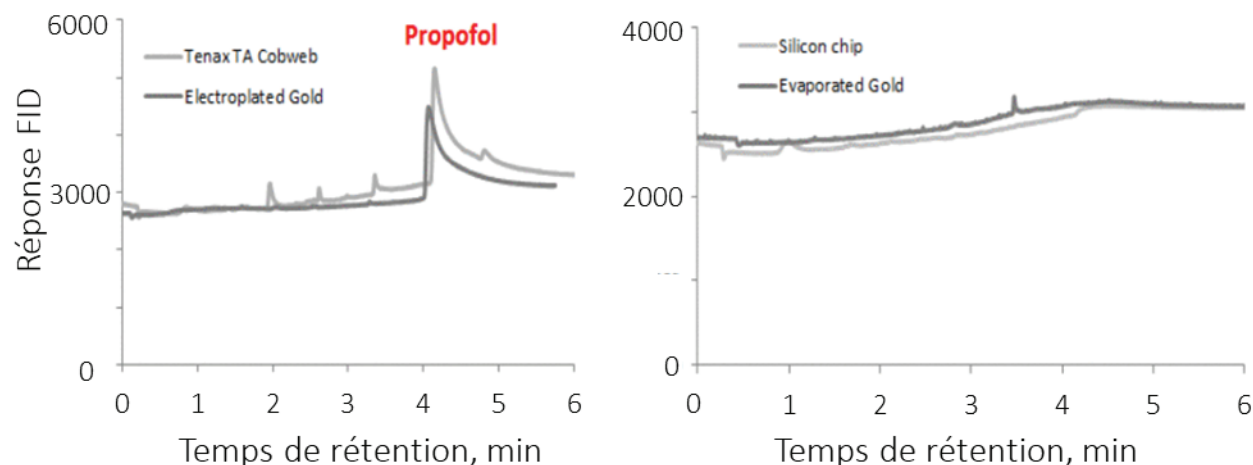


Figure 2.8. Comparaison des performances des μ PC pour la préconcentration et l'injection du propofol dans l'air expiré en fonction de la phase adsorbante utilisée. À gauche une puce contenant du Tenax et une puce contenant de l'or électrodéposé, à droite une puce vide et une puce contenant de l'or déposé en phase vapeur, d'après [255]

L'or déposé en phase vapeur constitue un mauvais adsorbant et ne permet pas de piéger plus de COV qu'une puce qui contient uniquement des micropiliers, comme le montre le chromatogramme dans la figure 2.8. L'or électrodéposé semble préconcentrer plus sélectivement le propofol que le Tenax. Les auteurs proposent alors une analyse directe du propofol contenu dans l'air expiré en couplant directement le μ PC à un MS sans étape de séparation par GC. Cependant, les auteurs de cette étude n'analysent pas directement des échantillons d'air expiré contenant du propofol, mais dopent cette molécule dans un échantillon d'air expiré. Cet exemple montre aussi les possibilités de travailler sur la sélectivité de l'étape de préconcentration pour ne viser que quelques molécules.

Un troisième exemple trouvé dans la littérature concerne l'analyse des aldéhydes exhalés [256], suspectés d'être des marqueurs du cancer. Une puce à piliers est fonctionnalisée avec une amine quaternaire pour préconcentrer spécifiquement les aldéhydes. Les amines réagissent avec ces fonctions et permettent de piéger sélectivement ce type de molécules. Après le prélèvement, cinq microlitres de méthanol permettent d'éluer les COV piégés, puis l'éluat est injecté directement dans un spectromètre de masse au moyen d'une source électrospray. La figure 2.9 montre le spectre de masse observé et l'identification proposée pour certains m/z .

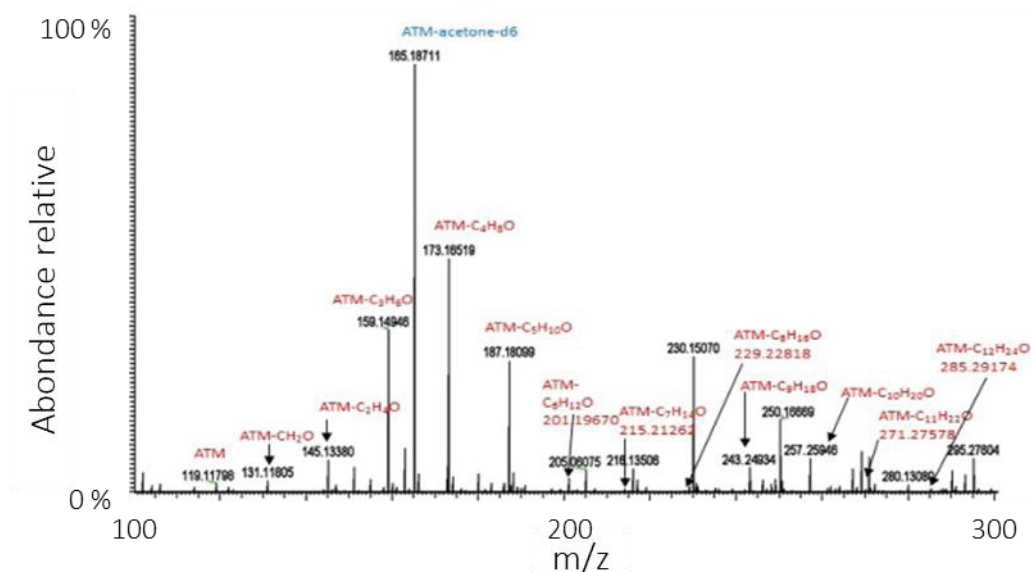


Figure 2.9. Spectre de masse obtenu par préconcentration spécifique des aldéhydes et des cétones dans l'air expiré par un μ PC et injection dans un spectromètre de masse. Les différents pics attribués correspondent à des cétones et des aldéhydes ayant réagi avec la molécule fonctionnalisant le μ PC. d'après [256]

Ce spectre de masse montre toutes les cétones et les aldéhydes analysés dans l'air expiré d'une personne saine grâce au dispositif. Ces résultats sont intéressants parce qu'ils montrent la possibilité de fonctionnaliser des μ PC pour préconcentrer spécifiquement certaines familles de molécules. Cela permet ensuite de s'affranchir de l'étape de chromatographie. La validité des cétones et des aldéhydes comme marqueurs du cancer n'est cependant pas encore vérifiée.

À notre connaissance, les trois figures qui viennent d'être montrées représentent les rares données publiées sur l'utilisation de μ PC pour l'analyse de l'air expiré. Quelques résultats sur l'utilisation de microsystèmes de GC existent également. L'éthanol [262] est analysé en microGC avec des limites de détection de l'ordre de 0,001 g/l. Une autre étude s'intéresse au sévoflurane et au propofol dans l'air expiré [96]. L'intérêt est de suivre ces deux anesthésiants chez des personnes endormies pendant une opération pour adapter au mieux les quantités administrées. La durée d'analyse est réduite à une vingtaine de secondes. Même si la taille du système est réduite, 40 cm $\times$ 30 cm $\times$ 20 cm, le GC n'est qu'un assemblage de pièces commerciales, il fonctionne sur secteur et une bouteille de gaz vecteur est toujours nécessaire.

D'autres publications utilisent les mots « haleine » ou « air expiré » dans le titre des articles, sans jamais analyser des échantillons réels [232,237,251,253,263]. Seuls des résultats obtenus

sur des mélanges de quelques molécules standard sont présentés. La composition beaucoup plus complexe de l'air expiré limite beaucoup l'impact de ces résultats.

2.3.4 Les micropréconcentrateurs au laboratoire

2.3.4.1 Description du micropréconcentrateur

Des prototypes qui utilisaient des μ PC existaient déjà au sein du laboratoire lors du début de cette thèse [228,246]. La figure 2.10 montre une photographie de l'avant et de l'arrière d'un μ PC fabriqué dans notre laboratoire.

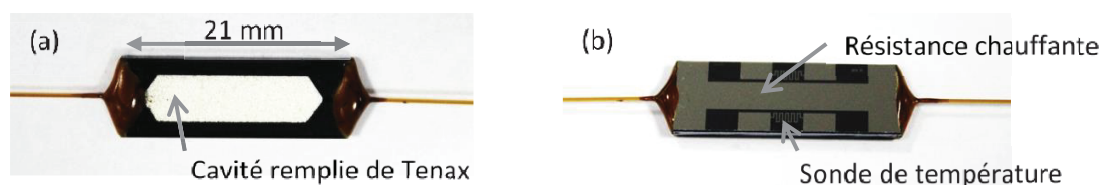


Figure 2.10. Face avant (a), et face arrière (b) du μ PC, sur la face avant le Tenax en blanc, à l'intérieur de la puce est visible à travers le capot en verre; sur la face arrière, la résistance chauffante et la sonde de température directement intégrées sont visibles

La cavité remplie de Tenax est visible sur la face avant tandis que sur la face arrière nous pouvons observer la résistance chauffante et les sondes de température. Ces puces sont fabriquées selon le protocole suivant : les canaux de 400 μ m de section et les cavités de 400 μ m de profondeur et de largeur variable en fonction des puces sont gravés sur une galette de silicium de 200 mm par gravure ionique réactive profonde. Des piliers sont gravés devant le canal de sortie pour empêcher le Tenax en poudre de s'échapper lors du remplissage de la cavité. Une galette de pyrex referme les cavités par scellement anodique de celle-ci sur le dessus des galettes de silicium. Des films de Ti/Pt sont déposés sur la face arrière par dépôt en phase vapeur. Un film sert de résistance chauffante et l'autre film sert de sonde de température. L'épaisseur et la géométrie sont adaptées à chaque usage. Les plaques sont ensuite découpées et la fabrication de chaque puce est achevée individuellement. Un capillaire en silice fondue de 360 μ m de diamètre externe et de 250 μ m de diamètre interne est collé à la sortie de la puce avec de la colle époxy. Ce capillaire est branché à une pompe à vide pour créer une dépression et remplir la cavité en aspirant le Tenax, mesh 60-80. Les piliers gravés devant le canal de sortie empêchent le Tenax de s'échapper. Une fois la cavité remplie, le deuxième capillaire est collé.

2.3.4.2 Première version du prototype

La figure 2.11 présente la première version du dispositif qui permet d'utiliser les μ PC ainsi qu'un schéma d'utilisation.

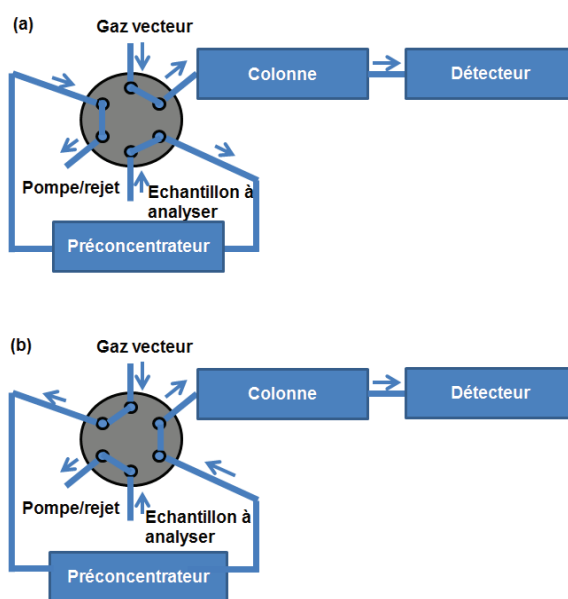
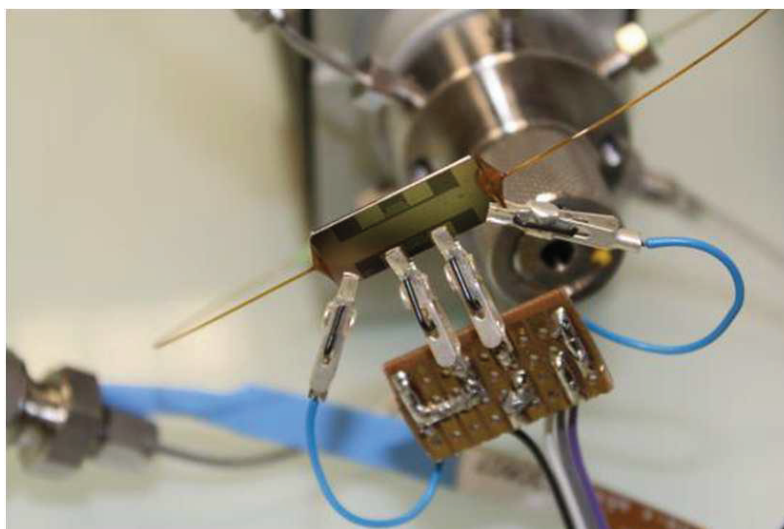


Figure 2.11. Premier système utilisé pour tester les μ PC au sein du laboratoire. Une vanne six voies permet de sélectionner le flux qui balaye le μ PC. En mode prélèvement, a, le μ PC est froid et l'échantillon balaye le μ PC grâce à une pompe. En mode injection, b, c'est le gaz vecteur qui balaye la puce et qui envoie le contenu du μ PC lorsque celui-ci est chauffé vers la colonne de chromatographie.

Ce système est basé sur l'utilisation d'une vanne six voies deux positions. En fonction de la position de la vanne, le gaz vecteur balaye la puce ou non. Dans la position (a), la vanne place le μ PC entre une pompe et l'échantillon pour préconcentrer ce dernier sur la puce. La vanne bascule en position (b) au moment du chauffage de la puce, c'est-à-dire l'injection. Le gaz vecteur balaye alors la puce et permet le transfert de l'échantillon vers la colonne de chromatographie.

Ce système a permis d'effectuer les premiers tests au sein du laboratoire, mais présente tout de même un certain nombre d'inconvénients car il est compliqué et fragile. De plus, la vanne est placée à l'extérieur du four de chromatographie, ce qui provoque des volumes morts et des points froids dommageables à la séparation chromatographique.

2.3.4.3 Deuxième version du prototype

Une deuxième version a été développée pour résoudre les désagréments que nous venons d'évoquer. Les puces sont placées dans des cartouches avec une entrée et une sortie équipées de raccords 1/16 " habituellement utilisés en chromatographie. Cela simplifie les connexions fluidiques avec le système analytique et facilite la manipulation des μ PC. La figure 2.12 présente le schéma d'utilisation de cette deuxième version.

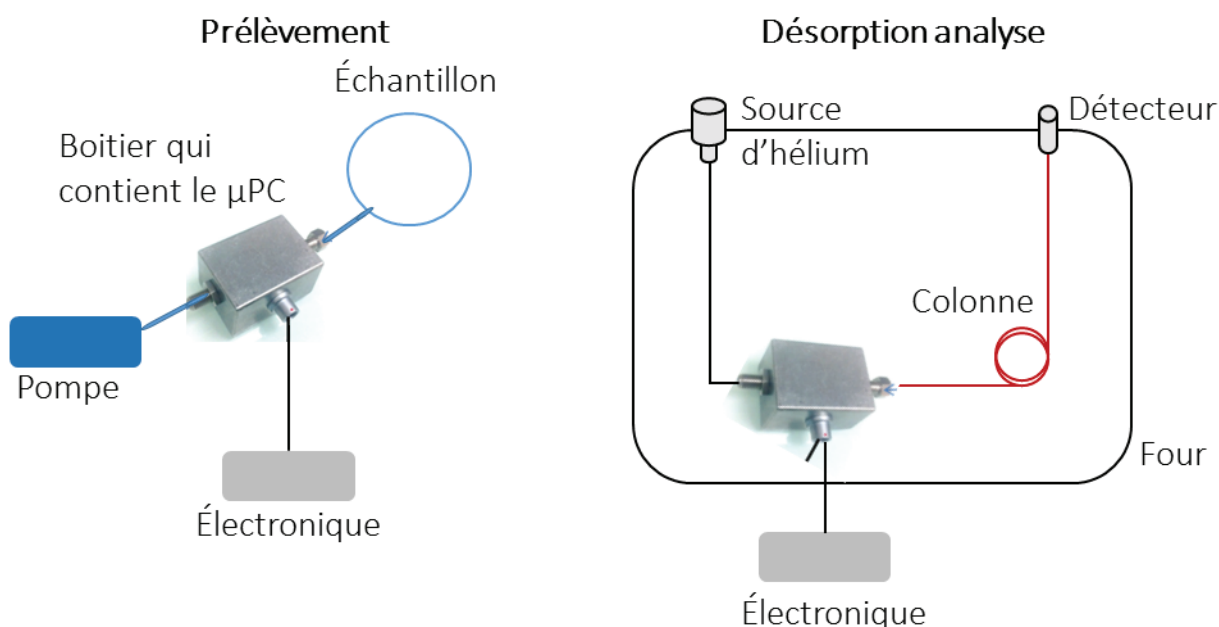


Figure 2.12. Deuxième version du système utilisé pour tester les μ PC au sein du laboratoire, la cartouche qui contient le μ PC est placée directement dans le four. Une connexion électrique permet de relier le boîtier à l'électronique de contrôle à l'extérieur du four. Cette architecture permet de supprimer les points froids et de réduire les volumes extracolones.

Lors du prélèvement de l'échantillon, la cartouche qui contient le μ PC se situe entre une pompe et l'échantillon, pour prélever et préconcentrer ce dernier. Lors de l'injection, la cartouche est placée directement dans le four entre l'injecteur utilisé comme source d'hélium et la colonne. Cela réduit au maximum les volumes morts et simplifie l'architecture générale de l'injecteur. Les points froids sont également évités car la cartouche se situe à l'intérieur du four. Les raccords 1/16" facilitent la connexion entre la puce et la colonne. Les connexions électriques pour chauffer et contrôler la température sont déportées à l'extérieur de la

cartouche. Il est alors possible de relier la cartouche située dans le four à l'électronique de contrôle à l'extérieur du four. Le chauffage de la puce est lancé en même temps que le début du gradient sur le four de GC pour permettre l'analyse de l'échantillon.

2.3.4.4 Résultats existants

Les deux systèmes développés au sein du laboratoire et présentés ci-dessus ont permis de démontrer l'intérêt des μ PC à travers plusieurs résultats. Tout d'abord, les μ PC permettent d'observer des pics fins en utilisant une architecture simple d'injecteur. Un chromatogramme obtenu pour du toluène est présenté dans la figure 2.13 et montre que le pic observé après la séparation mesure environ 5 s. Cela signifie donc que l'injection est bien ponctuelle. Les paramètres expérimentaux sont détaillés dans la légende.

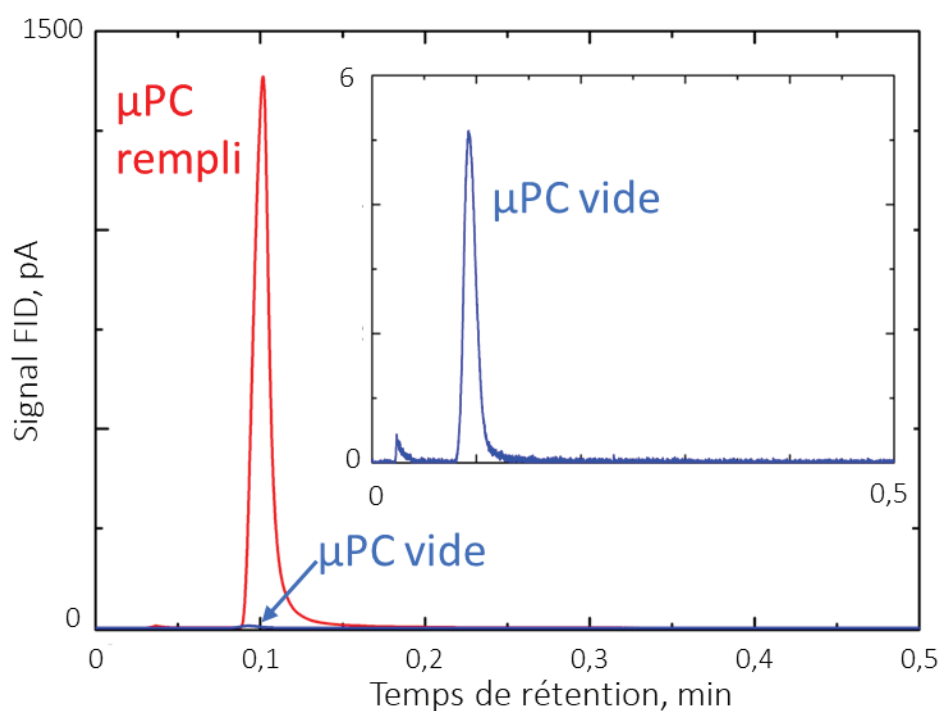


Figure 2.13. Superposition de deux chromatogrammes montrant le pic de toluène obtenu avec une puce remplie, en rouge, et une puce vide, en bleu. Colonne PDMS, 2 m; 100 μ m DI, 0,1 μ m de phase, séparation isotherme à 40 °C, débit 0,8 ml/min, d'après [246]

La figure 2.13 montre également un chromatogramme, en bleu, obtenu dans les mêmes conditions avec une puce vide. Un zoom sur le chromatogramme montre ce pic très peu intense. Avec le μ PC vide, l'intensité du pic vaut environ 5 pA. L'intensité du pic obtenue avec le μ PC rempli vaut environ 1400 pA. La puce fabriquée au laboratoire permet donc bien de préconcentrer un échantillon de toluène.

Les facteurs de préconcentration atteignables avec la puce pour le toluène ont également été déterminés. Le facteur de préconcentration est défini comme le signal obtenu après préconcentration sur une puce remplie divisé par le signal obtenu avec une puce vide. Pour cela, différentes expériences ont été réalisées en augmentant le temps de prélèvement. La figure 2.14 résume ces résultats.

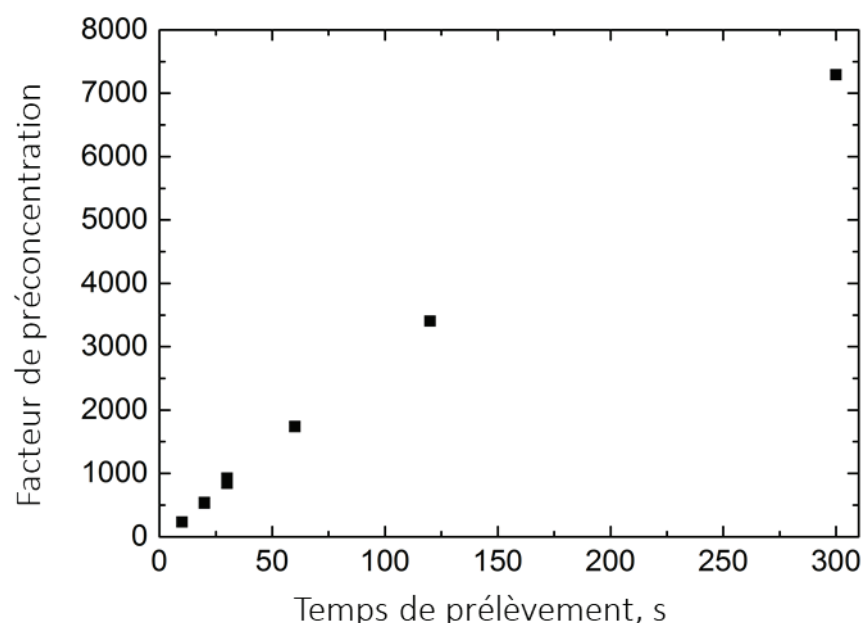


Figure 2.14. Facteur de préconcentration en fonction du temps de prélèvement pour le toluène avec un μ PC, d'après [246]

Des facteurs de préconcentration de l'ordre de 7000 sont facilement atteignables pour le toluène en utilisant le μ PC pour des prélèvements de 5 min.

Ces résultats illustrent bien l'intérêt des μ PC fabriqués au laboratoire. Il reste tout de même à intégrer ces μ PC dans un système portable, fonctionnant sur batteries. La variabilité de l'injection avec une même puce et avec plusieurs puces n'a pas non plus été étudiée en détail et les puces restent encore fragiles au niveau des capillaires.

2.3.5 Conclusion sur les micropréconcentrateurs dans la littérature

Cette partie bibliographique a décrit brièvement les publications sur les μ PC pour la préconcentration des COV. Ces μ PC permettent de réduire la taille des systèmes de préconcentration et d'injection et de réduire de deux ordres de grandeur les puissances nécessaires par rapport aux instruments de laboratoire. Cependant, les performances des μ PC sont rarement comparées à des instruments de laboratoire de type SPME ou TD. Peu de résultats existent dans la littérature sur la variabilité entraînée par l'utilisation de μ PC pour le

prélèvement et l'injection de mélange de COV. Malgré les avantages espérés d'un système de GC portable d'analyse de l'air expiré, seules quelques preuves de concept d'utilisation de μ PC pour l'air expiré existent, sans exemples d'applications réelles.

Cette partie a également présenté les μ PC déjà développés au laboratoire ainsi que les prototypes existants. La prochaine partie présentera des résultats obtenus avec ces μ PC en utilisant un nouveau système portable sur batterie. Des études de variabilités sur des échantillons simples seront présentées et les performances seront comparées à un système de TD de laboratoire. Le même type de travail sera effectué pour des échantillons d'air expiré.

2.4 Résultats expérimentaux : caractérisation du micropréconcentrateur et du système Primosamp sur mélanges modèles et échantillons réels

2.4.1 Introduction

Même si les μ PC permettent de réduire la taille des systèmes analytiques et la consommation électrique, peu de résultats existent sur l'utilisation d'un système portable et fonctionnant sur batterie embarquant un μ PC. Nous décrirons dans ce chapitre le prototype portable Primosamp, développé au laboratoire. Celui-ci fonctionne sur batterie et permet à la fois de prélever des échantillons sur le μ PC puis de les injecter dans des systèmes d'analyse. Nous montrerons que ce système permet d'injecter efficacement des COV dans un système de GC-MS en réduisant le volume d'échantillon nécessaire par rapport à un système de TD de laboratoire.

De même, peu de résultats de répétition existent pour des mélanges simples et peu de comparaisons avec des instruments de laboratoire de type TD ont été effectuées. Une partie des résultats expérimentaux étudiera la variabilité des μ PC pour le prélèvement et l'injection d'un mélange simple de benzène toluène, éthylbenzène et o-xylène, BTEX. Ces résultats de variabilité seront comparés à ceux obtenus avec un système de TD de laboratoire.

Pour finir, nous comparerons des résultats obtenus avec un μ PC et un système de TD de laboratoire pour la préconcentration et l'injection du même échantillon d'air expiré. Ces résultats montreront que les μ PC permettent de prélever et d'injecter de l'air expiré de manière répétable. Finalement, ces résultats montreront que le μ PC présente trois avantages par rapport à la TD : portabilité, alimentation par batterie et réduction du volume d'échantillon nécessaire.

2.4.2 Un prototype portable alimenté par batterie

2.4.2.1 Présentation du système Primosamp

Lors du début de cette thèse, un nouveau système d'utilisation des μ PC, nommé Primosamp était en cours de conception au laboratoire. Il s'agissait de concevoir un système sur batterie, autonome, pour le prélèvement d'échantillons gazeux sur les puces de préconcentration et pour l'injection des échantillons prélevés. Le système complet fonctionne sur batterie et peut effectuer le conditionnement, le prélèvement et l'injection, puisqu'il permet de chauffer

directement le μ PC et contient une pompe pour le prélèvement. La figure 2.15 montre des photos des différentes parties du système. Le mode de fonctionnement reste proche du prototype présenté dans la partie 2.3.4.3, page 74, avec un certain nombre d'améliorations.

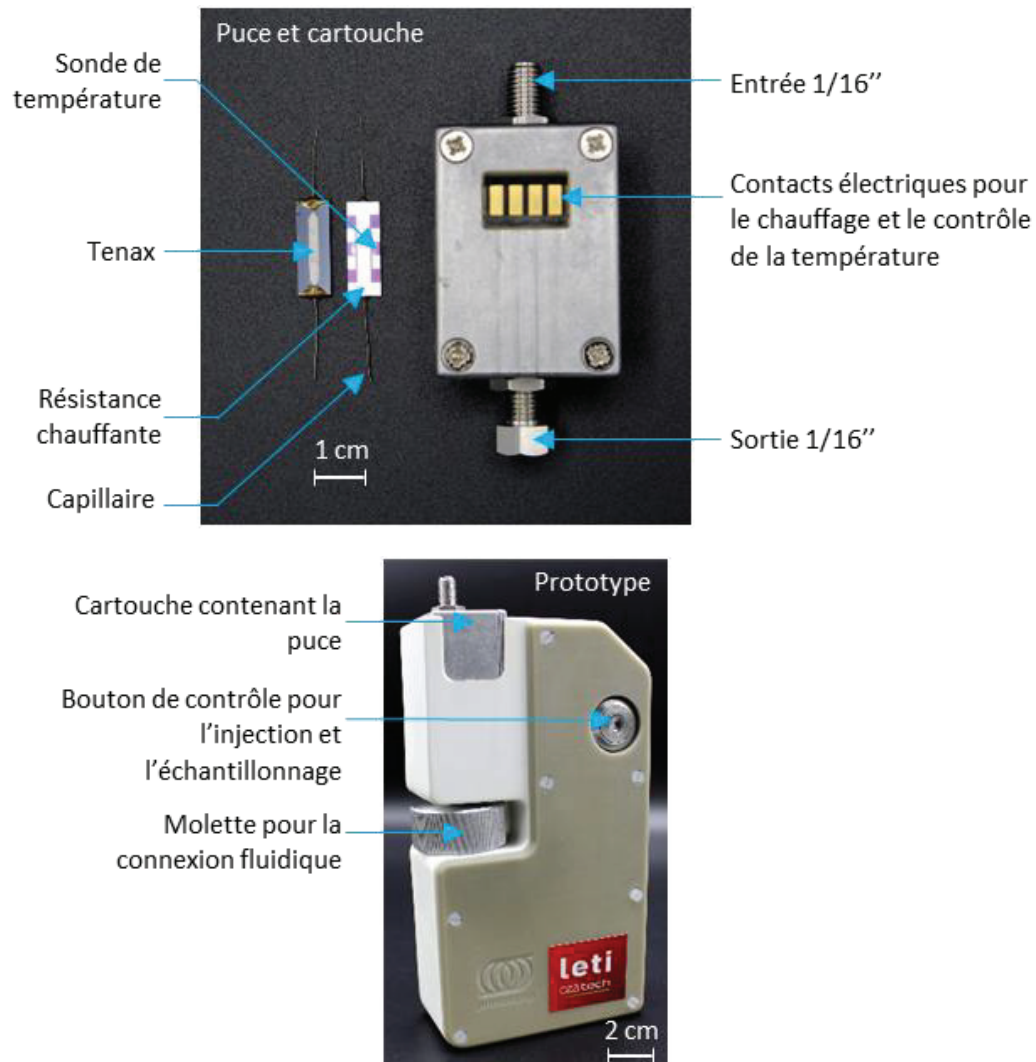


Figure 2.15. Image de la face avant et de la face arrière de la puce, du boîtier qui contient la puce, et du prototype Primosamp, photographie Thomas Chappuis

Tout d'abord, le prototype fonctionne sur batterie et peut donc être transporté. La prise de contact électrique entre la cartouche et le prototype se fait grâce à des contacts à glissière. Le prototype est muni de deux boutons qui permettent de contrôler le prélèvement, l'injection et le conditionnement du μ PC.

Pour le prélèvement, la cartouche est insérée dans le prototype comme montré sur la figure 2.15. La connexion fluidique est réalisée grâce à la molette qui intègre une connexion 1/16". Cette molette permet une connexion simple de la cartouche à la pompe, sans outils. Un appui court sur un des deux boutons du prototype allume la pompe pour prélever un

échantillon environnemental ou un échantillon contenu dans un sac Tedlar en reliant ce dernier à l'entrée de la cartouche.

Lors de l'injection, un connecteur s'insère dans le prototype à la place d'une cartouche. Il permet d'établir les contacts électriques entre la cartouche, placée à l'intérieur du four, et le prototype placé à l'extérieur. En l'état actuel du développement, l'injecteur monté dans le four de GC sert comme source d'hélium lors de l'injection et de l'analyse des composés dans le μ PC. La figure 2.16 montre une photo du dispositif lors de l'injection.

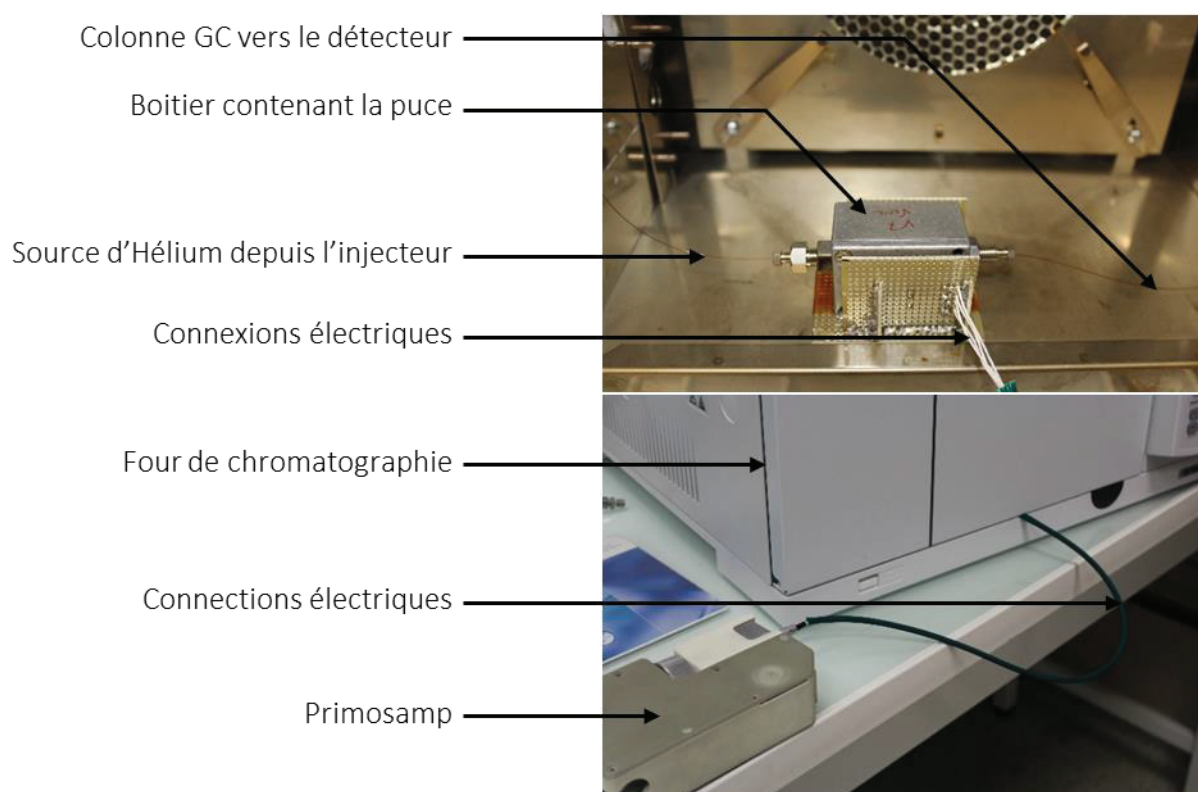


Figure 2.16. μ PC et Primosamp reliés à un système de GC pour injection, photographie, Florence Ricoul

Un appui long sur un des deux boutons du prototype permet de chauffer le μ PC, ce qui permet d'injecter le mélange de COV dans la colonne.

2.4.2.2 Débogage du système Primosamp

Les premiers tests avec ce prototype ont eu lieu, entre autres, dans le cadre de cette thèse. Pour faire fonctionner le système, nous avons effectué différentes adaptations et améliorations.

Les capillaires en silice fondue utilisés pour assurer la connexion fluide entre les puces et les autres éléments cassaient facilement lorsqu'ils subissaient une contrainte mécanique.

Beaucoup de μ PC ont été détruits lors du montage dans les cartouches à cause de la casse des capillaires. Pour contrecarrer cette fragilité, nous avons remplacé les capillaires en silice fondue par des capillaires en nickel. Comme le nickel est ductile, les capillaires se déforment et ne cassent pas. Les contacts électriques sur la puce pour le chauffage et la mesure de température s'effectuent au moyen de pinces crocodiles, qui glissaient une fois la puce montée dans le boîtier. Pour éviter cela, les pinces sont désormais collées sur la puce au moyen d'une colle conductrice électrique.

Un des problèmes récurrents rencontrés lors de la fabrication de briques analytiques pour la GC consiste à obtenir une connexion fluide étanche aux gaz, qui supporte des cycles répétés et violents de chauffe et de refroidissement compris entre la température ambiante et 250 °C. Lors des premiers essais, les températures maximales subies par la puce étaient de 150 °C. L'air expiré peut contenir des molécules avec une masse moléculaire et une température d'ébullition élevées [213]. Ainsi, par rapport aux expériences réalisées au début de cette thèse, la température du four est plus élevée. De manière plus générale, chauffer les puces à des températures aux alentours de 300 °C présente un intérêt pour désorber quantitativement une large gamme de composés pour d'autres applications. Les premières colles utilisées pour fixer les capillaires étaient des colles de type époxy avec des températures de dégradation autour de 230 °C. De nombreuses publications proposent de coincer les puces de préconcentration ou les colonnes de GC dans des enclos métalliques qui possèdent des filetages [264–266]. Cela permet la connexion fluide entre le capillaire et la puce au moyen d'un écrou et d'une fêrle. Cependant, cela augmente énormément la masse thermique de l'ensemble, ce qui empêche de le chauffer rapidement avec une alimentation par batterie. Ainsi, nous avons modifié le processus de collage des capillaires pour augmenter la température limite d'utilisation.

Il a également fallu changer les câbles électriques, ainsi que les gaines isolantes utilisées à l'intérieur des cartouches. En effet, les différents isolants ne résistaient pas à des températures de 250 °C. Les connexions électriques ont également été revues. En effet, la brasure utilisée initialement possédait une température de fusion de 200 °C. Les contacts électriques se rompaient après quelques analyses.

Les systèmes actuels permettent de chauffer les puces à 210 °C pendant 15 s et de les placer dans des fours de chromatographie où les températures peuvent atteindre 250 °C pendant

10 min. Même si les fours peuvent monter à 400 °C, les connecteurs électriques ne supportent actuellement pas des températures plus élevées. Certaines puces ont servi pour plus de 50 analyses sans fuite. Cette amélioration du prototype a été réalisée en collaboration avec différentes personnes au sein du laboratoire, avec des compétences variées : électronique, mécanique, microfabrication, design industriel.

2.4.3 Matériel et méthodes

Sauf indication contraire, les résultats présentés dans les parties suivantes ont été obtenus en utilisant les paramètres décrits dans cette partie. Si jamais les paramètres diffèrent, cela est clairement indiqué et les conditions utilisées sont précisées.

2.4.3.1 Calcul des débits

Pour les calculs de débits dans les colonnes, le logiciel «EZGC Flow calculator» de Restek, disponible en ligne, a été utilisé [267].

2.4.3.2 Échantillonnage des gaz

Tous les sacs Tedlar de 1 l, 24633, ont été fournis par Supelco. Avant chaque utilisation, les sacs étaient remplis avec de l'azote 5.0, Air Liquide, et vidés avec une pompe à vide, et ce protocole était répété 3 fois. Le mélange de benzène, toluène, éthylbenzène et o-xylène à une concentration de 500 ppbv a été fourni par Air Liquide et était stocké sous pression dans une bouteille de type B50.

2.4.3.3 Système de GC-MS

Un four de chromatographie en phase gazeuse, Clarus 500, Perkin Elmer, couplé à un spectromètre de masse, Clarus 560 S, Perkin Elmer, a été utilisé. Les séparations sont effectuées grâce à une colonne de 15 m de long, 250 µm de diamètre interne et ayant 0,25 µm d'épaisseur de phase. La phase stationnaire est de type 5ms, Supelco, 28469-U. La pression en hélium en tête de colonne est fixée à 69 kPa. Le gradient de température est le suivant : 50 °C pendant 1 min, puis une rampe de 20 °C/min jusqu'à 230 °C, cette température est ensuite maintenue pendant 5 min. La sortie de la colonne est connectée au spectromètre de masse au moyen d'une ligne de transfert chauffée à 300 °C. Le spectromètre de masse est de type simple quadripôle avec une source d'ionisation électronique à 70 eV et mesure les rapports masse/charge compris entre 15 et 200 à une fréquence de 4 Hz. La température de la source est fixée à 200 °C.

2.4.3.4 Injection avec Primosamp

Lors de l'injection, une source d'hélium contrôlable, dans notre cas l'injecteur split splitless monté sur le four de chromatographie, est reliée au μ PC par un capillaire en silice fondue de 250 μ m de diamètre interne et 360 μ m de diamètre externe. La connexion entre le capillaire et le μ PC se fait grâce à une férule réductrice, VICI, FS1.4-5, et à un écrou 1/16". Le même dispositif permet de connecter la colonne à la sortie du μ PC. Lors de l'injection, le chauffage du μ PC est lancé manuellement en appuyant sur un bouton du prototype, en même temps que le gradient et l'acquisition MS sont déclenchés sur le GC. La température de consigne du μ PC est de 220 °C. Une fois cette température atteinte, elle est maintenue pour que le chauffage du μ PC dure 15 s au total.

2.4.3.5 Thermodésorption de laboratoire

Des manipulations ont eu lieu sur un système de TD de laboratoire, TurboMatrix 350, Perkin Elmer, pour comparer le μ PC à un système de laboratoire. Des tubes contenant du Tenax, 20896-U Supelco, sont utilisés. Pour le prélèvement, une pompe Elf air sampling, 28160-U, Supelco est utilisée. Le système de TD est placé à l'extérieur du four de GC et relié par une ligne de transfert en silice fondue de 360 μ m de diamètre externe et de 250 μ m de diamètre interne chauffée à 300 °C. Pour l'injection, les tubes sont chauffés à 260 °C pendant 5 min sous un débit de 70 ml/min d'azote, après une purge de 1 min. L'échantillon est refocalisé sur un piège contenant du Tenax refroidi à une température de -20 °C. Tout le chemin par lequel passe l'échantillon dans l'appareil de TD, vannes, tubulures, connexions, est chauffé à 290 °C. L'injection de l'échantillon refocalisé a lieu lors du chauffage du piège à 265 °C avec un débit de désorption de 12,5 ml/min. La pression en tête de colonne est de 69 kPa, ce qui correspond à un débit de 2,5 ml/min, calculé avec le logiciel Restek. Comme le débit de désorption du piège est de 12,5 ml/min, cela signifie que 20 % seulement de l'échantillon est injecté vers la colonne.

2.4.4 Caractérisation du système Primosamp et comparaison à la thermodésorption de laboratoire pour l'analyse d'un mélange simple

Les premiers résultats obtenus au sein du laboratoire avaient montré le potentiel des μ PC pour analyser des mélanges simples de COV. Le premier objectif dans le cadre de cette thèse consistait à mieux comprendre les performances des μ PC et de comparer ces performances à

un instrument de TD de laboratoire, sur des mélanges synthétiques simples. Un mélange de benzène, toluène, éthylbenzène et o-xylène a été utilisé à une concentration de 500 ppbv.

2.4.4.1 *Thermodésorption avec un système portable fonctionnant sur batterie*

Le μ PC fabriqué par le LETI permet de simplifier l'architecture de l'injecteur tout en conservant les performances de l'injection. Cependant, les résultats précédents ont été obtenus en utilisant un système qui fonctionne sur une alimentation secteur, présenté dans la figure 2.12. Le nouveau système Primosamp fonctionne sur batterie. Nous avons commencé par vérifier que les performances étaient toujours identiques. Comme tout le système est dimensionné pour fonctionner avec 12 V et 2 A, les caractéristiques de la batterie, 1100 mAh, 25 C, devraient permettre le même fonctionnement que l'alimentation secteur.

Tout d'abord, nous avons vérifié que le système sur batterie permet bien de chauffer rapidement le μ PC. La figure 2.17 montre la température au cours du temps du μ PC lors de l'injection en utilisant le système alimenté par batterie. Le temps total d'injection vaut 15 s et la température de consigne est de 210 °C.

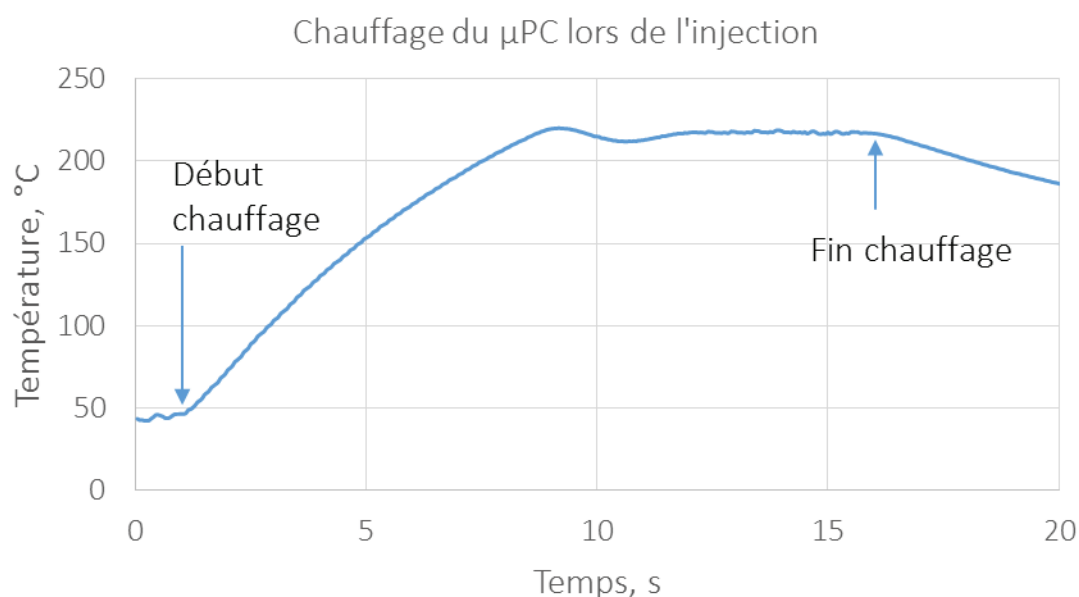


Figure 2.17. Température du μ PC au cours du temps lors de l'injection avec le système Primosamp fonctionnant sur batterie

La courbe de chauffage de la puce montre qu'une vitesse de chauffe d'environ 21 °C/s est atteignable avec une simple batterie 12 V, 1100 mAh, 25 C. En effet, la température passe de 40 °C à 210 °C en approximativement huit secondes. Cette vitesse de chauffe suffit pour injecter ponctuellement les COV piégés sur les μ PC directement dans une colonne de GC.

Le volume interne de la puce vaut environ 20 μl . Dans les conditions de fonctionnement lors de l'injection, au début de l'analyse, pression de 69 kPa, température de 50 °C, colonne de 15 m et de 250 μm de diamètre interne, le débit dans la colonne vaut 2,3 ml/min. Si le chauffage de la puce est très rapide, l'injection de bandes de composés qui possèdent une largeur d'environ 0,4 s devient alors possible.

Un échantillon de BTEX à 500 ppbv a donc été prélevé sur le μPC puis injecté dans le système de GC-MS, en connectant directement l'entrée de la colonne à la sortie du μPC . La figure 2.18 montre le pic du benzène obtenu après la séparation chromatographique. Nous avons choisi ce composé pour étudier l'efficacité de l'injection car c'est le pic le moins retenu. Il est donc le plus sensible aux effets extracolonne et peu de refocalisation a lieu en tête de colonne pour compenser une injection non ponctuelle.

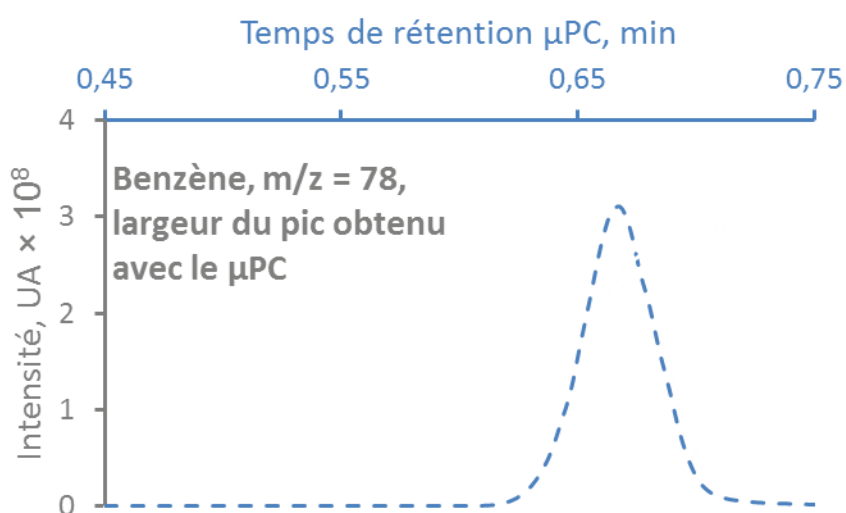


Figure 2.18. Largeur du pic de benzène détecté avec le MS après séparation chromatographique obtenu en utilisant Primosamp pour préconcentrer le benzène sur un μPC et l'injecter dans une colonne 5ms, 15 m, 0,25 mm DI, 0,25 μm de film avec une pression en tête de colonne de 69 kPa

Le pic de benzène possède une largeur à la base d'environ 6 s après l'étape de séparation chromatographique, ce qui confirme que l'injection est bien ponctuelle. Cette largeur de pic est tout à fait acceptable au vu des dimensions de la colonne de GC. C'est la combinaison d'un faible volume facilement balayé par le gaz vecteur et d'un chauffage rapide qui permet une injection efficace des solutés piégés sur le μPC avec un système portable alimenté par une batterie et une architecture plus simple que les instruments de laboratoire.

2.4.4.2 Consommation d'échantillon : micropréconcentrateur versus thermodésorption de laboratoire

Comme expliqué dans la partie 2.2, un système de TD de laboratoire ne permet pas d'injecter l'intégralité de l'échantillon dans la colonne de GC en raison de la division de débit nécessaire pour générer une injection ponctuelle. Avec un μ PC, tout l'échantillon prélevé est injecté dans le système de GC-MS. Nous avons donc voulu quantifier l'économie d'échantillon possible en utilisant le μ PC à la place du système de TD.

Pour ce faire, nous avons modifié les paramètres du TD pour obtenir des largeurs de pic identiques à celles obtenues avec le μ PC. La largeur du pic vaut environ 6 s avec la colonne de 15 m de long et de 250 μ m de diamètre interne lorsque le débit de désorption du piège froid vaut 12,5 ml/min. La pression en tête de colonne est fixée à 69 kPa et impose un débit dans la colonne de 2,3 ml/min. Cela signifie que $2,3/12,5 \times 100 = 18 \%$ de l'échantillon concentré sur le piège froid est injecté dans la colonne. Dans ces conditions, environ 80 % de l'échantillon prélevé sur le tube n'atteint jamais le détecteur, ce qui correspond à un split de 5.

Pour comparer ces deux cas de figure, un échantillon de BTEX est prélevé sur le μ PC et sur le TD et injecté sur le système de GC-MS. Les volumes prélevés sont adaptés entre les deux dispositifs pour obtenir la même quantité d'échantillon injecté sur la colonne. Dans le cas du μ PC, 7 ml d'échantillon sont prélevés en 15 s à un débit de 28 ml/min. 35 ml sont prélevés sur le tube de TD en 19 s à un débit de 110 ml/min. La figure 2.19 montre les chromatogrammes superposés des pics de benzène obtenus dans les deux cas.

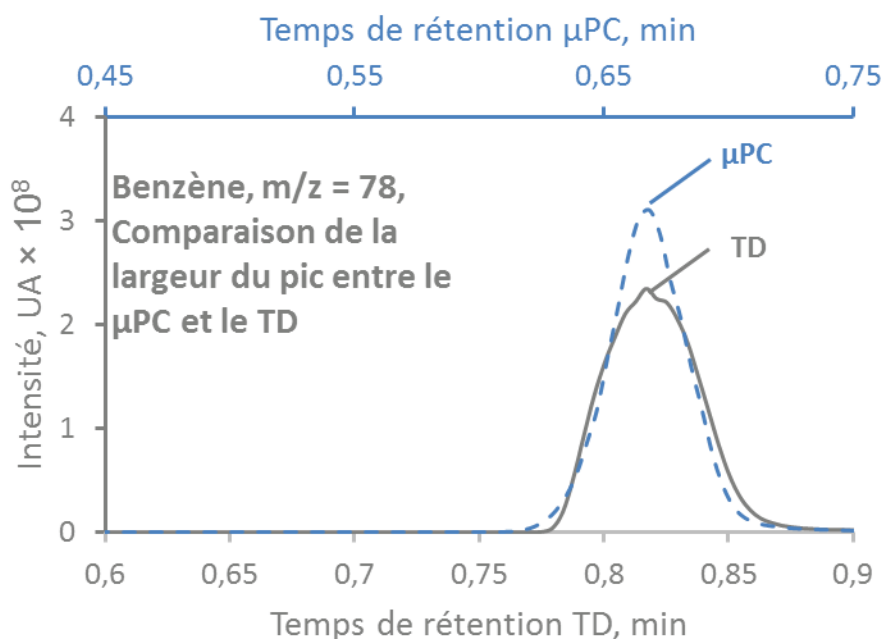


Figure 2.19. Superposition des pics de benzène obtenus avec un TD commercial et le μ PC

Les axes de temps pour le μ PC et le TD sont différents. En effet, le TD se situe à l'extérieur du four de GC et est relié à la colonne par une ligne de transfert alors que le μ PC est directement connecté à la colonne à l'intérieur du four. Cela explique le temps de rétention plus faible dans le cas du μ PC. La figure 2.19 montre bien que pour un split de 5, le pic obtenu après séparation chromatographique présente la même largeur pour le TD et le μ PC. Dans les conditions utilisées ici, le μ PC nécessite un volume d'échantillon 5 fois plus faible pour obtenir des résultats identiques au TD.

Malgré la différence de volume d'échantillon nécessaire, le temps de prélèvement reste du même ordre de grandeur avec le μ PC et le tube de TD. En effet, la perte de charge dans la puce est beaucoup plus grande à cause de la taille des capillaires utilisés. Le prélèvement par dépression entraîne l'impossibilité physique d'obtenir des différences de pression plus grandes qu'environ 1013 hPa. La pompe que nous avons utilisée et qui s'intègre dans notre système portable alimenté par batterie permet d'obtenir une différence de pression de 500 hPa. À cause de la perte de charge imposée par la taille des capillaires utilisés pour les μ PC, il n'est pas possible d'obtenir des débits plus élevés avec cette différence de pression. Il serait possible d'augmenter la taille des capillaires, mais cela aurait pour effet d'augmenter le volume extracolonne. Cela pourrait entraîner un élargissement du créneau d'injection dans la colonne après la désorption. Pour le moment, l'influence de la taille de la cavité contenant

l'adsorbant a été étudiée [246], mais pas l'influence du diamètre interne des capillaires utilisés pour les connexions. L'étude de ce phénomène semble intéressante pour connaître son influence sur la largeur du pic et pour savoir si concilier finesse du créneau d'injection et prélèvement à débit plus élevé est possible, ou si un compromis entre ces deux paramètres s'avère nécessaire.

2.4.4.3 Variabilité du prélèvement et de l'injection avec un micropréconcentrateur pour l'analyse de mélanges simples

Afin de quantifier la variabilité des μ PC pour le prélèvement et parce qu'elle est rarement décrite dans la littérature, nous avons commencé par étudier la variabilité des μ PC pour le prélèvement et l'injection de mélanges simples de BTEX. Pour cela, nous avons analysé un échantillon de BTEX trois fois par jour pendant quatre jours, avec le même μ PC à chaque fois. Un prélèvement neuf de BTEX était réalisé à partir de la bouteille de l'échantillon gazeux dans un sac Tedlar de 1 l avant chaque transfert vers le μ PC pour éviter la dégradation de l'échantillon dans le sac Tedlar. La figure 2.20 montre les trois chromatogrammes obtenus le deuxième jour.

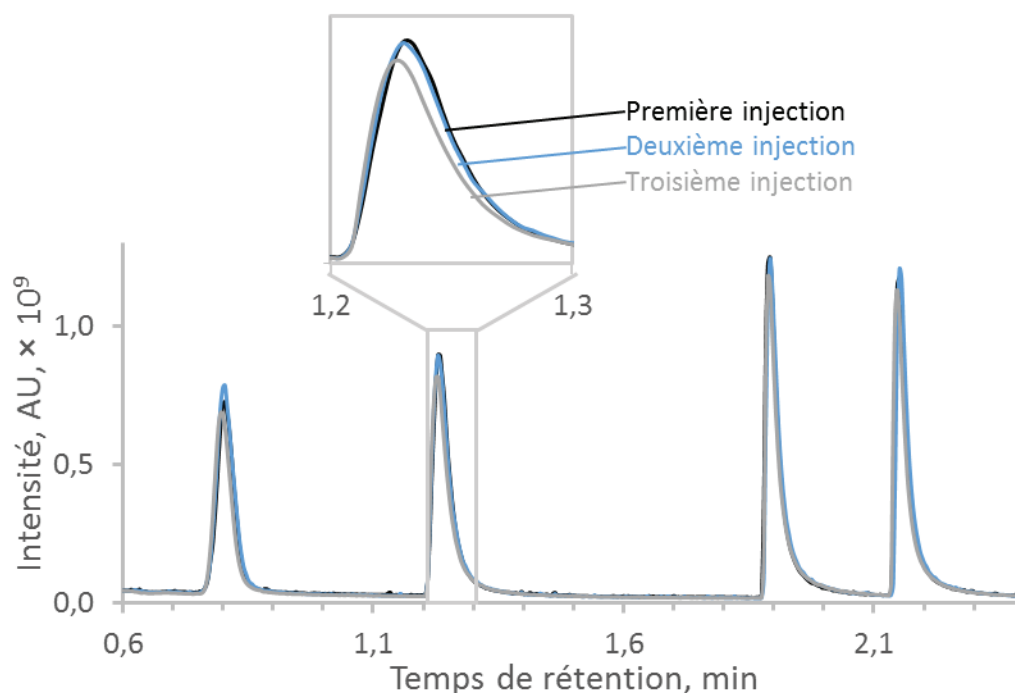


Figure 2.20. Chromatogrammes obtenus lors de trois analyses consécutives avec le μ PC d'un mélange de BTEX le jour 2

Pour commencer, nous pouvons observer que le prélèvement et l'injection avec le μ PC semblent répétables. Malgré une synchronisation manuelle du début de gradient et de

l'injection et un contrôle manuel du temps de prélèvement, les temps de rétention sont très proches, comme le montrent les résultats résumés dans le tableau 2.1. Ainsi, pour trois injections le même jour les coefficients de variation, CV, valent moins de 0,4 % pour les quatre COV.

Tableau 2.1. Temps de rétention des pics des chromatogrammes présentés dans la figure 2.20

	Temps de rétention, en min			CV
	Injection 1	Injection 2	Injection 3	
Benzène	0,804	0,804	0,799	0,4 %
Toluène	1,233	1,230	1,225	0,3 %
Éthylbenzène	1,893	1,892	1,888	0,1 %
Xylène	2,151	2,151	2,147	0,1 %

Pour une analyse quantitative de ces résultats, nous avons calculé l'aire moyenne de chaque pic pour chaque jour et pour les douze injections, ainsi que les coefficients de variations associés. Le tableau 2.2 résume ces résultats. Nous avons utilisé la masse la plus intense pour chaque composé pour calculer les aires des pics.

Tableau 2.2. Aire des pics de BTEX avec le μ PC pour la répétition de trois analyses par jour pendant quatre jours

	Jour 1, n = 3		Jour 2, n = 3		Jour 3 n = 3		Jour 4 n = 3		Total, n = 12	
	Moyenne	CV	Moyenne	CV	Moyenne	CV	Moyenne	CV	Moyenne	CV
Benzène, m/z = 78	1,2	6 %	1,1	11 %	1,4	11 %	1,3	3 %	1,2	12 %
Toluène, m/z = 91	1,4	5 %	1,2	12 %	1,6	9 %	1,5	3 %	1,4	11 %
Éthylbenzène, m/z = 91	1,5	5 %	1,3	4 %	1,7	9 %	1,6	1 %	1,5	12 %
O-xylène, m/z = 91	1,3	4 %	0,97	4 %	1,3	10 %	1,3	3 %	1,2	12 %

Même si le temps de prélèvement est contrôlé manuellement, les coefficients de variation sur les aires des pics pour les quatre molécules valent moins de 12 % pour trois analyses répétées pendant quatre jours. Si le temps de prélèvement était programmé, nous pourrions espérer des coefficients de variation des aires des pics plus faibles. En effet, puisque le prélèvement dure 20 s, une erreur de 1 s représente déjà 5 % d'échantillon en plus ou en moins.

En utilisant des tests statistiques de type ANOVA, détaillés en annexe, la variance jour, la répétabilité et la fidélité intermédiaire ont également été calculées et sont présentées dans le tableau 2.3

Tableau 2.3. Répétabilité, variance jour et fidélité intermédiaire avec le μ PC

	Répétabilité	Variance jour	Fidélité intermédiaire
Benzène, m/z = 78	8,3 %	10,2 %	13,2 %
Toluène, m/z = 91	7,7 %	9,2 %	12,0 %
Éthylbenzène, m/z = 91	5,8 %	11,4 %	12,8 %
O-xylène, m/z = 91	5,9 %	12,2 %	13,6 %

La moyenne de la fidélité intermédiaire obtenue avec le μ PC pour les quatre COV vaut 12,9 %. Ces résultats sont tout à fait acceptables pour ce genre de méthode de préconcentration et d'injection. De plus, des pistes d'amélioration simples existent, comme expliquées juste avant. Après avoir étudié la variabilité de nos μ PC, nous avons voulu la comparer à celle obtenue avec un système de laboratoire.

2.4.4.4 Comparaison de la variabilité du micropréconcentrateur et de la thermodésorption de laboratoire pour l'analyse de mélanges simples

Les performances des μ PC sont rarement comparées à celles d'instruments de laboratoire, comme la TD. Pour effectuer cette comparaison, nous avons réalisé la même expérience que celle effectuée dans la partie 2.4.4.3 avec un μ PC en utilisant un TD de laboratoire. Ces expériences nous ont permis de calculer la répétabilité, la variance jour et la fidélité intermédiaire obtenues avec cet instrument de référence. Le tableau 2.4 résume ces différentes valeurs.

Tableau 2.4. Moyennes des aires des pics de BTEX obtenues avec le TD de laboratoire, pour la répétition de trois analyses par jour pendant quatre jours

	Moyenne, n = 12	CV, n = 12	Répétabilité	Variance jour	Fidélité intermédiaire
Benzène, m/z = 78	1,2	6,7 %	5,0 %	5,0 %	7,1 %
Toluène, m/z = 91	1,2	7,1 %	4,7 %	5,9 %	7,6 %
Éthylbenzène, m/z = 91	1,3	8,2 %	3,9 %	7,9 %	8,8 %
O-xylène, m/z = 91	1,1	7,8 %	3,9 %	7,5 %	8,4 %

Ces résultats montrent que le TD présente une variabilité plus faible que le μ PC. En effet, la fidélité intermédiaire moyenne pour les quatre COV avec le TD est de 8 % alors qu'elle vaut 12,9 % avec le μ PC. Cependant, c'est surtout la variance jour qui est plus élevée dans le cas du μ PC. Les pompes utilisées pour le prélèvement pourraient expliquer ces différences. Celles utilisées lors du prélèvement sur les tubes possèdent une précision de 2,5 % et celles utilisées dans Primosamp possèdent une précision de 5 %. Même si les valeurs de répétabilité, de variance jour et de fidélité du TD sont inférieures à celles du μ PC, la variabilité observée avec le μ PC reste tout à fait acceptable pour ce genre de méthode de prélèvement et d'injection. De plus, un contrôle électronique du temps de prélèvement devrait permettre de mieux le contrôler ce qui améliorerait sûrement les performances du système. Finalement, l'utilisation de pompes avec de meilleures spécifications entrainerait une variabilité plus faible si cela s'avère nécessaire.

2.4.4.5 Variabilité de fabrication des puces

Après avoir étudié la variabilité en utilisant un unique μ PC, nous nous sommes intéressés à la variabilité entre les μ PC. En mesurant le débit de prélèvement de différentes puces, des valeurs différentes, entre 20 et 30 ml/min, sont observées d'un μ PC à l'autre. Comme la pompe utilisée dans le prototype Primosamp impose une différence de pression fixe, cela signifie que les puces possèdent une perte de charge différente. Ces variations sont attribuées à des longueurs de capillaires différentes et à des remplissages hétérogènes des puces avec la poudre de Tenax.

Des prélèvements et injections de BTEX ont été effectués avec trois μ PC. Le temps de prélèvement est adapté d'une puce à l'autre afin d'échantillonner des volumes identiques. Le tableau 2.5 résume les aires des pics de BTEX obtenues avec chaque μ PC ainsi que les coefficients de variation correspondants.

Tableau 2.5. Comparaison des aires des pics des BTEX en utilisant trois μ PC différents.

	μ PC 1	μ PC 2	μ PC 3	CV
Benzène, m/z = 78	1,2	1,3	1,2	7 %
Toluène, m/z = 91	1,4	1,4	1,3	6 %
Éthylbenzène, m/z = 91	1,6	1,5	1,5	5 %
O-xylène, m/z = 91	1,2	1,1	1,1	4 %

En adaptant le temps de prélèvement pour échantillonner des volumes identiques, les coefficients de variation pour le prélèvement et l'injection des BTEX pour trois puces différentes sont inférieurs à 7 % c'est-à-dire du même niveau que les coefficients de variation obtenus lorsqu'une puce unique est utilisée pour analyser trois fois le même échantillon de BTEX le même jour, comme le montre le tableau 2.2. Cela signifie donc qu'en contrôlant bien le débit, changer de puce influence peu la variabilité des résultats. Le contrôle du débit dans le système Primosamp lors du prélèvement permettrait de s'affranchir des problèmes de pertes de charge. Cependant, les débitmètres sont des appareils plutôt encombrants et chers. Une autre solution consisterait à calibrer les puces pour qu'elles possèdent toutes une résistance fluidique identique.

2.4.5 Préconcentration et injection d'air expiré avec un micropréconcentrateur et comparaison avec la thermodésorption de laboratoire

2.4.5.1 *Variabilité du micropréconcentrateur pour la préconcentration et l'injection d'air expiré*

Après avoir été caractérisés sur des mélanges simples, nous avons utilisé les μ PC pour préconcentrer et injecter des échantillons plus complexes. Un même échantillon d'air expiré a été analysé plusieurs fois de suite. Pour obtenir cet échantillon, une personne a rempli un sac Tedlar de 1 l avec une seule expiration. Ce mode de prélèvement fournit un échantillon d'air expiré mixte qui n'est pas le plus adapté pour des applications médicales, comme expliqué précédemment. En effet, il ne permet pas d'analyser uniquement l'air de fin de respiration, car ce dernier est mélangé à l'air ambiant. Cependant, comme aucune interprétation biomédicale n'est effectuée avec les résultats obtenus et que nous souhaitons uniquement caractériser la répétabilité du μ PC, une contamination de l'air de fin de respiration par l'air ambiant ne semble pas problématique.

Trois analyses ont été effectuées les unes après les autres, en utilisant le même μ PC. Ainsi, lors la troisième analyse, l'échantillon a été stocké environ deux heures de plus dans le sac Tedlar par rapport à la première analyse. La figure 2.21 montre les trois chromatogrammes superposés ainsi qu'un agrandissement de la base du chromatogramme pour observer les pics moins intenses.

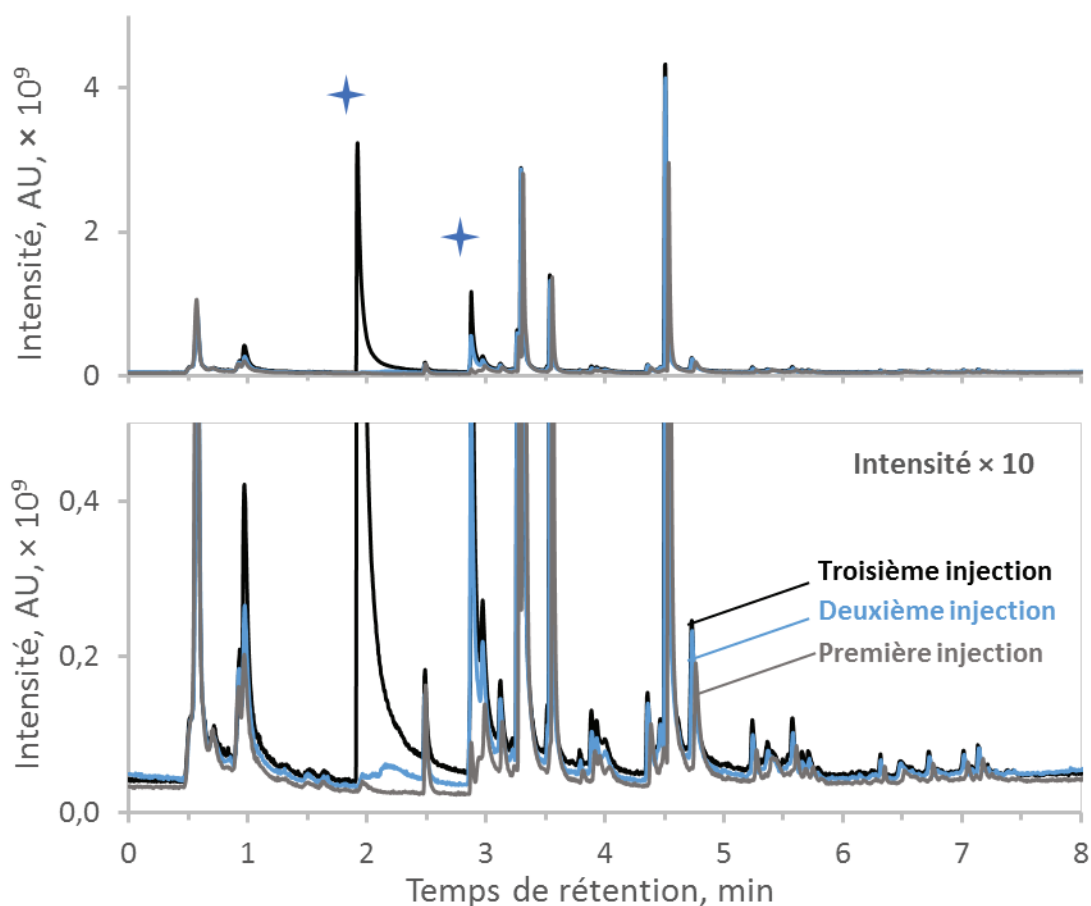


Figure 2.21. Superposition de trois chromatogrammes obtenus pour trois injections d'un même échantillon d'air expiré sain avec un μ PC, les étoiles désignent des pics liés à une contamination par le sac Tedlar.

Deux pics présentent des différences importantes entre les trois injections et des étoiles les signalent dans la figure 2.21. Grâce à la spectrométrie de masse, le pic à 2 min est attribué au N,N-Diméthylacetamide, CAS 127-19-5 et le pic à 2,9 min est attribué au phénol, CAS 108-95-2. Ces deux pics correspondent à deux polluants connus des sacs Tedlar, ce qui explique la plus grande concentration observée pour la troisième injection.

Nous avons utilisé les dix pics les plus intenses, hormis les deux pics précédents, pour étudier plus en détail la variabilité de la préconcentration et de l'injection d'air expiré par le μ PC dans un système de GC-MS. Pour les trois injections, les aires moyennes des pics sont calculées en utilisant l'ion le plus abondant pour chaque pic ainsi que les coefficients de variation correspondants. Le tableau 2.6 résume ces résultats.

Tableau 2.6. Temps de rétention et coefficients de variation des aires des dix pics les plus intenses pour trois analyses du même échantillon d'air expiré avec préconcentration et injection avec un μ PC

Pic	T _r , min	m/z utilisé	CV, n = 3
1	4,51	81	20 %
2	3,31	68	8 %
3	3,54	93	12 %
4	0,57	43	17 %
5	3,26	119	3 %
6	0,98	45	47 %
7	3,29	94	3 %
8	4,77	44	12 %
9	2,48	93	10 %
10	3,12	93	12 %

Pour neuf des dix pics les plus intenses, les coefficients de variation valent moins de 20 % pour ces trois injections. Ces résultats sont jugés satisfaisants sachant que la dégradation des COV dans les sacs Tedlar se produit rapidement pour certaines espèces [117]. De plus, pour sept molécules les coefficients de variation sont compris entre 3 et 12 %. Ces coefficients de variation sont du même ordre de grandeur que lors de l'analyse de trois échantillons de BTEX le même jour, comme montré dans le tableau 2.2. Cela laisse donc penser que les coefficients de variation plus élevés observés pour les autres molécules sont bien dus à la dégradation. Ces expériences confirment donc que les μ PC peuvent préconcentrer et injecter de manière répétable des échantillons complexes tels que l'air expiré.

2.4.5.2 Comparaison du micropréconcentrateur et du thermodésorbeur de laboratoire pour la préconcentration et l'injection d'air expiré

Pour comparer les performances de la TD de laboratoire à notre μ PC, un même échantillon d'air expiré est préconcentré avec les deux systèmes et injecté dans le système de GC-MS précédemment décrit. Pour le prélèvement, une personne remplit un sac Tedlar de 1 l avec une expiration forcée. Comme dans le cas de l'étude de la répétabilité, un échantillon d'air expiré mixte est prélevé. L'air de fin de respiration est donc mélangé à l'air ambiant. Comme l'expérience sert uniquement à comparer la TD de laboratoire et le μ PC, ce n'est toujours pas problématique.

Pour injecter la même quantité de matière sur la colonne, les temps de prélèvement sont adaptés. En effet, comme montré pour le benzène précédemment à la page 97, seul 1/5 de l'échantillon prélevé sur le tube est injecté sur la colonne. Par conséquent, 140 ml sont prélevés sur le μ PC en 5 min à un débit de 28 ml/min et 700 ml sont prélevés sur le tube en 7 min à un débit de 100 ml/min.

La figure 2.22 présente les deux chromatogrammes en miroir afin de faciliter leur comparaison. Le gradient de température utilisé pour l'analyse par GC diffère de celui décrit dans la section méthode et est précisé dans la légende.

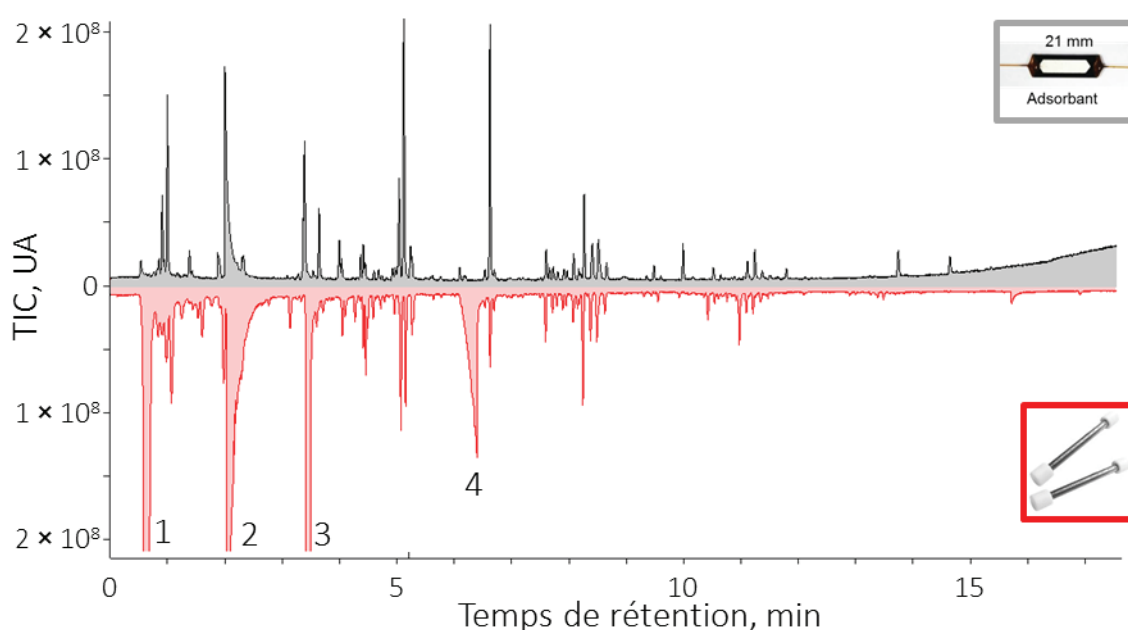


Figure 2.22. Chromatogrammes d'air expiré sain obtenus en préconcentrant et injectant l'échantillon avec le μ PC ou la TD de laboratoire, gradient : 50 °C pendant 1 min, 10 °C/min jusqu'à 230 °C, pendant 5 min

Quatre différences majeures sont observées et sont signalées par des numéros sur la figure 2.22. Le pic 3 à 3,5 min est identifié comme du phénol et le pic 4 à 6,4 min comme le benzaldéhyde. Ces deux molécules sont des produits de dégradation du Tenax [268]. Comme le tube contient une quantité beaucoup plus grande de Tenax que le μ PC, 600 mg versus 2 mg, ces produits de dégradation se retrouvent en plus grande quantité dans le chromatogramme obtenu avec le tube de TD. Le pic 2 observé à 2 min constitue une autre différence. Il correspond au N,N-Diméthylacetamide, CAS 127-19-5. C'est un des contaminants connus des sacs Tedlar déjà cités auparavant. Il est également présent dans le chromatogramme obtenu avec le μ PC, mais le pic est moins intense. Cela peut s'expliquer par

le fait que l'échantillon a d'abord été transféré sur le μ PC, puis sur le tube. L'échantillon a donc été stocké plus longtemps dans le sac Tedlar dans le cas du tube.

La dernière différence concerne le pic 1 à 0,8 min. Une étude du spectre de masse montre que ce pic correspond surtout à l'acétone et à l'éthanol. Plus généralement, ce pic doit contenir de nombreuses molécules volatiles, car il correspond à peu près au temps mort de la colonne dont la chimie, 5ms, sépare en fonction de la volatilité. Ce pic qui correspond aux molécules très volatiles est très peu intense dans le chromatogramme du μ PC par rapport au chromatogramme obtenu avec le TD. Cela s'explique par le fait que le Tenax adsorbe peu les molécules très volatiles.

Les volumes de fuite pour l'acétone et l'éthanol sur le Tenax valent respectivement 6 ml/mg et 1,8 ml/mg à 20 °C [269]. Le μ PC contient environ 2 mg de phase. Très rapidement, le volume de fuite est atteint pour ces deux molécules, ce qui limite le facteur de préconcentration avec la puce. Dans le cas du tube, le rapport entre la quantité de phase et le volume prélevé est différent. En effet, le volume prélevé est cinq fois plus grand, mais un tube contient environ 630 mg de phase, c'est-à-dire 300 fois plus que le μ PC. Cela explique que ces molécules peu retenues par le Tenax soient tout de même observées. Pour les pics avec un temps de rétention supérieur à 4 min, les chromatogrammes obtenus présentent le même profil.

Le μ PC permet donc une simplification de l'architecture de l'injection et une réduction du volume d'échantillon nécessaire, même pour des échantillons complexes comme l'air expiré. Cependant, l'utilisation de μ PC semble réduire la gamme des COV préconcentrables avec le Tenax. Les composés très volatils comme l'éthanol et l'acétone ne sont pas préconcentrés en raison d'un volume de fuite trop faible. Cependant, si le μ PC est utilisé pour des analyses de routine ou les marqueurs sont déjà connus, il est possible d'adapter l'adsorbant utilisé en fonction des applications.

De plus, différentes solutions existent pour limiter la fuite des molécules légères. Il est possible de fabriquer des puces qui contiendraient plusieurs adsorbants de plus en plus forts en série [243,270]. Il est aussi possible d'augmenter la taille de la cavité, et donc la masse de Tenax, mais cela risque de faire perdre les avantages liés au faible volume de la puce pour injecter un créneau de molécules ponctuel. De plus, l'impact est limité, car il n'est pas

possible d'augmenter indéfiniment la taille de la puce. Il serait possible d'augmenter la taille des puces en conservant les efficacités d'injections en appliquant une pression plus forte au moment de l'injection pour générer des injections ponctuelles. Cela existe déjà pour des injections en voie liquide de type « splitless ».

2.4.5.3 Quantité d'eau injectée, thermodésorption de laboratoire versus micropréconcentrateur

L'air expiré est très riche en eau qui peut représenter jusqu'à 5 % de l'échantillon. Même si le Tenax retient peu l'eau, comme le montre le volume de fuite de 0,065 l/g à 20 °C [269], cela représente tout de même une grande quantité de matière. L'eau représente un problème dans les systèmes de chromatographie en phase gazeuse puisqu'elle détériore les phases stationnaires. En TD de laboratoire avec un système de refocalisation sur piège froid, l'eau représente également un problème car elle peut en effet geler et former des cristaux à l'entrée du piège froid lors de la refocalisation, ce qui bouche le système [214]. Nous n'avons pas rencontré ces problèmes, même en utilisant le système de laboratoire avec de l'air expiré. Cependant, utiliser un μ PC exclut complètement cette seconde possibilité puisque l'étape de refocalisation n'existe plus.

Nous avons donc également vérifié si utiliser un μ PC à la place du TD permettait d'injecter moins d'eau dans la colonne de GC. En effet, un μ PC contient environ 2 mg de Tenax alors qu'un tube de TD en contient environ 600. Cela signifie que le volume de fuite de l'eau vaut 130 μ l pour le μ PC et 42,3 ml pour le tube de TD. Dans les conditions utilisées pour l'appareil de TD de laboratoire, avec 80 % de l'échantillon prélevé sur le tube envoyé à l'évent, le tube injecte environ $42,3/0,130/5 \approx 60$ fois plus d'eau dans la colonne que le μ PC.

La spectrométrie de masse permet de détecter l'eau dans les échantillons injectés. Les chromatogrammes du rapport $m/z = 18$ correspondant à l'eau ont donc été comparés entre les deux expériences déjà montrées dans la partie précédente. Les deux chromatogrammes ioniques extraits sont montrés dans la figure 2.23.

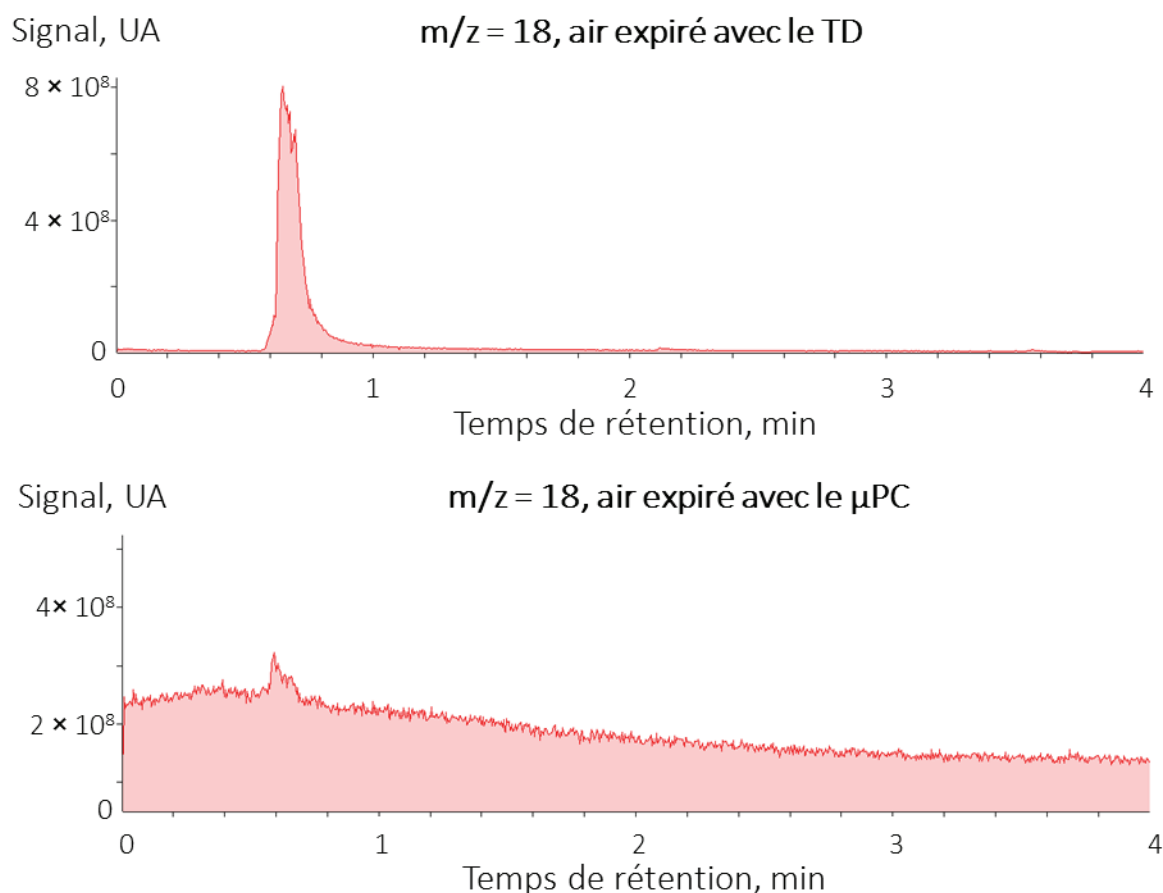


Figure 2.23. Comparaison des pics d'eau obtenus avec un TD et un μ PC pour l'analyse d'un échantillon d'air expiré

Le pic d'eau obtenu avec le TD est plus intense que le pic d'eau obtenu avec le μ PC. Cependant, le bruit de fond de l'eau est plus important avec le μ PC qu'avec le système de TD.

Les différences de quantité de Tenax dans le μ PC et le tube de TD devraient normalement permettre d'injecter moins d'eau dans le système de chromatographie en utilisant le μ PC. Cependant, au vu des résultats présentés dans la figure 2.23 il est compliqué de conclure sur l'intérêt d'utiliser un μ PC pour injecter moins d'eau dans le système de chromatographie.

Les différentes connexions utilisées pour relier le μ PC à la colonne pourraient expliquer le bruit de fond plus élevé de l'eau. En effet, nous observons également un signal plus élevé pour les masses 28 et 32. Cela signifie que le μ PC est moins étanche à l'environnement extérieur que le TD. L'eau observée proviendrait alors de l'environnement. Une modification des connectiques utilisées pourrait réduire le bruit de fond.

2.5 Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre nous avons montré que les μ PC pouvaient s'intégrer dans un système portable, fonctionnant sur batterie. Dans le cas d'un couplage entre le μ PC et la GC-MS, l'architecture de l'injecteur est simplifiée. Une connexion directe du μ PC entre la source d'hélium et la colonne de chromatographie permet d'obtenir une désorption efficace des composés piégés et une analyse efficace matérialisée par des pics fins. Si jamais les μ PC étaient utilisés avec un instrument de GC-MS, la conception d'un passeur d'échantillon serait nécessaire puisque le montage à la main des μ PC dans le four de GC s'avère tout de même fastidieux.

Le système Primosamp permet d'injecter de manière répétable des mélanges simples de BTEX avec un même μ PC et avec plusieurs μ PC. Nous avons comparé les performances du μ PC à celle d'un TD de laboratoire. Pour des mélanges simples de BTEX, la variabilité est plus faible avec le TD, mais reste très acceptable avec le μ PC. De plus, des pistes d'améliorations existent : changement de pompe, contrôle électronique du temps de prélèvement. Le μ PC présente cependant un net avantage sur le TD en permettant de réduire le volume d'échantillon nécessaire pour obtenir des résultats identiques.

Nous avons aussi montré que des mélanges plus complexes tels que l'air expiré pouvaient être analysés avec les μ PC. La variabilité observée au cours d'une journée est du même ordre de grandeur avec l'air expiré qu'avec les BTEX. Pour l'analyse de l'air expiré, le μ PC permet toujours d'utiliser un volume plus faible d'échantillon par rapport au TD, en contrepartie d'une gamme de COV préconcentrables réduite. En effet, Le μ PC ne piège pas les molécules très volatiles à cause de la très faible quantité d'adsorbant utilisée dans la puce.

Une partie du quatrième chapitre sera consacrée à l'utilisation du μ PC pour la détection et le suivi de marqueurs du tabagisme dans l'air expiré. Une autre partie de ce chapitre présentera le travail effectué dans le cadre du stage de fin d'études de Morgan Cellier sur l'intégration du μ PC dans un échantillonneur dédié au prélèvement de l'air expiré.

3 Chromatographie intégralement bidimensionnelle pour l'analyse de l'air expiré

3.1 Introduction

L'air expiré constitue un échantillon complexe qui peut contenir jusqu'à plusieurs centaines de molécules. Les techniques de GC-MS ne semblent pas permettre la résolution complète de la composition de cet échantillon biologique. En effet, le nombre de COV retrouvés dans l'air expiré, autour de 800, se rapproche de la limite résolutive de la GC-MS. Une méthode plus résolutive pourrait donc présenter un intérêt pour l'analyse de l'air expiré. À partir de ce constat, nous avons réalisé un travail sur l'utilisation de la chromatographie intégralement bidimensionnelle, GC $\times$ GC, pour l'analyse de l'air expiré. En effet, la GC $\times$ GC permet d'augmenter l'espace de séparation disponible et constitue la méthode de référence pour les échantillons extrêmement complexes qui contiennent plusieurs milliers de molécules [51,271].

Le travail que nous avons effectué sur l'utilisation de la GC $\times$ GC pour l'analyse de l'air expiré dans le cadre de cette thèse a été effectué avec un certain nombre de contraintes. Le LETI développe des systèmes d'analyse portables, ce qui impose de simplifier au maximum les architectures. Nous avons donc voulu tester une architecture de GC $\times$ GC simple et facilement miniaturisable. Ceci nous a amené à utiliser un modulateur fluidique récemment décrit dans la littérature [272]. Nous aborderons trois sujets pour justifier le choix de cette approche et pour introduire la partie expérimentale : l'intérêt de la GC $\times$ GC, l'utilisation de la GC $\times$ GC pour l'analyse de l'air expiré et les différentes architectures de modulation existantes. Ces trois sujets seront abordés grâce à une étude de la littérature.

Nous expliquerons tout d'abord comment la GC $\times$ GC permet d'avoir accès à un espace de séparation augmenté. En effet, cela est possible grâce au processus de modulation au cœur de la GC $\times$ GC, processus qui sera décrit brièvement pour mieux comprendre le fonctionnement de la GC $\times$ GC. Les autres avantages liés à celle-ci, comme les meilleures limites de détection et la structuration des chromatogrammes, seront ensuite présentés.

Une étude de la bibliographie résumera les différents résultats publiés sur l'utilisation de la GC $\times$ GC pour l'analyse de l'air expiré. Malgré ses avantages, cette technique d'analyse reste

peu utilisée pour l'analyse de l'air expiré. Cependant, le nombre de résultats publiés en GC $\times$ GC pour l'analyse de l'air expiré augmente depuis l'année 2018.

Une description du fonctionnement des différents types de modulateurs justifiera le choix d'un modulateur fluide basé sur une architecture simple, nécessitant peu de matériel et peu de puissance électrique, sans consommable supplémentaire et compatible avec des systèmes de GC-MS standard. Cette architecture, décrite dans la littérature en 2016, n'a encore jamais été utilisée pour l'analyse de l'air expiré.

À la suite de l'étude de la littérature, nous présenterons les résultats obtenus pendant cette thèse. Nous détaillerons la fabrication du modulateur ainsi que les premières données obtenues. Les tests effectués avec des mélanges simples injectés par voie liquide puis avec des mélanges simples injectés par TD seront présentés. Nous utiliserons ensuite ce système de GC $\times$ GC-MS pour analyser un échantillon d'air expiré. Les résultats seront comparés avec ceux obtenus pour le même échantillon par GC-MS. Cette comparaison montrera l'intérêt de ce type de modulation pour l'analyse de l'air expiré avec un système simple à fabriquer et à contrôler, compatible avec la très grande majorité des systèmes de GC standard et les MS quadripolaires avec des fréquences d'acquisition standard.

Pour finir, nous montrerons les résultats obtenus lors d'une étude de la robustesse du modulateur afin de mieux comprendre les paramètres importants qui influencent son fonctionnement. Ces paramètres restent, pour le moment, mal appréhendés. Mohamed Bensifia a effectué ce travail dans le cadre de son stage de master 2. Cette étude de robustesse montrera que la plage de variation des paramètres qui permet une bonne modulation est extrêmement réduite.

3.2 Bibliographie

3.2.1 Chromatographie intégralement bidimensionnelle

3.2.1.1 *Pourquoi la GC × GC*

D'après Witier dans l'un des ouvrages de référence sur la chromatographie en phase gazeuse [218], séparer 100 composés avec une probabilité de recouvrement entre les pics inférieure à 5 % nécessite une colonne qui posséderait environ onze-millions de plateaux. Les détails concernant ce calcul sont disponibles directement dans le document. Comme une colonne de 0,25 mm de diamètre interne possède une efficacité d'environ 4750 plateaux par mètre, la possibilité de cette séparation dans un système de GC monodimensionnelle semble très limitée. Réduire le diamètre interne des colonnes permet de gagner en efficacité mais nécessite un appareillage adapté et le gain reste limité. Ainsi, une colonne de 0,10 mm de diamètre interne possède une efficacité d'environ 12500 plateaux par mètre. La séparation de 100 composés mentionnée ci-dessus nécessiterait donc des colonnes d'un kilomètre ! L'utilisation d'un spectromètre de masse permet d'augmenter la capacité de pics, définie comme le nombre maximal de composés que le système analytique peut séparer. Cependant, pour des échantillons très complexes comme l'air expiré, des méthodes séparatives encore plus résolutes présentent un intérêt évident.

Une manière d'augmenter drastiquement l'espace de séparation consiste à utiliser des techniques de GC × GC. Cette méthode, grâce à un modulateur, couple deux colonnes de chromatographie avec des phases stationnaires qui possèdent des chimies différentes et conduisent à des séparations différentes. Un schéma d'un système de GC × GC est montré dans la figure 3.1.

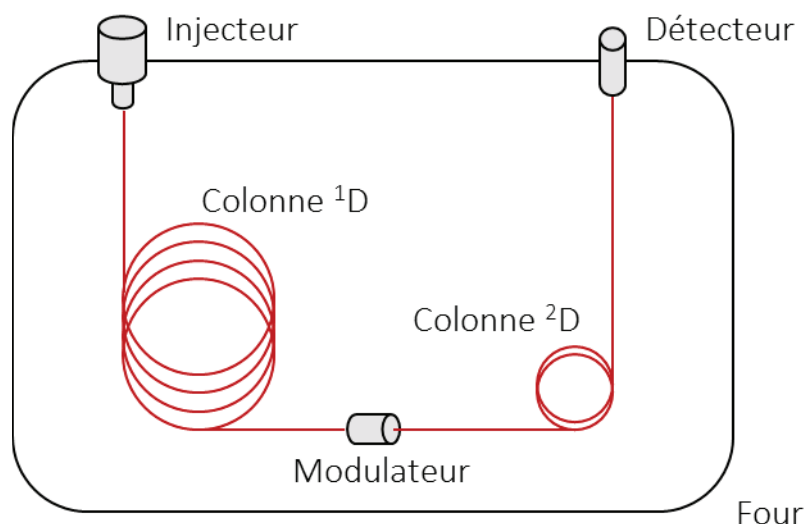


Figure 3.1. Schéma d'un système de GC $\times$ GC d'après [51], une colonne 1D est reliée à une colonne 2D par un système de modulation.

Le modulateur constitue le cœur du système de GC $\times$ GC. Le processus de modulation permet en première approximation d'obtenir une capacité de pics égale au produit de la capacité de pics de la première colonne par la capacité de pics de la deuxième colonne [51]. Dans le cas d'une séparation par GC 1D, la capacité de pics est proportionnelle à la racine carrée de la longueur de la colonne. La multiplier par deux ne permet de multiplier la capacité de pics que par un facteur 1,41. Ceci démontre tout l'intérêt de la GC $\times$ GC pour l'analyse de mélanges très complexes.

3.2.1.2 Principe de fonctionnement de la GC $\times$ GC

La première description d'une séparation par GC $\times$ GC a eu lieu en 1991 [273]. Le chromatogramme obtenu est présenté dans la figure 3.2.

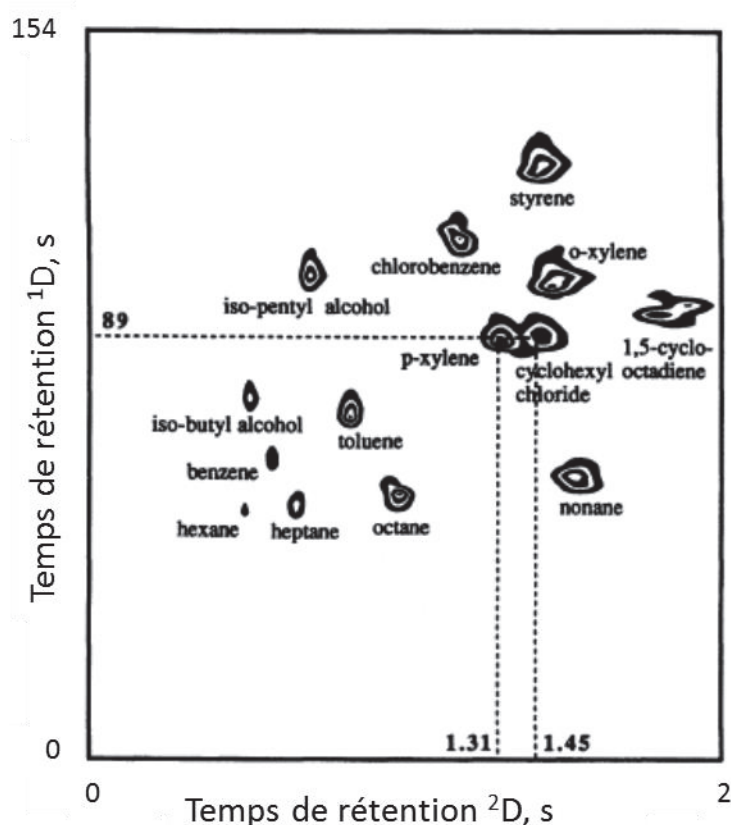


Figure 3.2. Premier chromatogramme obtenu en GC $\times$ GC décrit dans la littérature, d'après [273]

Le système et les résultats décrits dans cette publication [273] présentent déjà toutes les caractéristiques et les avantages de la GC $\times$ GC. Tout l'échantillon subit la séparation dans la première dimension, 1D , et dans la deuxième dimension, 2D . C'est la définition de la GC $\times$ GC. La séparation dans la 2D a lieu séquentiellement et de manière répétée pendant que la séparation a également lieu dans la 1D . Le modulateur permet un fractionnement systématique entre la 1D et la 2D . Pour cela, il piège la fraction éluée de la 1D . Une fois la période de piégeage terminée, la fraction stockée dans le modulateur est isolée des fractions suivantes éluées de la 1D et injectée dans la 2D . Le modulateur piège à nouveau l'effluent suivant. Le temps qu'il met pour stocker, isoler et réinjecter chaque fraction éluée correspond à la période de modulation.

Pour permettre cette séparation séquentielle, la séparation en 2D est très rapide par rapport au temps de séparation en 1D , comme montré dans la figure 3.2, et correspond à la période de modulation. Cela explique les dimensions des colonnes dans les systèmes de GC $\times$ GC. La colonne de 1D est souvent longue, 15 à 30 m, et la colonne 2D courte, de 1 à 5 m. Les dimensions exactes dépendent du système de modulation utilisé.

Le signal obtenu est un chromatogramme 1D modulé qui est converti en chromatogramme 2D. Pour cela, il est découpé en périodes de temps qui correspondent à la période de modulation. La figure 3.3 illustre le processus de reconstruction de chromatogramme 2D à partir du signal 1D. C'est cette transformation du chromatogramme qui permet d'obtenir des chromatogrammes 2D, aussi appelés contour plot, comme celui présenté dans la figure 3.2.

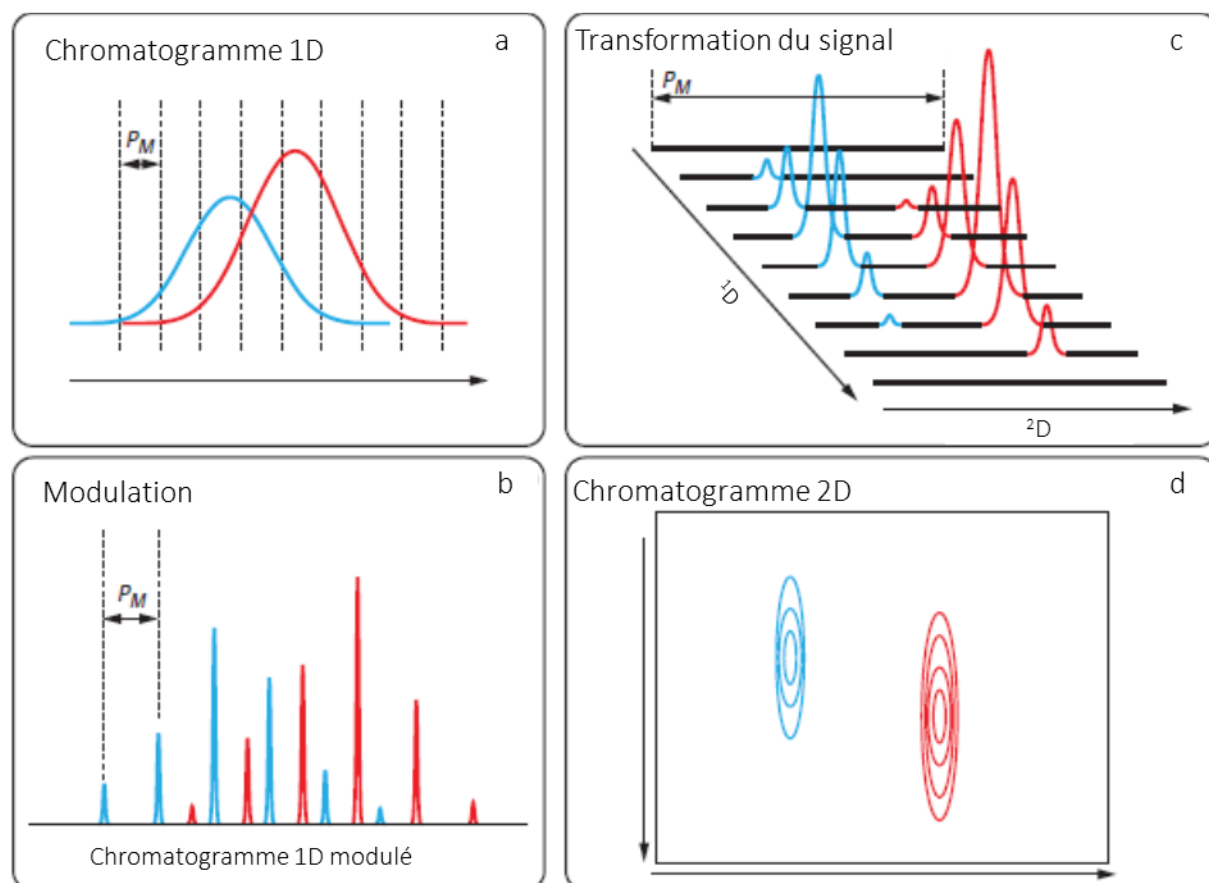


Figure 3.3. Illustration de la modulation et principe de transformation du chromatogramme 1D en chromatogramme 2D. (a) chromatogramme 1D avant modulation, (b) chromatogramme 1D modulé, (c) et (d) chromatogramme 2D après reconstruction, d'après [51]

En plus de donner accès à un espace de séparation plus grand, la modulation présente d'autres avantages. Le processus de modulation permet une refocalisation des pics entre la 1D et la 2D . La figure 3.4 illustre ce processus décrit en détail ailleurs dans la littérature [51]. Ainsi, la GC $\times$ GC permet également d'améliorer les limites de détections par rapport à la GC 1D.

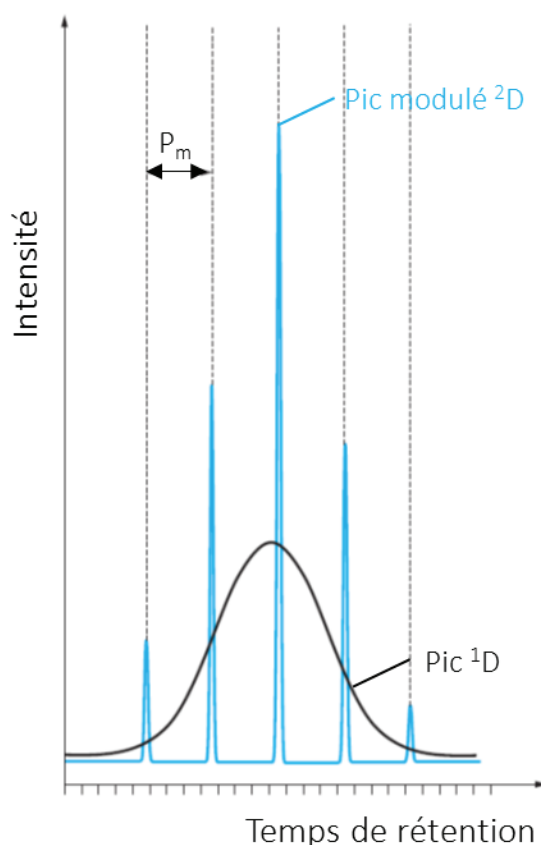


Figure 3.4. Effet de la modulation sur le pic, pic ^{1D} en noir, pic modulé ^{2D} en bleu. L'effet de la modulation sur l'intensité du pic n'est pas à l'échelle et peut être beaucoup plus important en fonction du type de modulateur et du jeu de colonnes utilisé, d'après [51]

La structuration observée sur les chromatogrammes constitue le dernier avantage de la GC × GC. La figure 3.5 illustre ce propos. Le chromatogramme obtenu lors de l'analyse d'une coupe de pétrole montre bien que certaines classes d'hydrocarbures, alcanes linéaires, mono aromatiques, di aromatiques, etc. sont regroupées sur certaines zones du chromatogramme et, à l'intérieur des classes, par nombre d'atomes de carbone. Cette organisation des chromatogrammes peut aider à l'attribution des structures des COV observés.

Ainsi, la GC × GC permet d'accéder à un espace de séparation inaccessible en GC 1D, d'obtenir de meilleures limites de détections et d'observer des chromatogrammes organisés. Ces trois avantages en font un outil extrêmement puissant pour l'analyse d'échantillons très complexes, contenant de nombreuses molécules.

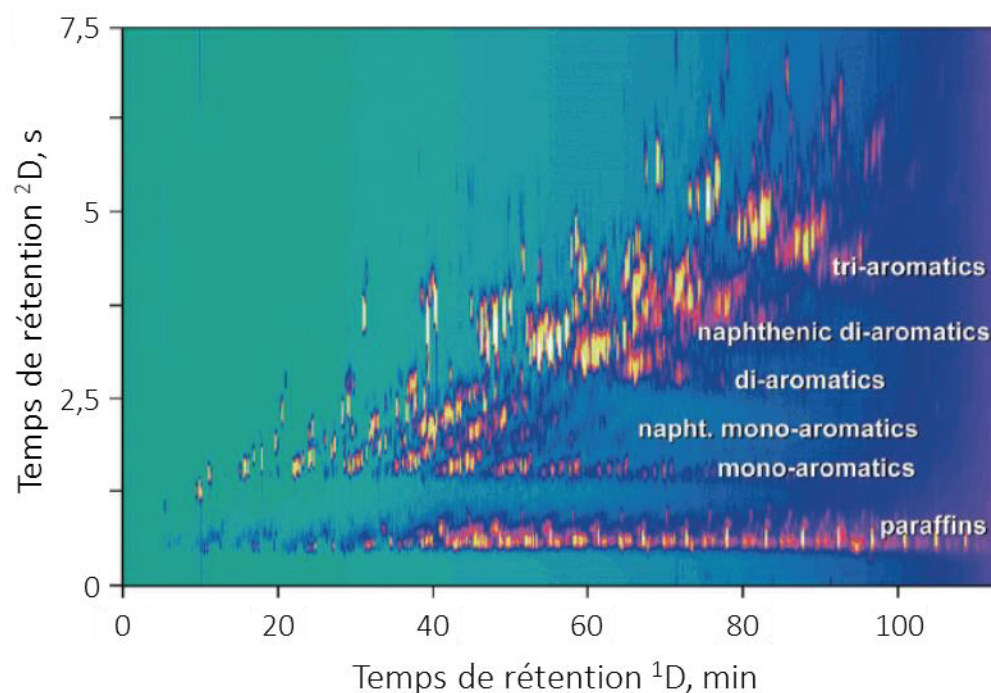


Figure 3.5. Illustration de la structuration des chromatogrammes 2D par l'analyse d'une coupe pétrolière, d'après [274]

Le milieu pétrolier a largement tiré profit des différents avantages de la GC $\times$ GC [266]. En effet, les produits dérivés des pétroles sont extrêmement complexes : plus de 4000 isomères existent pour un alcane saturé composé de quinze carbones. Depuis les premiers résultats en 1991, d'autres domaines d'applications où une plus grande résolution est nécessaire ont également utilisé la GC $\times$ GC : analyse d'huiles essentielles [276], pollutions environnementales [277], produits alimentaires [278] etc.

3.2.2 GC $\times$ GC pour l'analyse de l'air expiré

Malgré le grand intérêt que pourrait présenter la GC $\times$ GC pour l'analyse de l'air expiré, seulement une vingtaine de publications existe dans la littérature. Les différents exemples connus d'utilisation de la GC $\times$ GC pour l'analyse de l'air expiré sont résumés dans le tableau 3.1.

Depuis 2014 [279], le groupe de Jef Focant à l'université de Liège a également présenté beaucoup de résultats en congrès [280–285], mais, à notre connaissance, peu de ces résultats ont été publiés dans des revues. Ces travaux ne sont donc pas présentés dans le tableau 3.1. car les informations disponibles dans les résumés nous semblent insuffisantes.

D'autres études utilisent la GC × GC pour l'analyse des COV émis par des cellules cancéreuses [286] ou différents microorganismes [88]. Ces travaux n'analysent pas directement l'air expiré, mais participent aux mêmes thématiques de recherches. Ils reposent sur l'hypothèse que des COV spécifiques émis par ces cellules ou ces microorganismes peuvent être détectés dans l'air expiré. Ce type de travaux n'a pas été analysé en détail, mais l'utilisation de la GC × GC semble également peu développée. En raison de leur approche un peu différente, ils ne sont pas présentés dans le tableau 3.1.

La suite de cette partie commente les différentes informations résumées dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1. Résumé des publications utilisant la GC × GC pour l'analyse de l'air expiré

Date	Applications	Modulateur	Colonnes	Détecteur	Nombre d'échantillons	Molécules détectées	Remarques	Ref
2002	Analyse de l'air expiré	Fluidique à vanne six voies	¹ D : DB-624 ² D : WAX ou DB-210	FID	1	100	Juste une preuve de concept	[52]
2006	Marqueurs du tabac	Quatre jets à azote liquide	¹ D : DB-1 ² D : RTX-WAX	TOF	14	100	Recherches de quelques marqueurs de tabagisme, mais peu d'échantillons	[53]
2006	Influence tabac et chewing-gum sur l'air expiré	Refroidi à l'air et chauffé résistivement	¹ D : RTX-1 ² D : RTX-WAX	FID	5	212		[54]
2010	Air expiré chez des personnes subissant une opération cardiaque	ZOEX KT 2001	¹ D : BPX-5ms ² D : PEG-WAX	TOF	?	180		[55]
2012	Comparaison asthmatique population saine	ZOEX	¹ D : HP-5ms ² D : DB-FFAP	TOF	42 asthmatiques 27 personnes saines	350	Alcanes proposés comme marqueurs	[11]
2013	Malades sous radiothérapie	Zoex 2 jets	¹ D : « relatively non polar » ² D : « more polar »	TOF	?	1000	Dispositif expérimental non décrit	[40]
2013	« Intérêt » de la 2D pour l'air expiré	2 zones LECO	¹ D : Rtx-5 ² D : Rxi-17	TOF	34	2000	2000 molécules semble élevées Comparaison avec GC simple	[56]
2014	Différenciation homme/femme par la composition de l'air expiré	Cryogénique, mais on ne sait pas lequel	¹ D : Rtx-1 ² D : Rtx-wax	TOF	23 hommes 24 femmes	1379	Beaucoup de variables par rapport au nombre d'individus	[57]
2014	Cancer du poumon	Modulateur fluidique agile	¹ D : DB-5ms ² D : HP-Wax	FID	13 malades 25 personnes saines	?	Pas d'influence du genre sur COV dans l'air expiré,	[58]

							propanol proposé comme marqueur	
2015	Analyse des alcanes méthylés	CO ₂ 2 zones	¹ D : OV1 ² D : FFAP	FID	1	?	1 seul échantillon analysé	[59]
2015	Air expiré de cochon irradié	Leco cryogenique 2 zones	¹ D : Apolaire ² D : Polaire	TOF	64 cochons, 1 analyse avant et 6 analyses après irradiations	?	Dispositif expérimental non décrit. Irradiation intense Pas de discussion sur la structure des COV marqueurs	[41]
2016	Composition de l'air expiré pendant une hyperglycémie provoquée per os	ZX1 azote liquide	¹ D : BPX ² D : RTX 210 ¹ D : FFAP ² D : 1701	TOF	3 personnes, environ 20 prélèvements au cours du temps pendant le test pour chaque personne, pas très clair	?	Analyse en parallèle avec un PTR-MS	[211]
2016	Intérêt du détecteur UV pour la GC × GC pour l'air expiré, exemple sur une hyperglycémie provoquée per os	ZX1 azote liquide	¹ D : FFAP ² D : 1701	VUV	4, 1 avant le test ; 3 pendant	?	Le VU apporte une spécificité intermédiaire entre le FID et la MS	[212]
2017	Tuberculose chez le macaque	4 D Pegasus, modèle de modulateur non précisé	¹ D : Rxi 624 ² D : Stabilwax	TOF	5 macaques, prélèvement avant et après inoculation de la tuberculose	724	37 marqueurs proposés	[287]
2017	Stress oxydatif chez des nageurs asthmatiques	ZOEX	¹ D : HP-5 ² D : DB-FFAP	TOF	20 personnes, 1 prélèvement avant et 1 prélèvement après l'entraînement	?	Marqueurs du stress oxydatif diminuent après une séance d'entraînement	[137]
2018	Effet de la sous-nutrition pendant la grossesse sur la composition de l'air expiré de babouins	4 D Pegasus, modèle de modulateur non précisé	¹ D : 5ms ² D : 17ms	TOF	13	1059	76 marqueurs proposés. Possible séparation selon le sexe et le poids de naissance	[72]
2018	Tuberculose chez l'humain	4 D Pegasus, modèle de	¹ D : Rxi 624 ² D : Stabilwax	TOF	14 malades, 20 personnes saines	1513 après	22 molécules proposées comme marqueurs	[288]

		modulateur non précisé				réduction		
2018	Tuberculose chez la souris	4 D Pegasus, modèle de modulateur non précisé	¹ D : Rxi 624 ² D : Stabilwax	TOF	8 souris malades 8 souris saines	1300 après réduction	23 molécules proposées comme marqueurs	[89]
2018	Tuberculose chez le macaque	4 D Pegasus, modèle de modulateur non précisé	¹ D : Rxi 624 ² D : Stabilwax	TOF	9 macaques, prélèvement avant et après infection	400 après réduction	14 marqueurs proposés, comparaison avec les cultures des cellules, 3 marqueurs en communs	[88]

À notre connaissance, la première analyse d'air expiré par GC × GC date de 2002 [52]. L'analyse reste cependant simple, seul quelques COV sont identifiés dans un seul échantillon. Il faut attendre 2006 [53] pour voir de nouveaux travaux simples sur les marqueurs du tabagisme et 2012 [11] pour voir des exemples plus poussés que des preuves de concept concernant l'analyse de l'air expiré par GC × GC.

Au début de cette thèse, en 2015, l'analyse de l'air expiré par GC × GC avait fait l'objet de seulement 11 publications dans des journaux. Depuis 2013, deux articles sont publiés par an. L'année 2018 a déjà vu quatre articles être publiés et plusieurs travaux étaient présentés sur l'utilisation de la GC × GC pour l'analyse de l'air expiré aux congrès à Riva del Garda 2018 [289] et au *Breath Summit 2018* [290]. Ces travaux proviennent, pour le moment, majoritairement de deux groupes de recherche, celui du Professeur Focant et celui de la Professeure Hill. Cette augmentation du nombre de publications et de présentations laisse penser que cette technique se diffuse pour l'analyse de l'air expiré. Les différentes études qui utilisent des méthodes plus simples comme la GC 1D n'ont pas permis de trouver des marqueurs univoques. La communauté se tourne maintenant vers des méthodes plus complexes à mettre en œuvre, mais également plus puissantes pour étudier leur intérêt pour l'analyse de l'air expiré.

Même si les performances supérieures de la GC × GC sur la GC 1D pour l'analyse de l'air expiré semblent évidentes, peu de comparaisons entre la GC × GC et la GC pour l'analyse de l'air expiré ont été effectuées pour les démontrer. Un exemple publié dans la littérature de comparaison des chromatogrammes 1D et 2D obtenus pour un même échantillon est montré dans la figure 3.6.

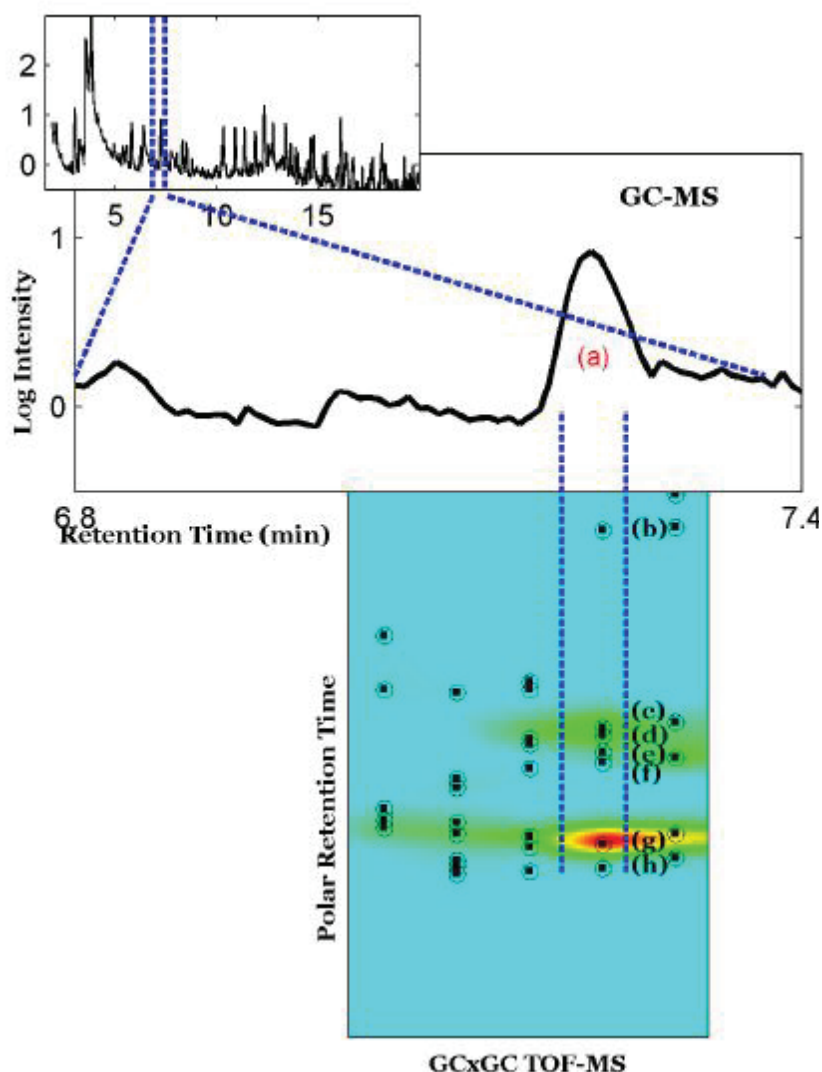


Figure 3.6. Comparaison d'un pic (a) contenu dans un échantillon d'air expiré en GC 1D et en GC $\times$ GC. Le Chromatogramme 2D montre bien que sous le pic 1D le plus intense, a, se trouvent d'autres pics, b c d e f, et que l'utilisation de la GC $\times$ GC permet de lever ces coélutions, d'après [56].

La comparaison des chromatogrammes 1D et 2D présentés dans la figure 3.6 montre bien que la GC $\times$ GC permet d'observer des composés coélus en GC. En GC 1D un seul pic est observé. La GC $\times$ GC montre qu'il contient en réalité plusieurs composés, b c d e f h, moins intenses. La complexité de l'air expiré et les grandes différences de concentration entre les COV exhalés entraînent de nombreuses coélutions en GC simple. L'utilisation de la GC $\times$ GC permet de lever partiellement ces coélutions.

De manière générale, la GC $\times$ GC permet de détecter plus de molécules dans l'air expiré. Toutes les études publiées depuis 2013 proposent au moins 1000 COV pour l'analyse de l'air expiré d'une population. Ces chiffres sont plus élevés que ceux habituellement proposés par des études qui utilisent la GC 1D. De plus, les études qui incluent le plus grand nombre de

personnes semblent détecter le plus grand nombre de molécules. Cela confirme encore la variabilité entre les individus.

14 des 19 études publiées utilisent la spectrométrie de masse comme détecteur après la séparation. Comme pour la GC, la spectrométrie de masse est majoritairement utilisée parce que l'air expiré constitue un échantillon complexe et que l'identification des molécules est indispensable. Seuls des spectromètres de type TOF sont utilisés. En effet, la largeur des pics en 2D nécessite des fréquences d'acquisitions supérieures à 50 Hz afin d'obtenir un échantillonnage adéquat. Cinq études utilisent le FID qui est l'autre détecteur le plus utilisé en GC $\times$ GC. Cependant, ce détecteur ne permet pas d'identifier les composés. Un troisième type de détecteur a été utilisé, un détecteur VUV fonctionnant dans la gamme de longueurs d'onde comprise entre 420 et 100 nm. Ce détecteur possède une fréquence d'acquisition assez élevée pour la GC $\times$ GC et permet l'acquisition de spectres d'absorption ce qui lui confère une capacité d'identification intermédiaire entre le FID et le TOF. La structure de ce détecteur est plus simple que le TOF. Il pourrait présenter un intérêt lorsque les marqueurs dans l'air expiré ont été déterminés par détection avec un TOF, mais où un peu de spécificité s'avère nécessaire, ce qui est impossible avec un FID.

17 des 19 études utilisent des modulateurs basés sur la cryogénie. Seules deux études utilisent des modulateurs fluidiques. De manière générale, les modulateurs utilisant des différences de températures pour la refocalisation et l'injection de la bande de solutés dans la 2D constituent les modulateurs les plus répandus en GC $\times$ GC [291].

16 des 19 études utilisent une configuration de colonne avec la colonne la moins polaire en première dimension et la colonne la plus polaire en deuxième dimension, dite de type normal. Cela inclut tout de même des configurations différentes du type apolaire-polaire, apolaire-moyennement polaire et moyennement polaire-polaire. Comme la composition normale de l'air expiré reste mal connue, il semble compliqué de travailler sur une configuration de colonnes spécifiques ce qui explique l'utilisation de jeux de colonnes standards. Une étude sur l'optimisation de jeux de colonne pour les COV de la peau a également conclu qu'une configuration de type normal était la plus adaptée pour ce genre d'échantillon [292]. De plus, la configuration de type normal facilite la lecture des chromatogrammes observés car, en première approximation, la 1D sépare selon la température d'ébullition et la 2D en fonction de la polarité.

Le plus grand groupe étudié dans les études utilisant la GC $\times$ GC pour l'analyse de l'air expiré comporte 69 personnes. Au vu du nombre de COV détectables par GC $\times$ GC, cela est insuffisant. En effet, la GC $\times$ GC permet de détecter plus de molécules, ce qui oblige à augmenter la taille des groupes pour avoir de la force statistique. Plusieurs études proposent de supprimer les composés dont la concentration est identique à celle de l'air ambiant, les composés liés à la dégradation de la colonne ou de la phase stationnaire, les composés liés à la dégradation des adsorbants, etc. Même en utilisant ces méthodes de réduction de variables, il reste encore près d'un millier de molécules [88,89,287,288]. Cependant, le groupe de la Professeure Hill publie actuellement de multiples travaux avec le même dispositif expérimental [88,89,287,288]. Ainsi, même si le nombre d'individus reste limité, la comparaison des données devient possible. Pour l'instant, des données obtenues par GC $\times$ GC pour de grandes cohortes n'existent pas encore, contrairement aux travaux publiés sur l'analyse de l'air expiré de 1417 personnes par GC-MS [42]. Cependant, des travaux présentés au congrès *Breath Summit 2018* laissent penser que ce genre de résultats devrait arriver sous peu.

3.2.3 Les modulateurs en GC $\times$ GC

Le modulateur constitue le système central permettant la GC $\times$ GC. Différents types de modulateurs existent et nous décrirons leur fonctionnement ci-dessous. Différents paramètres, incluant les performances, le coût, la complexité de l'architecture et la compatibilité avec les systèmes GC, caractérisent un modulateur et justifient un choix d'architecture. Dans notre cas, nous voulons travailler avec un modulateur qui possède une architecture simple et miniaturisable, qui peut fonctionner sur du 12 V 2 A, qui fonctionne sans consommable supplémentaire à ceux d'une méthode de GC 1D et compatible avec notre spectromètre de masse.

Les performances d'un modulateur sont définies par sa capacité à piéger efficacement les COV élués de la 1D et à les réinjecter sous forme de bandes étroites dans la 2D . Un piégeage plus efficace augmente la refocalisation ce qui améliore les limites de détection. Par ailleurs, une réinjection ponctuelle dans la 2D améliore la capacité de pics de celle-ci ce qui augmente la capacité de pics globale de la séparation.

Le matériel nécessaire et l'architecture utilisée pour effectuer la modulation constituent un autre aspect important. Cela va du très simple, deux tés, une boucle d'échantillonnage et une

vanne, à beaucoup plus complexe, des fluides cryogéniques et des jets d'air chaud pulsé. Cela influence le coût et la facilité d'utilisation et d'intégration des modulateurs.

Comme nous le verrons, tous les modulateurs ne transfèrent pas l'intégralité de l'effluent de la 1D vers la 2D . Certaines architectures de modulateurs entraînent des pertes d'échantillon entre la 1D et 2D , pertes plus ou moins problématiques selon le type d'application. Le *duty cycle*, dont la valeur varie entre 0 et 1, représente cette perte d'échantillon. Pour un *duty cycle* de 1, l'intégralité de l'effluent de la 1D est injectée dans la 2D , lorsqu'il vaut 0,9, 10 % de l'échantillon est perdu, etc.

Enfin, un dernier point important dans le choix du système de modulation réside dans la compatibilité avec les détecteurs. L'identification des COV détectés dans l'air expiré nécessite l'utilisation de la spectrométrie de masse mais celle-ci supporte rarement des débits supérieurs à 4 ml/min dans des configurations standards. Ce paramètre est important car certains modulateurs nécessitent des débits autour de 20 ml/min dans la 2D .

Différentes catégories de modulateurs sont proposées dans la littérature en fonction des processus mis en jeu. Selon Tranchida [293], les modulateurs se divisent en trois familles en fonction du paramètre contrôlé : température, phase stationnaire, débit. Bahaghighat et coll. [294], divisent les processus de modulation en deux catégories et considèrent la modulation basée sur la phase stationnaire comme une sous-catégorie de la modulation basée sur la température. Nous retiendrons cette dernière classification.

3.2.3.1 Les modulateurs cryogéniques

Aujourd'hui, la majorité des systèmes de GC $\times$ GC utilisent des modulateurs basés sur une refocalisation et une réinjection des solutés par un contrôle de la température [291]. Le phénomène sera brièvement expliqué; pour plus de détails, différentes revues existent [51,291,293,294].

Un abaissement de la température à l'entrée de la 2D permet le piégeage des COV en sortie de 1D . Ce refroidissement peut s'effectuer grâce à des dispositifs de types Pelletier, des fluides cryogéniques comme le CO_2 ou le N_2 liquide, ou en plaçant la sortie de la colonne de 1D en dehors du four [273]. Des chauffages résistifs ou des jets d'air chaud pulsés permettent la réinjection des COV dans la 2D après le piégeage. La modulation s'effectue en alternant des

périodes de refroidissements et de chauffés. Différentes architectures existent et la figure 3.7 présente les deux les plus utilisées [293,294].

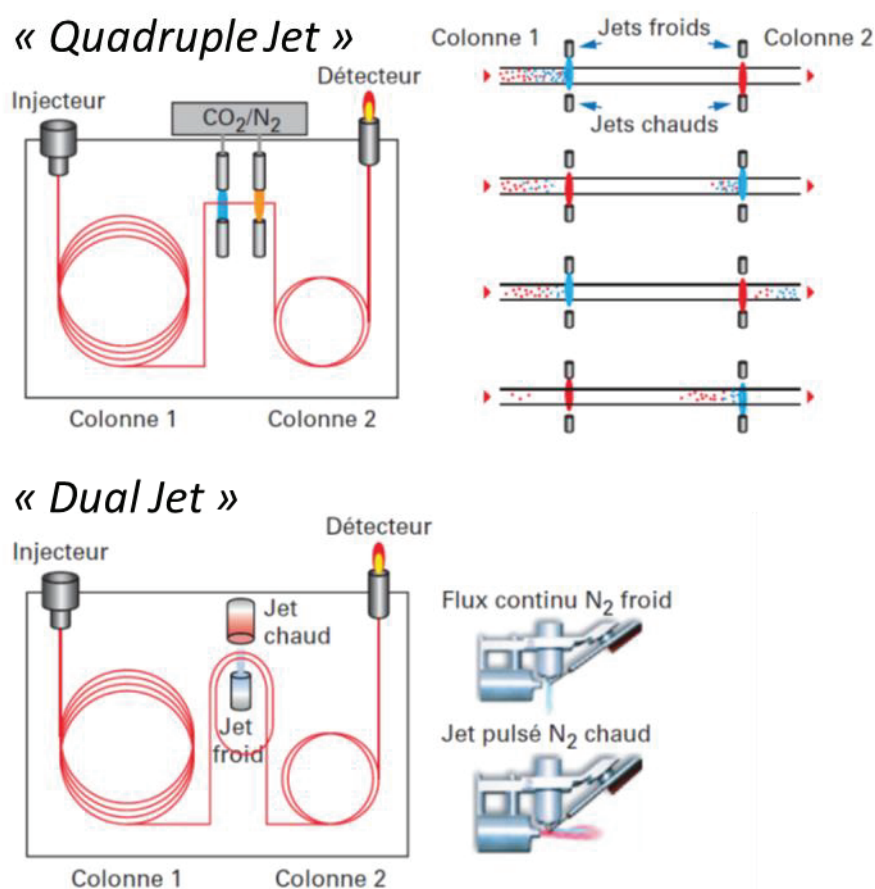


Figure 3.7. Architectures des deux modulateurs cryogéniques les plus utilisés, d'après [51]

Avec ce genre de système, une température minimale est nécessaire au piégeage de chaque composé en fonction de leur volatilité. Ainsi, la gamme de composés modulables dépend du système de refroidissement utilisé. Les modulateurs au N₂ permettent de moduler à partir de C₃ et les modulateurs à bases de CO₂ et de modules Pelletier permettent de moduler à partir de C₆.

La connexion directe entre la première et de la deuxième colonne donne lieu à un transfert intégral de la ¹D vers la ²D et le *duty cycle* vaut alors 1.

Ce type de modulateur figure parmi les plus efficaces pour refocaliser les COV et injecter des bandes étroites de composés dans la ²D. Ainsi, l'espace de séparation disponible en ²D est parmi le plus élevé de tous les modulateurs. Pour fonctionner, ces modulateurs nécessitent cependant de grandes quantités de consommable sous la forme de fluide cryogénique. Ils peuvent être remplacés par des dispositifs de types Pelletier, mais cela limite la gamme de

composés modulables car la température de piégeage est plus élevée [293,294] et de l'azote est toujours nécessaire.

Avec ces architectures de modulateurs, les débits sont directement compatibles avec la spectrométrie de masse [294] et la largeur des pics générés en ^2D nécessite des détecteurs avec des fréquences d'acquisition élevées, au minimum de 50 Hz.

Malgré la complexité des dispositifs, le matériel nécessaire et l'obligation de disposer d'un MS spécifique, la modulation cryogénique reste la plus utilisée [293,294].

3.2.3.2 Modulateurs fluidiques

Le fonctionnement des modulateurs à flux est fondé sur un contrôle des flux entre les deux dimensions de séparation. Le principal avantage des modulateurs fluidiques réside dans le matériel nécessaire pour leur fabrication. En effet, il s'agit le plus souvent d'une ou deux vannes et de quelques tubulures et connecteurs et l'utilisation de fluides cryogéniques est également inutile.

La première description d'un modulateur fluidique date de 1998 [295]. Le schéma de fonctionnement est montré dans la figure 3.8.

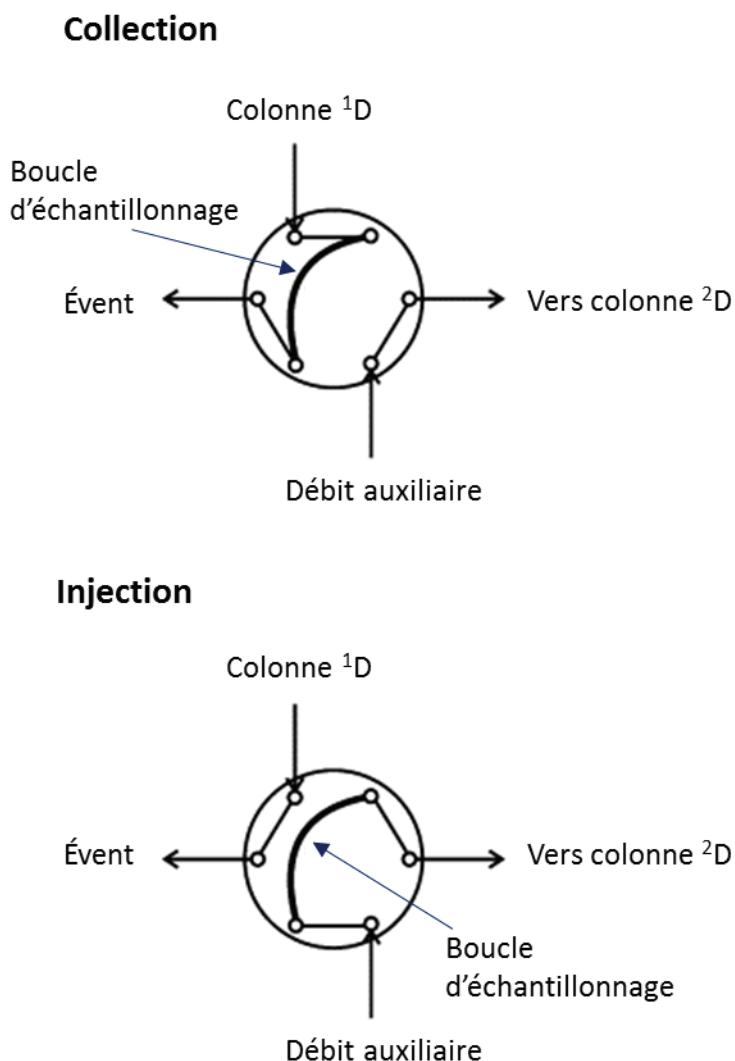


Figure 3.8. Premier système de modulation fluide décrit dans la littérature, basé sur une vanne six voies et une boucle d'échantillonnage. En position de collection l'effluent de la 1D est collecté dans la boucle d'échantillonnage. Pour l'injection en 2D , la position de la vanne est basculée

Les fractions éluées de la 1D sont échantillonnées dans la boucle d'échantillonnage pendant la collection, puis injectées dans la 2D par commutation rapide de la vanne six voies. Ce système présente deux défauts. Tout d'abord, le taux d'échantillonnage de la 1D est faible. En effet, une grande partie des composés élués de la 1D est envoyé vers l'évent car la boucle d'échantillonnage ne stocke pas tout. Pendant l'injection de la fraction dans la 2D , une partie de l'échantillon est également perdu car envoyé vers l'évent. Pour vider rapidement la boucle d'échantillonnage et générer des injections ponctuelles dans la 2D , un débit élevé est indispensable. Cela constitue le deuxième défaut car ces débits n'autorisent pas un couplage direct avec la spectrométrie de masse. Depuis cette première publication, ces travaux ont été repris pour augmenter le *duty cycle* et réduire le débit dans la 2D [296,297].

Un autre type de modulateur fluide, basé sur une architecture de type Dean's Switch, est présenté dans la figure 3.9.

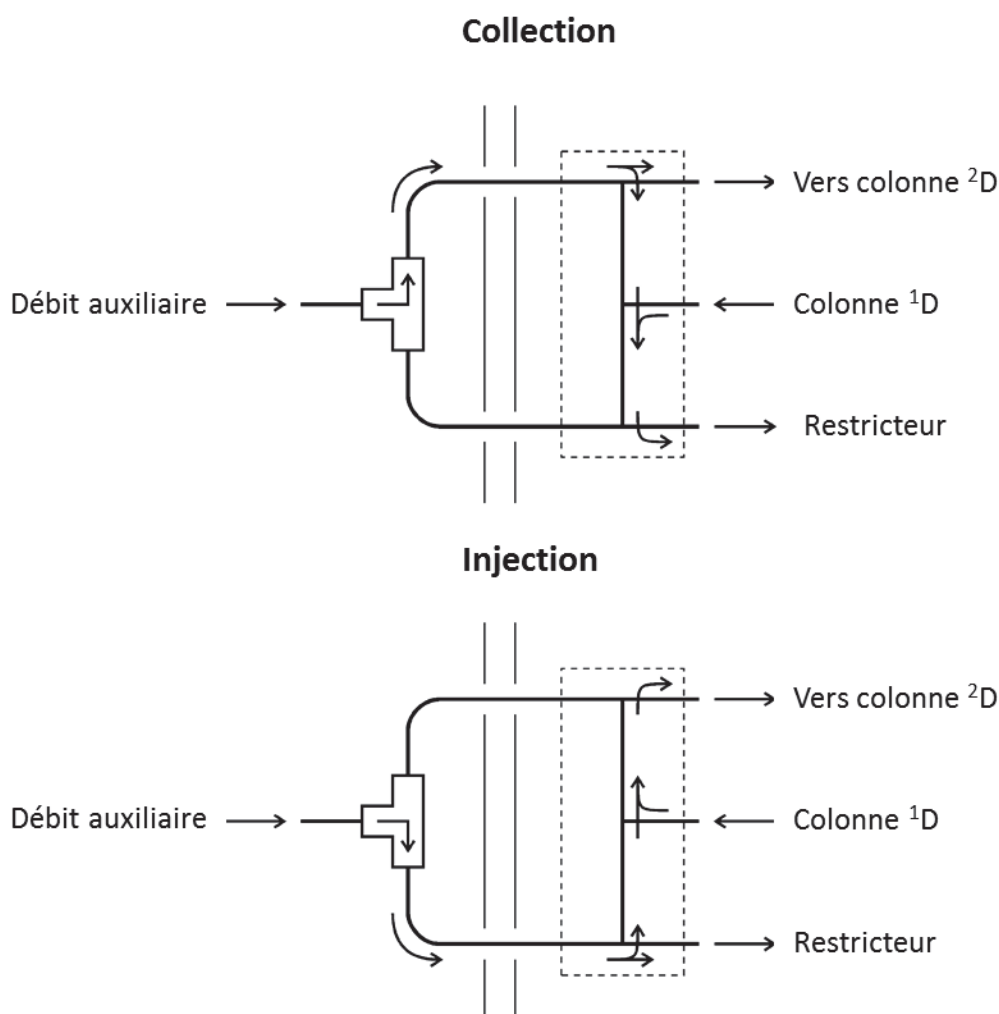


Figure 3.9. Modulateur basé sur un Dean's switch, d'après [298]

Ce modulateur permet de supprimer les vannes à l'intérieur du four. Cela est bénéfique car la température maximale possible pour les vannes se situe actuellement autour de 250 °C. Ce système permet donc de travailler à plus haute température. De plus, il n'y a plus de contacts entre les composés et les matériaux à l'intérieur de la vanne, ce qui supprime les risques d'adsorption. Les fractions de la ¹D sont échantillonnées dans des tubulures qui relient la ¹D et la ²D. L'injection a lieu lors du basculement de la vanne trois voies à l'extérieur du four.

Le restricteur permet de jouer sur la perte de charge du système et de modifier le débit de la ²D ou de la ¹D ou encore de la boucle d'échantillonnage. Cela permet d'adapter les conditions en fonction du détecteur ou des points importants.

Des résultats dans la littérature montrent que ce genre d'architecture peu présenter des performances supérieures à la modulation cryogénique lors d'une détection par FID [299]. Cependant, cette architecture ne permet pas d'obtenir à la fois un *duty cycle* de 1 et des débits compatibles avec la MS puisque, dans cette configuration, ils valent alors une vingtaine de millilitres par minute dans la ²D.

Une évolution de l'architecture de modulateur présenté dans la figure 3.9 est présentée dans la figure 3.10.

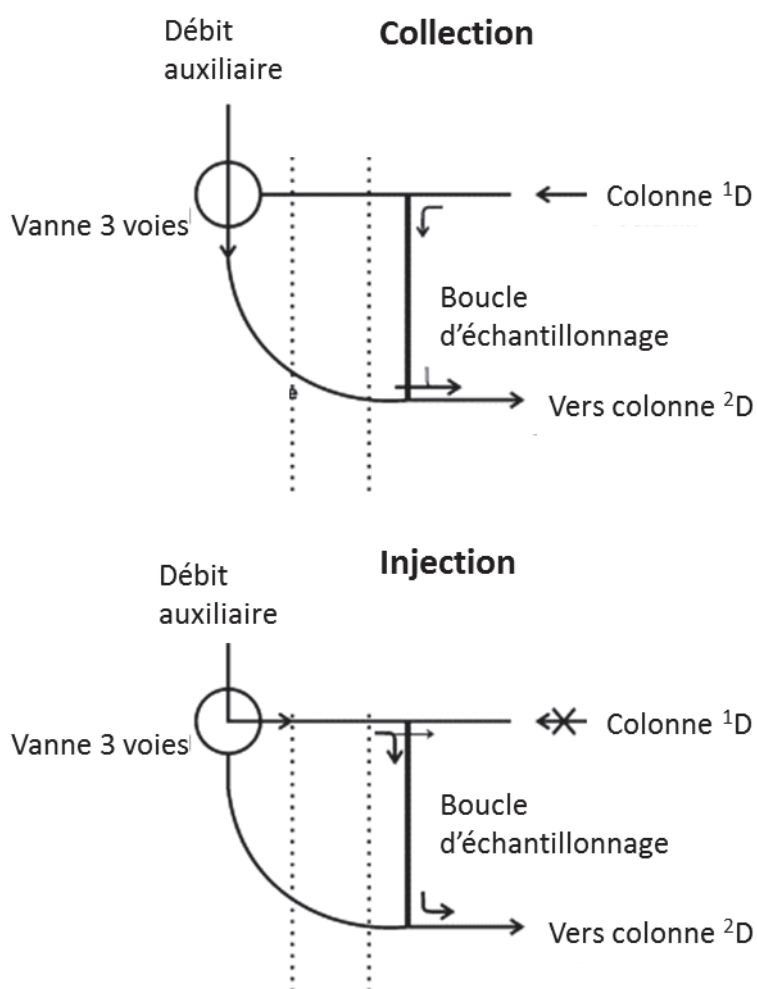


Figure 3.10. Évolution de l'architecture de modulateur fluide

Ce modulateur supprime le restricteur, ce qui permet d'obtenir un *duty cycle* de 1 et de simplifier l'architecture. Cependant, un débit élevé en ²D est toujours nécessaire pour vider rapidement la boucle d'échantillonnage. Puisque le restricteur est supprimé, cela complique l'optimisation du procédé. En effet, comme nous l'avons expliqué précédemment, le restricteur peut être utilisé pour adapter le débit dans la ¹D, la ²D ou la boucle d'échantillonnage.

En général, ces modulateurs ne permettent pas d'obtenir des débits en ^2D compatibles avec la spectrométrie de masse. Il est possible d'envoyer une partie du flux ^2D vers un événement ou FID [300] mais, dans ce cas, la détection ou l'identification de COV peu concentrés peut être plus compliquée. Malgré les problèmes que nous venons d'évoquer, des travaux récents réalisés sur l'architecture présentée dans la figure 3.10 ont permis de diminuer les débits utilisés dans la ^2D [301–303].

3.2.3.3 *Choix d'une architecture de modulateur*

Les travaux effectués au sein du laboratoire, au cours de ce projet, se focalisent sur le développement de systèmes portables bas coût alimenté par batterie, nécessitant le moins de consommables possible et possédant des architectures simples. Pour ces raisons, nous avons écarté les modulateurs cryogéniques et les modulateurs fluidiques à vannes multivoies et nous avons décidé de travailler sur des modulateurs à flux. En effet, ces systèmes de modulation sont simples, facilement miniaturisables sur silicium et ne nécessitent pas de consommables supplémentaires. En raison de la faible concentration des COV dans l'air expiré, les modulateurs avec des *duty cycle* inférieurs à 1 n'ont pas été retenus. Comme montré dans la partie 3.2.2, page 118, les modulateurs fluidiques ont peu été utilisés pour l'analyse de l'air expiré. Il semblait donc intéressant d'étudier leur intérêt pour l'analyse de l'air expiré. Finalement, comme première approche, il serait préférable de pouvoir utiliser le modulateur avec le système de GC-MS standard disponible au laboratoire, un simple quadripôle possédant une fréquence d'acquisition maximale de 20 Hz.

C'est pour les raisons qui viennent d'être évoquées que nous avons choisi un modulateur basé sur l'architecture présentée dans la figure 3.10. Des travaux récents de l'équipe de Mondello concernant cette architecture [272,301–303] ont permis de réduire les débits de la ^2D aux environs de 4 ml/min tout en gardant des performances acceptables. Ce débit permet un couplage direct avec certains spectromètres de masse standards, et le *duty cycle* vaut 1. La largeur des pics ^2D est également compatible avec la fréquence d'acquisition de 20Hz de notre simple quadripôle standard. La partie suivante décrit plus en détail le modulateur et son fonctionnement.

3.2.3.4 Description du modulateur utilisé

La figure 3.11 présente en détail l'architecture du modulateur que nous avons choisi.

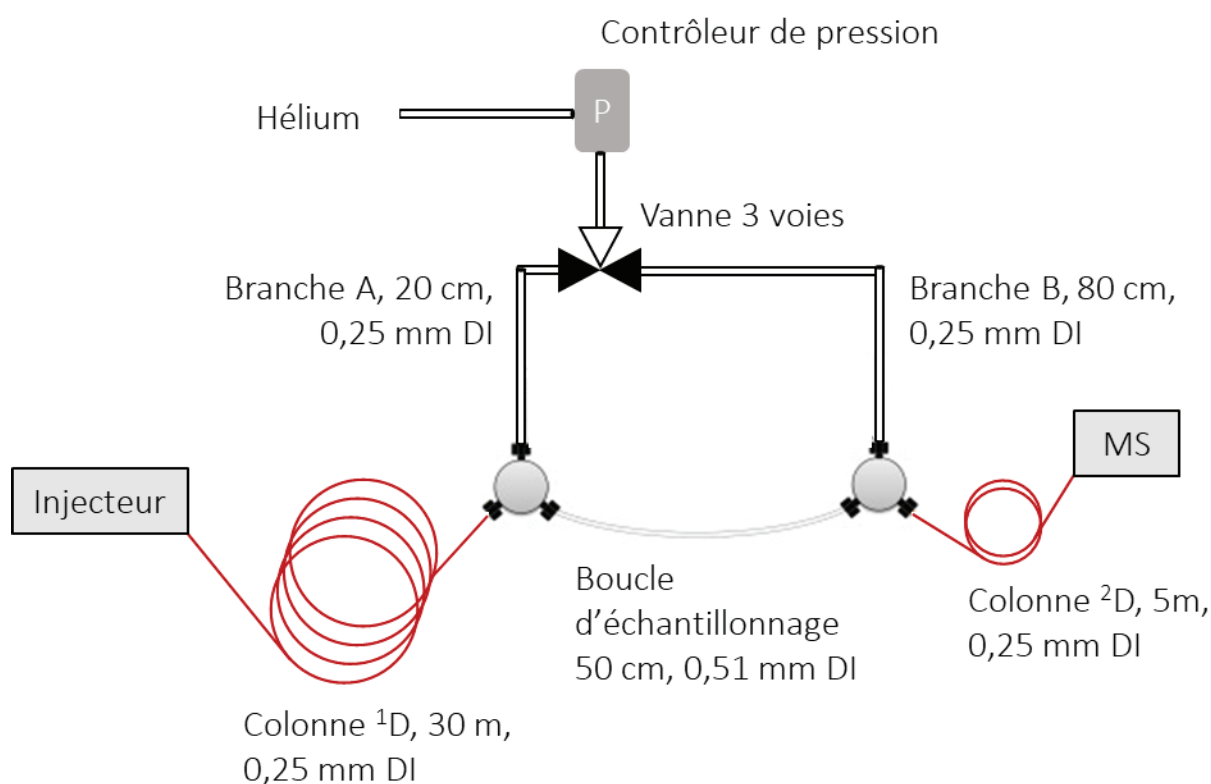


Figure 3.11. Architecture du modulateur utilisé, avec le détail des dimensions de chaque élément

Le modulateur nécessite une deuxième source d'hélium en plus de celle utilisée en ¹D. Un contrôleur de pression permet de gérer la pression appliquée en entrée du modulateur. Contrairement aux modulateurs cryogéniques, les diamètres de colonne sont identiques en ¹D et en ²D. C'est l'utilisation de débits plus élevés en ²D qui permet d'obtenir des séparations rapides dans la ²D. Une vanne trois voies permet de basculer le flux en entrée du modulateur entre la branche A et la branche B. Lors de l'échantillonnage de l'effluent en sortie de ¹D, la vanne bascule sur la position qui envoie le flux vers la branche B. Les composés élués de la ¹D sont alors stockés dans la boucle d'échantillonnage. Celle-ci est vidée en basculant la vanne sur la position envoyant le flux vers la branche A, pour envoyer ce qui a été échantillonné dans la ¹D vers la séparation en ²D. Une fois la boucle d'échantillonnage vidée, la vanne rebascule sur la position qui envoie le flux vers la branche B pour permettre la séparation dans la ²D et l'échantillonnage d'une nouvelle fraction d'élution de la ¹D dans la boucle

d'échantillonnage. Le temps passé sur la position A additionné au temps passé sur la position B correspond à la période de modulation.

Pour séparer les unes des autres les fractions collectées dans la boucle d'échantillonnage, celle-ci doit être vidée rapidement. Le plus simple pour cela consiste à utiliser un débit élevé. C'est ce qui, dans d'autres travaux, empêche de coupler ce modulateur à la spectrométrie de masse. Pour résoudre en partie ce problème, Franchina et coll. utilisent une architecture asymétrique où les tubulures de la branche A sont plus courtes que les tubulures de la branche B. La perte de charge est plus élevée dans la position envoyant le flux vers la branche B que dans la position envoyant le flux vers la branche A. Le débit est donc plus élevé dans la position envoyant le flux vers la branche A. Le modulateur passe 4,5 s sur la position envoyant le flux vers la branche B, et 0,7 s sur la position envoyant le flux vers la branche A. Ainsi, pendant la majorité du temps, en position envoyant le flux vers la branche B, le débit est plus faible. Le débit plus élevé en position envoyant le flux vers la branche A permet de vider rapidement la boucle d'échantillonnage. La longueur et le diamètre interne de la boucle d'échantillonnage sont choisis spécifiquement pour qu'elle puisse être vidée entièrement dans ces conditions. En utilisant cette architecture et les paramètres proposés par Franchina et coll., le débit en ^2D d'environ 4 ml/min est compatible avec une majorité de spectromètres de masse.

La figure 3.12 montre que ce modulateur permet d'obtenir en ^2D des pics avec des largeurs à la base comprises entre 2,5 et 1 s en sortie de colonne ^2D . Ces valeurs sont plus élevées que celles obtenues avec des modulateurs cryogéniques ou avec d'autres types de modulateurs fluidiques.

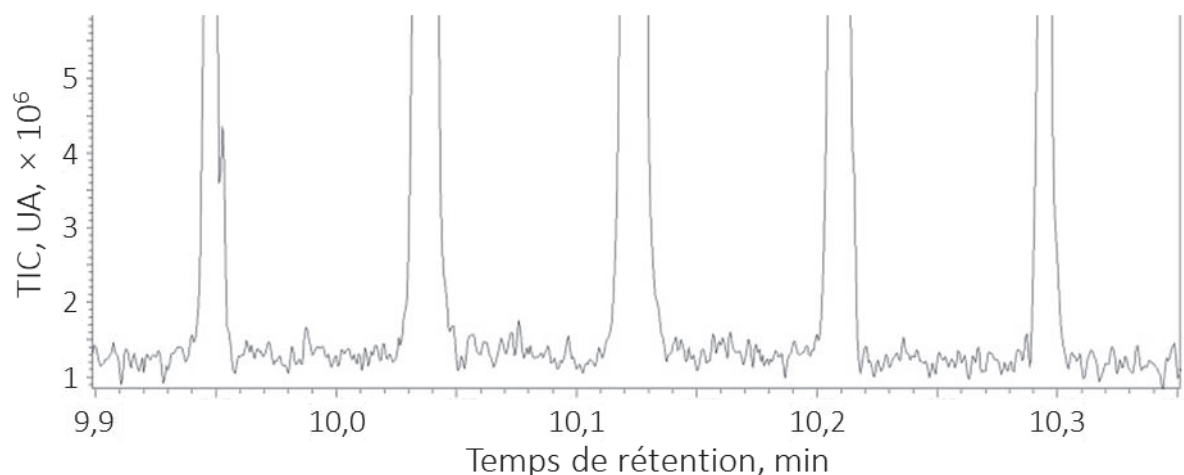


Figure 3.12. Chromatogramme 1D modulé du n-nonane obtenu avec le modulateur fluide décrit par Franchina et coll. avec une détection par spectrométrie de masse, d'après [272]

La largeur des pics présente un désavantage d'un point de vue de la capacité des pics, mais devient un avantage en ce qui concerne les fréquences d'acquisition nécessaires. Les largeurs des pics ²D permettent d'utiliser des spectromètres de masse quadripolaire standard, dont les fréquences d'acquisition maximale valent environ 20 Hz. Cependant, les nouvelles générations de MS quadripolaires peuvent posséder des fréquences d'acquisition de 50 ou 100 Hz.

Pour illustrer les performances de ce modulateur sur un échantillon réel, Franchina et coll. [272] analysent un échantillon d'huile essentielle. Le chromatogramme obtenu est montré dans la figure 3.13.

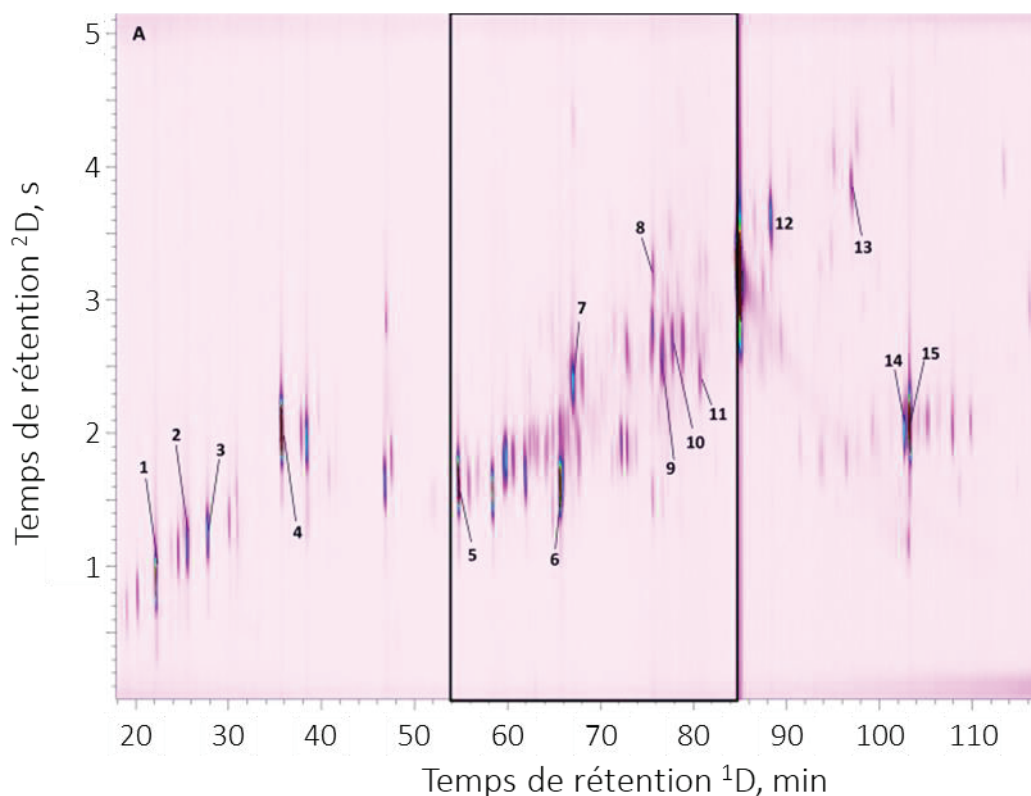


Figure 3.13. Chromatogramme 2D d'une huile essentielle d'Armoise obtenue avec le modulateur décrit par Franchina et coll., d'après [272]

Pour étudier l'effet de la modulation, le même échantillon est également analysé par GC 1D en utilisant la colonne de la 1D seule, à des débits de 0,4 ml/min et de 0,65 ml/min. Les rapports signal/bruit, RSB, sont comparés pour ces expériences. Pour les 15 COV présentés dans l'article, le RSB est plus élevé en GC $\times$ GC pour 14 des 15 molécules. Les RSB sont en moyenne 3,7 fois plus grands par rapport à la GC 1D à 0,4 ml/min et 2,5 fois plus grands par rapport à la GC 1D à 0,65 ml/min.

3.2.4 Conclusion sur la partie bibliographique

Cette partie a tout d'abord montré l'intérêt de la GC $\times$ GC comme méthode d'analyse d'échantillons complexes. Utiliser deux colonnes de chromatographies couplées par un modulateur permet d'augmenter l'espace de séparation disponible dans des proportions inatteignables avec une seule colonne. Cela est possible parce que le modulateur échantillonne et isole les composés élués de la 1D tout en les réinjectant dans la 2D , de nature de phase différente à celle de la 1D , de manière séquentielle et répétée. En plus d'augmenter l'espace de séparation disponible, la GC $\times$ GC permet d'améliorer les limites de détection et d'obtenir des chromatogrammes ordonnés.

Malgré ces différents avantages, la GC $\times$ GC n'a pas beaucoup été utilisée pour l'analyse de l'air expiré, comme nous l'avons montré dans l'étude de la littérature. La description des avantages de la GC $\times$ GC justifie néanmoins l'intérêt d'analyser l'air expiré avec cette technique. À partir de la description rapide du fonctionnement des modulateurs, le choix de l'architecture décrite par Franchina et coll. en 2016 [272] a été justifié.

La partie suivante décrira la mise en place de ce modulateur au sein du laboratoire et les premiers essais effectués sur des mélanges simples de COV. Ces premières analyses seront suivies de résultats qui démontreront la possibilité de coupler des injections par TD à ce type de modulateur. Ensuite, nous utiliserons ce modulateur pour analyser des échantillons d'air expiré et les comparer rapidement aux résultats obtenus pour l'analyse du même échantillon par GC 1D.

Pour finir, nous étudierons la robustesse de ce modulateur. Cette étude montrera la grande influence de faibles variations des paramètres de modulation sur les performances du modulateur. Cela fera ressortir un des problèmes des modulateurs fluidiques en général : l'interdépendance des facteurs qui complexifie l'amélioration des performances.

3.3 Résultats expérimentaux

3.3.1 Matériel et méthode

3.3.1.1 *Instrument de GC-MS*

Un système de GC-MS fourni par Perkin Elmer a été utilisé. Le modèle du GC est Clarus 500 et le modèle du MS est Clarus 560.

3.3.1.2 *Mélange de molécules standards*

Un mélange de 4 molécules test, appelé mix 4, a été obtenu en mélangeant à volume égal du n-pentane, du n-heptane, du n-octane et du toluène. Ces molécules ont été fournies par Sigma-Aldrich et ont des puretés supérieures à 99,9 %.

Un mélange gazeux de benzène, toluène, éthylbenzène et o-xylène à une concentration de 500 ppb dans de l'azote a été fourni par Air Liquide. Ce mélange est stocké dans une bouteille sous pression.

3.3.1.3 *Prélèvement d'air expiré*

L'air expiré a été prélevé en utilisant le système ReCIVA d'owlstone medical. Un litre d'air de fin de respiration a été prélevé sur quatre tubes de TD en parallèle en utilisant les paramètres standards de l'appareil.

3.3.1.4 *Injection en voie liquide*

Pour l'injection du mélange de molécules tests, l'injecteur liquide est utilisé en mode split. L'injecteur est chauffé à 200 °C et un split de 200 est utilisé. Une seringue de 500 nl permet l'injection manuelle de 100 nl de mix 4.

3.3.1.5 *Injection par thermodésorption*

Un appareil de TD Turbo Matrix 350, Perkin Elmer, a été utilisé. Le prélèvement des échantillons a été effectué sur des tubes contenant du Tenax TA, fournis par Supelco. Pour injecter les échantillons prélevés sur les tubes, ces derniers sont chauffés à 300 °C en 3 s pendant 5 min avec un débit de désorption de 40 ml/min. L'échantillon est refocalisé sur un piège froid contenant du Tenax à une température de -25 °C. Puis le piège est chauffé à 300 °C pendant 10 min. Le débit de désorption est constitué de l'*outlet split*, envoyé vers l'évent, qui vaut 20 ml/min additionné du débit envoyé vers la colonne.

L'ensemble du chemin analytique, c'est-à-dire toutes les pièces du TD en contact avec les analytes, est chauffé à 200 °C et la ligne de transfert entre le système de TD et le four de chromatographie est chauffée à 210 °C.

3.3.1.6 Modulateur

Pour fabriquer le modulateur, le matériel suivant est utilisé. Les tés 1/16'' en inox et de diamètre interne 0,25 mm ont été fournis par Supelco ainsi que les tubulures en inox de 0,25 mm et de 0,51 mm de diamètre interne et de diamètre externe 1/16''. Des férules 1/16'' en inox sont utilisées pour connecter les tubulures en inox aux tés et des férules fs1.4-5 fournies par VICI sont utilisées pour connecter les colonnes aux tés. Un régulateur de pression Bronkhorst QP-600-10KG-AAD, est utilisé pour réguler la pression en ²D. Une vanne trois voies, Parker, 009-0269-900, est utilisée pour contrôler la direction du flux dans le modulateur. La vanne et le contrôleur de pression sont contrôlés par un DAQ, lui-même contrôlé par le programme LabVIEW permettant de fixer la pression en ²D et le temps de basculement entre chaque position de la vanne trois voies.

3.3.1.7 Paramètres de GC-MS

Une colonne de type 5ms, 30 m, 0,25 mm de diamètre interne et 0,250 µm d'épaisseur de film de phase stationnaire, Supelco, est utilisée. La pression en tête de colonne est de 70 kPa. Le gradient est le suivant : 50 °C pendant 5 min, puis 5 °C/min jusqu'à 300 °C puis 300°pendant 5 min. Le spectromètre de masse a une fréquence d'acquisition de 4 Hz sur la gamme de m/z comprise entre 20 et 200.

3.3.1.8 Paramètres de GC × GC-MS

La colonne de ¹D est de type 5ms, 30 m, 0,25 mm de diamètre interne et 0,250 µm de phase. En ²D une colonne de type WAX, Supelco, de 5 m, 0,25 mm de diamètre interne et 0,250 µm d'épaisseur de film de phase stationnaire est utilisée. Elle a été prélevée dans une colonne de 30 m. La pression en tête de ¹D est de 89,5 kPa. La fréquence d'acquisition du MS est de 20 Hz sur une gamme de m/z comprise entre 20 et 200.

3.3.2 Duplication du modulateur

3.3.2.1 Mise en place du modulateur

Nous avons reproduit le montage décrit par Franchina et coll. [272] dans le GC disponible au sein du laboratoire. Dans l'article, il est écrit que des capillaires, «*uncoated column*», sont utilisés pour les branches A et B du modulateur. Pour faciliter les connexions et la manipulation, nous avons remplacé les capillaires par des tubulures 1/16'' en acier inoxydable, moins fragiles. Afin d'obtenir plus de latitude lors de l'installation du modulateur, nous avons remplacé le capillaire de la branche B, composé d'une portion de tube de 10 cm de long et de 0,25 mm de DI et d'une portion de tube de 19 cm de long et de 0,18 mm de diamètre interne dans la publication, par une unique portion de tube de résistance fluidique identique de 80 cm de long et de 0,25 mm de DI.

La portion la plus longue de la branche du modulateur facilite également la mise en place de celui-ci dans le four de GC. La vanne est située à l'extérieur du four avec le contrôleur de pression et la boucle d'échantillonnage est située à l'intérieur du four. Les deux branches passent par des orifices du four de GC prévu pour la ligne de transfert du TD et un injecteur supplémentaire. Même si ce montage est simple à fabriquer, toutes les pièces à faire rentrer dans le four de GC prennent de la place.

Pour contrôler le temps pour chaque position de vanne et la pression imposée par le contrôleur de pression, un petit montage électronique a été dupliqué. Ce montage existait déjà pour d'autres expériences au sein du laboratoire. Afin de contrôler le montage électronique, nous avons utilisé un programme LabVIEW. Il permet de gérer le temps que passe la vanne dans chaque position et la tension appliquée au contrôleur de pression. La pression est directement proportionnelle à la tension imposée au contrôleur de pression. Une capture d'écran du programme LabVIEW est présentée dans la figure 3.14.



Figure 3.14. Tableau de bord du programme labView utilisé pour contrôler les paramètres du modulateur

3.3.2.2 Premiers résultats sur mélange de molécules simples

Afin de tester le montage mis en place, nous avons effectué des premières expériences avec le mélange mix 4 qui contient du pentane, de l'heptane du toluène et de l'octane. Ces molécules possèdent respectivement des températures d'ébullition de 36 °C, 98 °C, 111 °C et 125 °C. Le pentane, l'heptane et l'octane présentent la même polarité et seront donc peu retenus sur la ²D alors que le toluène, un peu plus polaire sera plus retenu par la colonne WAX.

Le mélange mix 4 est injecté en phase liquide, grâce à l'injecteur liquide dans les conditions décrites dans la partie matériel et méthode. Le premier chromatogramme 1D modulé obtenu par GC × GC-MS au sein du laboratoire est montré dans la figure 3.15.

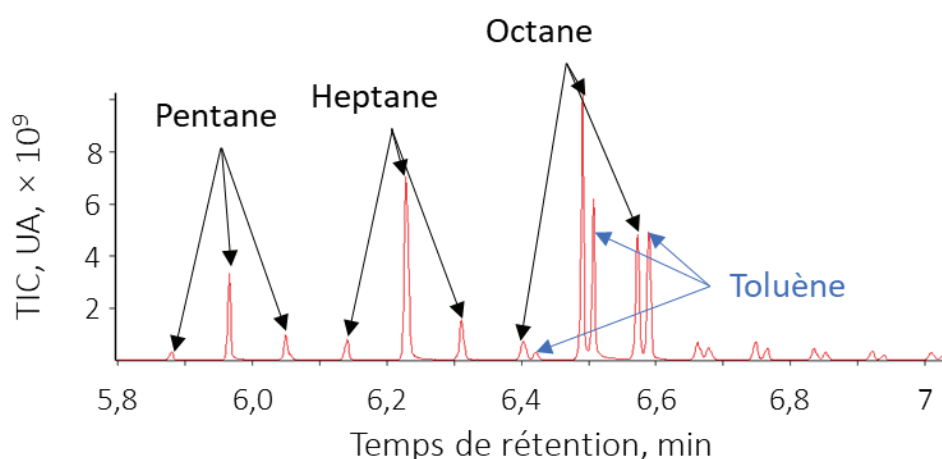


Figure 3.15. Chromatogramme modulé 1D obtenu avec le système de modulation fluide pour l'injection d'un mélange de pentane, heptane, octane et toluène. Four GC en isotherme à 125 °C. Autres conditions dans la partie expérimentale.

La figure 3.16 présente plus spécifiquement le chromatogramme ionique extrait du rapport $m/z = 91$. Il montre plus précisément un des pics ²D qui correspond au toluène, aux alentours

de 6,6 min. Le pic 2D est montré en entier à gauche et un agrandissement de la base du pic est montré à droite. La largeur à la base du pic vaut environ 0,03 min soit environ 1,8 s.

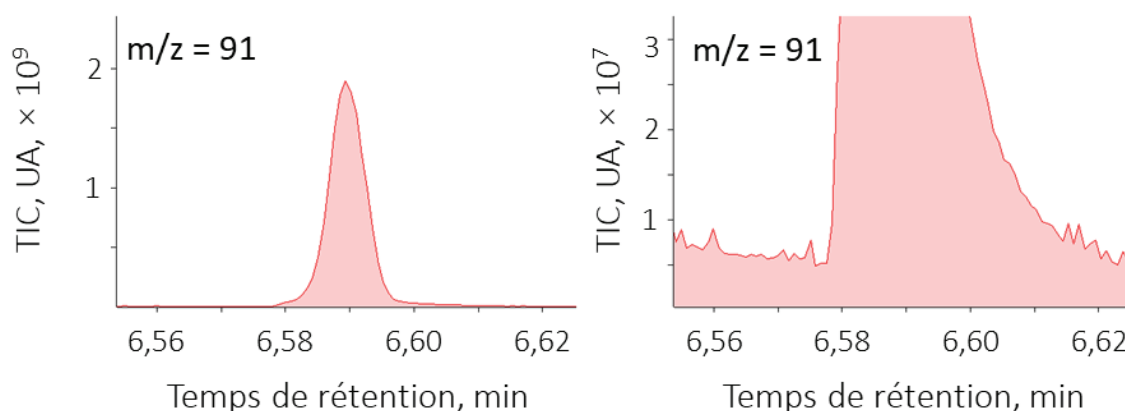


Figure 3.16. Chromatogramme ionique extrait du rapport $m/z = 91$ qui montre la largeur d'un pic 2D du toluène dans le chromatogramme modulé 1D. Un agrandissement de la base du pic est montré à droite pour caractériser la largeur du pic à la base

Le modulateur reproduit au sein du laboratoire, basé sur les travaux de Franchina et coll., permet donc de retrouver des résultats similaires à ceux publiés dans l'article [272]. Ce montage permet d'effectuer des analyses par GC $\times$ GC-MS, avec un chromatographe standard et un spectromètre de masse quadripolaire basse fréquence. La fréquence d'acquisition de 20 Hz et la largeur des pics est de l'ordre de la seconde ce qui conduit à plus de 20 spectres par pic. Le débit de la 2D , autour de 4 ml/min, est compatible avec la pompe à vide standard fournie avec le spectromètre de masse. Ce genre de modulateur peut donc s'installer sur quasiment tout système de GC-MS standard.

3.3.3 Couplage de la thermodésorption et de la GC $\times$ GC-MS

À notre connaissance, ce type de modulateur n'avait encore jamais été couplé avec un système d'injection par TD [272,301,302]. Pour vérifier la compatibilité entre ce système d'injection et ce type de modulateur, un échantillon de BTEX a été prélevé sur un tube de TD et injecté selon les paramètres décrits dans la partie matériel et méthode. En effet, l'injection de l'échantillon refocalisé sur le piège froid nécessite un débit minimum. Le chromatogramme 1D modulé obtenu est présenté dans la figure 3.17.

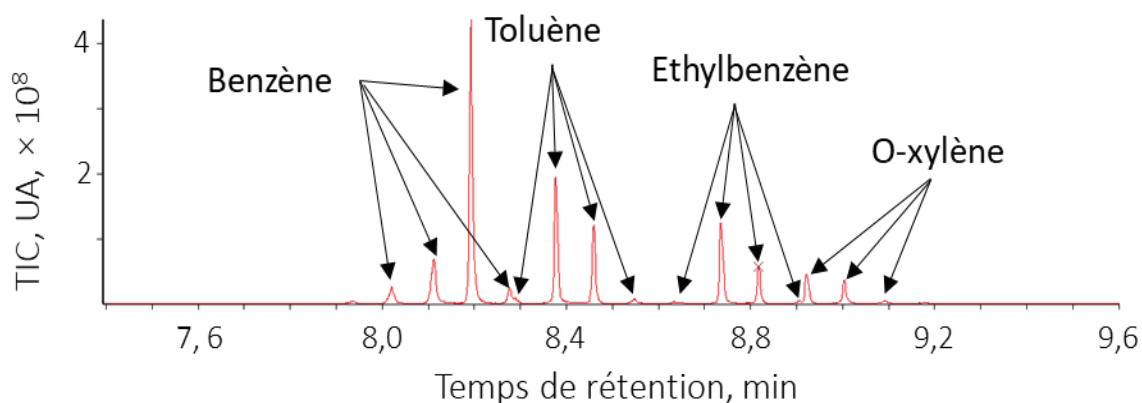


Figure 3.17. Chromatogramme 1D modulé des BTEX obtenu après injection par TD

Le chromatogramme obtenu montre la possibilité de coupler une injection TD à ce système de GC $\times$ GC. Il faut cependant rester vigilant quant à la quantité finale de matière injectée dans la colonne de chromatographie. En effet, le débit dans le 1D est d'environ 0,4 ml/min. Comme expliqué précédemment, un débit minimum de désorption du piège froid est nécessaire pour injecter efficacement des bandes de solutés étroites dans la colonne. Une partie du débit est envoyé vers la colonne et le reste est envoyé vers l'évent, split. Dans la configuration GC $\times$ GC-MS, le débit envoyé vers la colonne 1D est inférieur aux débits utilisés pour des séparations 1D. Cela signifie donc que moins de matière est injectée en tête de colonne dans le cas d'une séparation 2D par rapport à une séparation 1D. Les débits utilisés en GC 1D sont de l'ordre de 1 ou 2 ml/min. Cela signifie donc qu'entre 2 et 5 fois moins de matière est injectée en GC $\times$ GC par rapport à la GC 1D ce qui peut limiter le gain en détectabilité de la GC $\times$ GC par rapport à la GC 1D.

3.3.4 Analyse d'air expiré avec le modulateur reproduit

3.3.4.1 Analyse d'air expiré par GC $\times$ GC-MS

Un échantillon réel d'air expiré a été injecté dans ce système d'analyse par GC $\times$ GC-MS pour étudier l'intérêt de cette approche. L'échantillon a été prélevé au moyen de l'appareil ReCIVA fabriqué par Owlstone. Le chromatogramme 2D obtenu est présenté dans la figure 3.18.

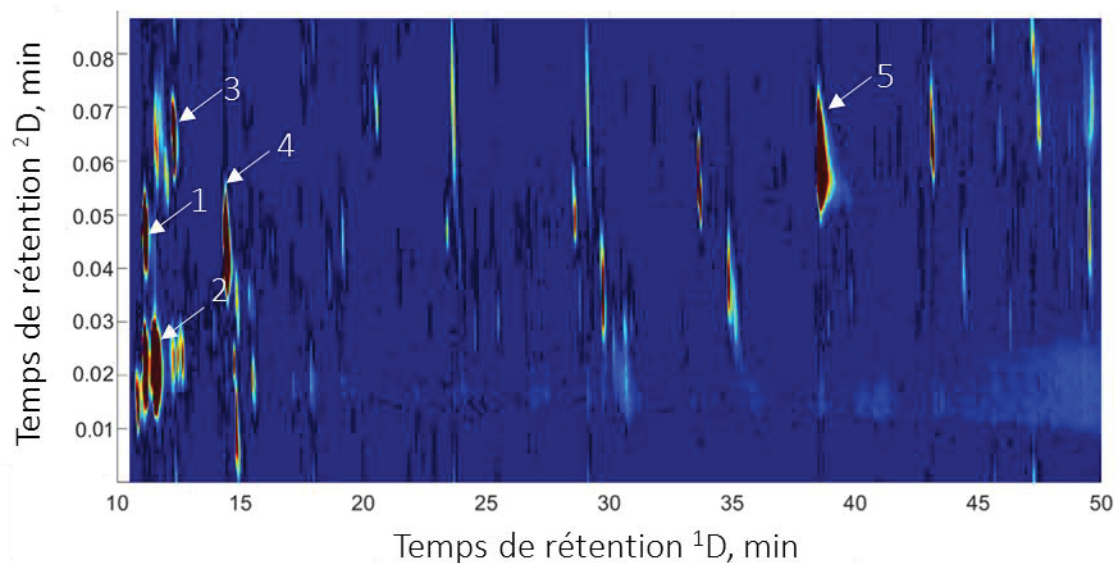


Figure 3.18. Chromatogramme 2D obtenu pour l'analyse d'air expiré d'une personne saine avec le système de GC $\times$ GC-MS présenté dans la partie précédente, le signal avant 10 min et après 50 min n'est pas présenté, car il ne contient pas de pics. Les cinq pic les plus intenses sont numérotés et sont utilisés plus tard pour une comparaison avec la GC-MS. Ils correspondent respectivement à l'acétone, au 1-hexène, à l'acétate d'isopropyl, au toluène et au tridécano

Cette expérience montre que le système de modulateur fabriqué peut être utilisé pour analyser de l'air expiré. La GC $\times$ GC présente un intérêt spécifiquement pour les molécules qui possèdent des temps de rétention compris entre 10 et 15 min. L'utilisation de la GC $\times$ GC permet la levée des coélutions observées pour de nombreuses molécules. Ce phénomène est discuté plus en détail ci-après grâce à la comparaison de la séparation 2D avec une séparation 1D.

3.3.4.2 GC $\times$ GC-MS et GC-MS pour l'analyse des COV exhalés, comparaison

3.3.4.2.1 Analyse par GC-MS

La publication [272] qui décrit le fonctionnement du modulateur que nous avons dupliqué comparait ses performances à la GC 1D. Cependant, les débits utilisés pour la GC 1D se situent en dehors des gammes recommandées. Les deux expériences sont réalisées avec des débits de 0,4 et 0,65 ml/min. Pour comparer plus scrupuleusement la GC $\times$ GC à la GC, nous avons analysé l'échantillon précédent par GC-MS simple avec une pression en tête de colonne de 75,9 kPa, ce qui correspond à un débit de 1,3 ml/min à 50 °C. Ce débit est plus adapté que les débits utilisés par Franchina et coll pour une séparation 1D. Le chromatogramme obtenu est montré dans la figure 3.19. Comme le split était fixé à 20 ml/min pour la TD lors de

l'injection en GC et en GC × GC, les quantités de matières injectées diffèrent dans les deux expériences.

3.3.4.2.2 Modulation des COV très légers

Dans le chromatogramme 1D obtenu par GC-MS présenté dans la figure 3.19, de nombreux pics sont observés entre 2 et 4 min mais ils ne sont pas du tout résolus. Ainsi la GC × GC présente bien des avantages pour l'analyse de ce type d'échantillon.

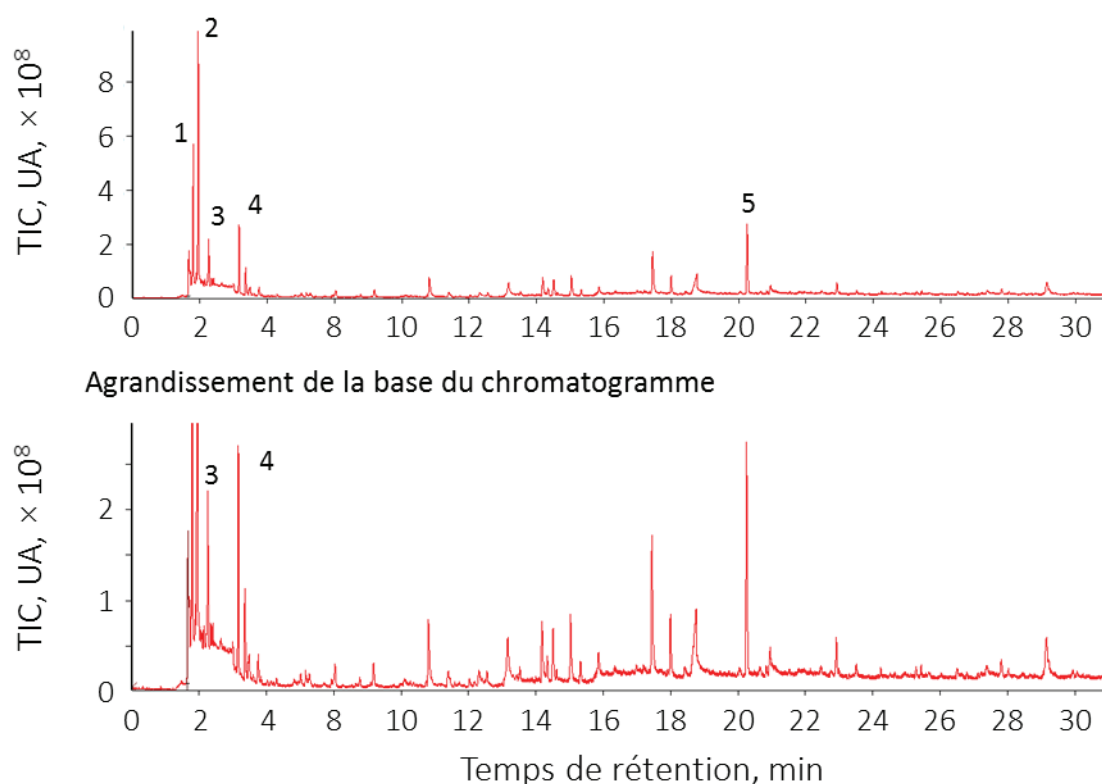


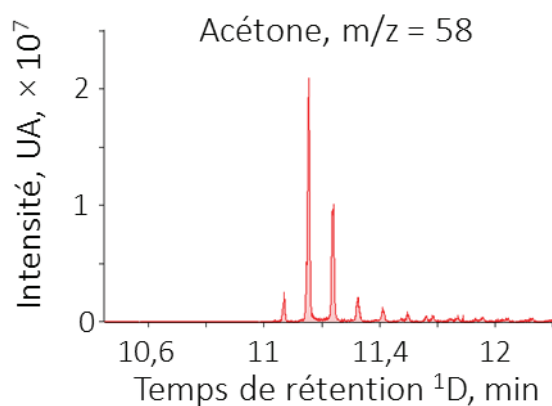
Figure 3.19. Chromatogramme d'air expiré obtenu par GC-MS. Il s'agit du même échantillon que celui analysé par GC × GC

Comme le montre le chromatogramme, dans les conditions analytiques choisies de nombreux pics ont des temps de rétention compris entre 1,5 et 4 min dans le chromatogramme 1D. Le pic numéro 4 à 3,2 min correspond au toluène. Cela signifie donc que les pics élués avant 3,2 min correspondent à des molécules qui possèdent des températures d'ébullition inférieures à celle du toluène, c'est à dire inférieure à 110 °C. En effet, la colonne utilisée, de type 5ms, sépare, en première approximation, les composés en fonction de leur température d'ébullition. Dans le chromatogramme obtenu par GC × GC, le toluène a un temps de rétention en ¹D de 14,45 min. Comme le montre le chromatogramme 2D, tous les composés avec un temps de rétention inférieur à 15 min sont modulés correctement. Ainsi, même les

COV très légers sont modulés correctement en utilisant un modulateur fluidique, ce que ne permet pas forcément l'utilisation de modulateurs cryogéniques.

Selon le système de refroidissement utilisé avec un modulateur cryogénique, tous les COV ne peuvent pas être modulés. Même en utilisant un système à base de N₂ seul les COV à partir de C₃ sont modulés[294]. Ces systèmes sont plus compliqués et surtout très consommateurs en fluides cryogéniques.

En utilisant le modulateur fluidique, tous les COV sont modulés, sans aucune limitation liée à la volatilité [294]. La figure 3.20 montre le chromatogramme 1D modulé de l'acétone, il



illustre bien les capacités du modulateur fluidique à moduler des composés très volatils.

Figure 3.20. Chromatogramme ionique extrait de $m/z = 58$ 1D modulé montrant les pics 2D de l'acétone contenue dans l'échantillon d'air expiré analysée par GCGCMS

Cette possibilité de moduler des COV très légers avec un modulateur simple et sans fluides cryogéniques établit de manière non équivoque la supériorité du modulateur fluidique sur les modulateurs cryogéniques dans le cas de l'analyse de l'air expiré. En effet, cet échantillon contient de nombreux composés très volatils. Les chromatogrammes montrés dans la figure 3.18 et la figure 3.19 ne contiennent pas de COV plus légers que l'acétone à cause de l'adsorbant utilisé pour le prélèvement. En effet, le Tenax ne permet pas de piéger des composés plus légers. Cependant, des COV plus légers que l'acétone sont décrits dans l'air expiré [213].

3.3.4.2.3 Comparaison entre la GC et la GC × GC

Pour comparer soigneusement l'effet du modulateur sur le rapport signal/bruit, RSB, par rapport à la GC 1D, le même échantillon que celui analysé en GC × GC a été analysé par GC

avec une pression de 70 kPa, ce qui correspond à un débit de 1,3 ml/min, plus adapté que les conditions utilisées par Franchina et coll. Le chromatogramme obtenu a déjà été présenté dans la figure 3.19.

Dans l'article qui décrit le fonctionnement du modulateur que nous avons utilisé, une comparaison avec la GC 1D est effectuée [272]. Deux débits sont utilisés, 0,4 ml/min et 0,65 ml/min. Ces débits valent moins que les valeurs recommandées pour une colonne de 30 m de long et de diamètre interne 0,25 mm. La comparaison avec la GC à un débit de 0,4 ml/min présente un intérêt car elle permet de déterminer l'intérêt du processus de modulation. En effet, c'est le débit la colonne ¹D dans le montage 2D. La comparaison avec la GC 1D à un débit de 0,65 ml/min n'est pas représentative du fonctionnement normal d'une colonne de ces dimensions. Pour ces dimensions de colonne, des débits compris entre 1,3 et 2 ml/min sont le plus souvent recommandés. Un débit plus faible peut entraîner un élargissement des pics. Cette comparaison pourrait donc surestimer la capacité du modulateur à améliorer le RSB par rapport à une séparation monodimensionnelle effectuée dans des conditions standards.

Les RSB et les intensités des cinq pics les plus intenses ont été comparés entre la GC à 1,3 ml/min et la GC × GC. Ces cinq pics sont numérotés dans le chromatogramme 1D, montré dans la figure 3.19 et également dans le chromatogramme 2D, présenté dans la figure 3.18. Pour chacun des cinq pics, le m/z le plus intense a été utilisé pour calculer le RSB. Pour chacun des cinq COV, les chromatogrammes ioniques extraits 1D obtenus par GC-MS et les chromatogrammes 1D modulés obtenus par GC × GC-MS sont montrés, ainsi que les RSB dans la figure 3.21 et la figure 3.22. Pour la séparation 2D, le RSB du pic ²D le plus intense a été utilisé.

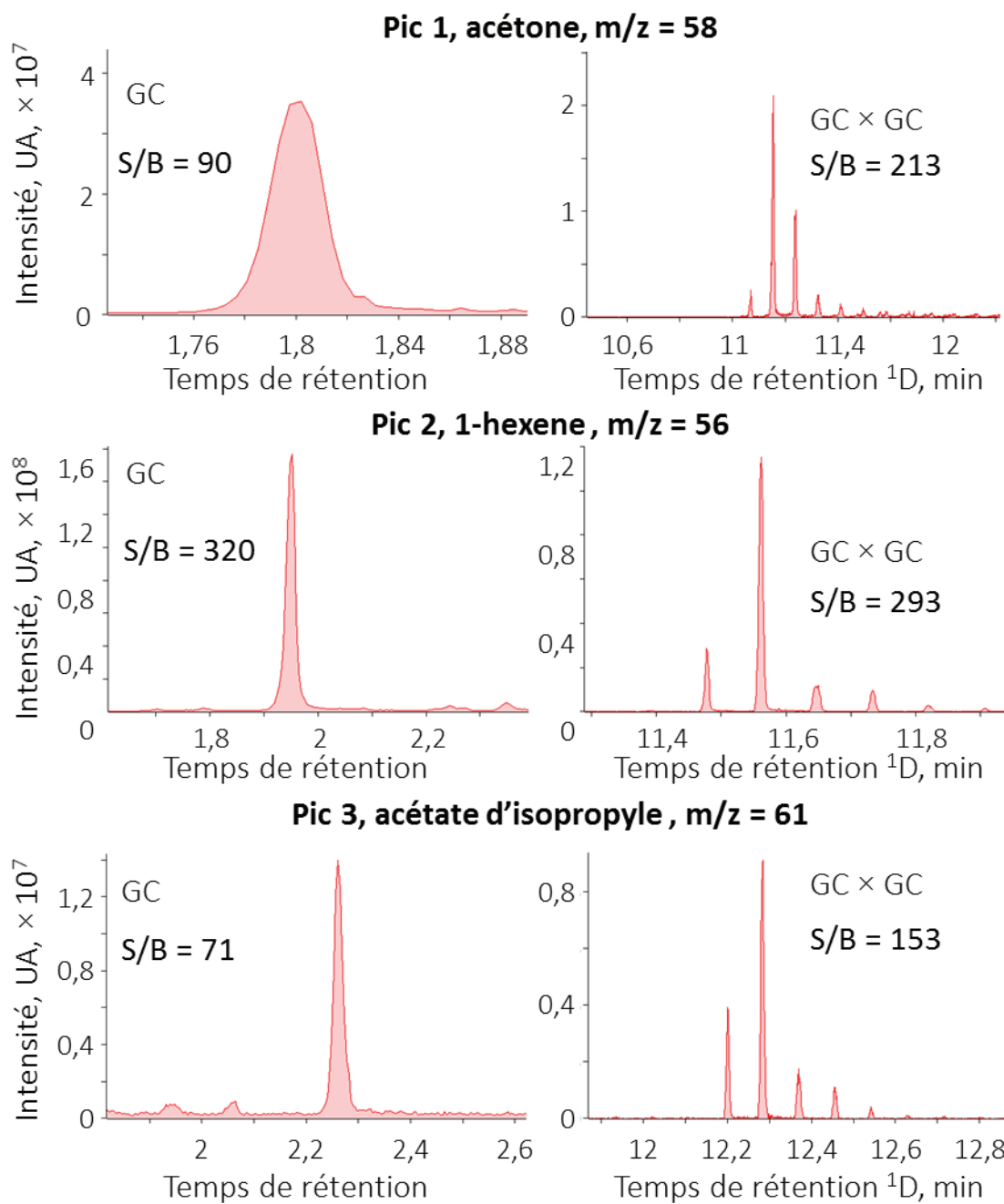
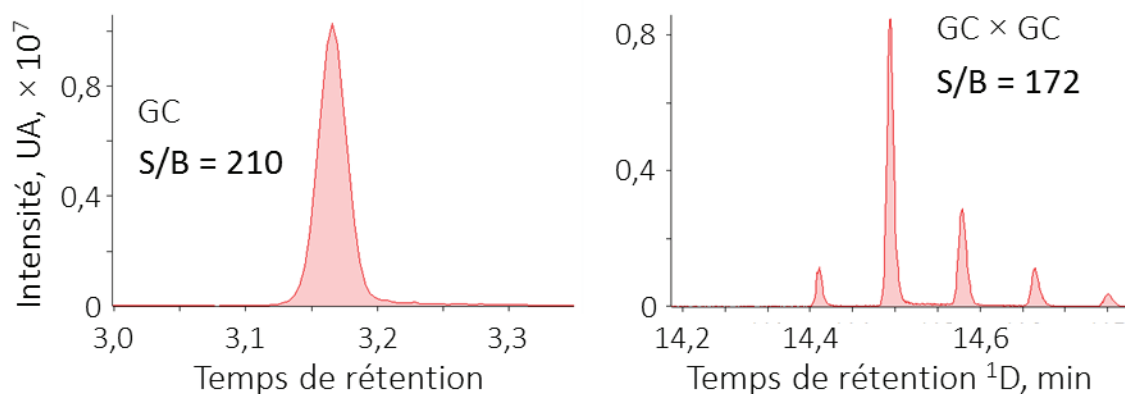


Figure 3.21. Comparaison des intensités des pics et des RSB, entre la GC et la GC $\times$ GC des composés 1, 2, et 3. Pour une meilleure lisibilité, les chromatogrammes sont les chromatogrammes ioniques extraits de l'ion le plus intense pour chaque composé

Pic 4, toluène, $m/z = 91$



Pic 5, tridécane $m/z = 43$

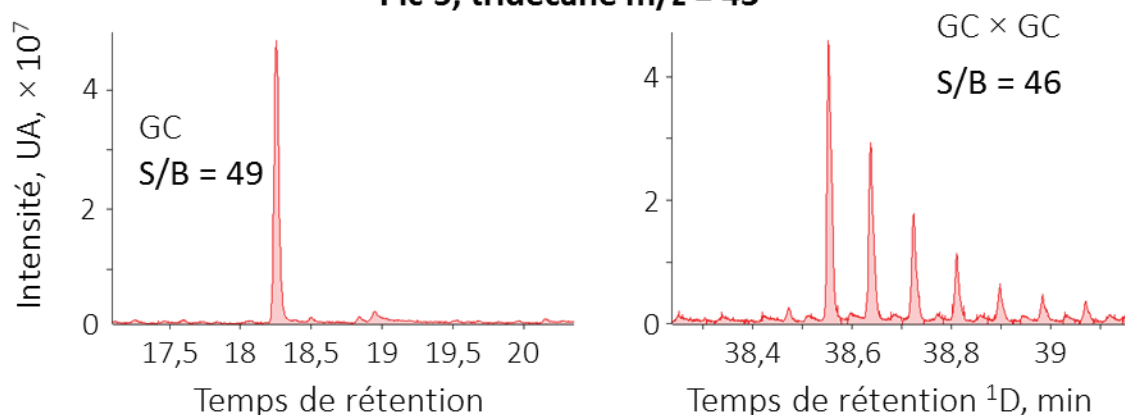


Figure 3.22. Comparaison des intensités des pics et des RSB, entre la GC et la GC $\times$ GC des composés 4 et 5. Pour une meilleure lisibilité, les chromatogrammes sont les chromatogrammes ioniques extraits de l'ion le plus intense pour chaque composé.

Pour les cinq molécules étudiées, les RSB et l'intensité des pics sont à chaque fois du même ordre de grandeur en GC 1D et en GC $\times$ GC. Pour le pic 1 et le pic 3, les RSB sont plus de deux fois meilleurs en GC $\times$ GC par rapport à la GC 1D. Pour les pics 2 et 4 les RSB sont un peu meilleurs en GC. Pour le pic 5 les RSB sont quasiment identiques. Il faut cependant rappeler que dans le cas de la GC $\times$ GC la quantité de matière injectée par TD est plus faible, d'un facteur trois environ, à cause du débit dans la colonne comme expliqué précédemment.

Par rapport aux résultats publiés par Franchina et coll., l'amélioration du RSB en GC $\times$ GC par rapport à la GC semble plus limitée. Cependant, cette étude n'est réalisée que pour quelques composés. Les résultats plus mitigés que nous avons obtenus peuvent être expliqués par l'utilisation de paramètres adéquats pour le débit de la colonne en GC 1D. Cette comparaison mériterait d'être effectuée de manière plus systématique avec un mélange de molécules standards plutôt qu'avec des échantillons réels. De plus, le nombre de mesures demeure faible et la variabilité n'a pas été déterminée.

Les chromatogrammes 1D modulés obtenus en GC × GC montrent également que le nombre de modulations par pic ¹D vaut toujours plus que cinq. Ce suréchantillonnage de la ¹D a une influence négative sur les RSB des pics ²D car la matière est dispersée sur un plus grand nombre de pics. Il faudrait réfléchir à une solution pour réduire la largeur des pics ¹D tout en maintenant une perte de charge constante dans la colonne de ¹D. Cependant comme le changement d'un paramètre a une influence sur tous les autres, cela est compliqué.

Pour tenter d'améliorer le fonctionnement de ce modulateur, la prochaine partie est dédiée à l'étude des paramètres de modulations au moyen de plans d'expériences.

3.3.5 Étude de la robustesse du modulateur fluidique

Spécialement dans le cas de l'architecture de modulateur qui a été utilisée peu de travaux étudient les paramètres importants et la stabilité des performances lors d'un écart au point de fonctionnement idéal. La majorité des articles propose des architectures qui fonctionnent [301,302], avec des ajustements de paramètres à la marge, sans vraiment expliquer la manière dont le point de fonctionnement a été trouvé. Pour tenter de mieux comprendre le fonctionnement de ce modulateur, un travail d'étude de la robustesse a été effectué par Mohamed Bensifia dans le cadre de son stage de master 2. Cette partie présente les résultats qu'il a obtenus durant son stage. Ce stage a eu lieu à l'ESPCI alors que les données précédentes ont été obtenues au CEA Grenoble. Cela explique la première partie du travail qui a consisté à retrouver un point de fonctionnement sur un autre système d'analyse.

3.3.5.1 Adaptation des paramètres pour une détection FID

Une première adaptation du dispositif s'est révélée nécessaire parce que le MS disponible pour ces essais ne supportait pas le débit du modulateur. Pour obtenir des résultats plus fiables, il a été choisi d'utiliser un FID. Comme le FID est à pression ambiante et que le MS est sous vide, cela influence le débit dans les colonnes et donc le processus de modulation. Le chromatogramme 1D modulé que nous avons obtenu en utilisant les paramètres de l'article de Franchina et coll. [272] en utilisant un FID est montré dans la figure 3.23.

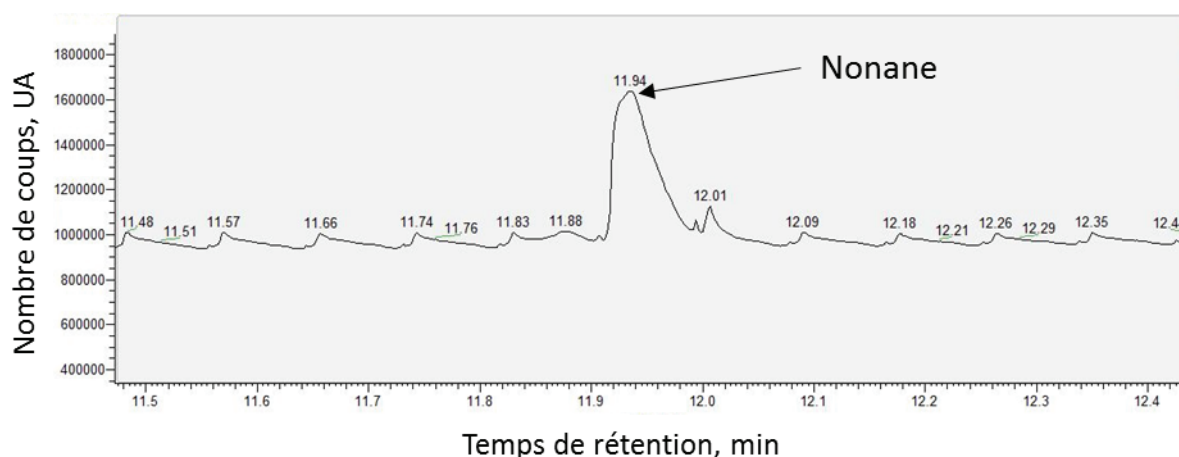


Figure 3.23. Chromatogramme 1D modulé montrant le pic 2D du n-nonane, en utilisant les conditions de modulations de Franchina et coll., mais avec un FID, injection en voie liquide, gradient de 40 °C à 250 °C, 10 °C/min.

Le chromatogramme présenté dans la figure 3.23 montre bien que les paramètres du modulateur fonctionnent uniquement lorsque le détecteur est un spectromètre de masse et pas lorsqu'un FID est utilisé. En utilisant un FID, le pic 2D est large, non symétrique, et le pic 1D n'est pas échantillonné correctement. La forme des pics n'a absolument rien à voir avec ceux montrés dans la figure 3.12 ou la figure 3.15.

Comme le FID est à pression ambiante, le débit dans la colonne 2D est plus faible. Cela signifie que lors de l'injection du contenu de la boucle d'échantillonnage dans la colonne de 2D le débit et donc la vitesse linéaire dans la boucle d'échantillonnage sont également plus faibles. Ainsi, ces conditions ne doivent pas permettre d'injecter entièrement le contenu de la boucle d'injection, ce qui explique l'allure du chromatogramme 1D modulé montré dans la figure 3.23.

Pour tenter de trouver un nouveau point de fonctionnement, un plan d'expérience a été fait. Trois facteurs ont été choisis : la pression en 1D , le temps de modulation et la pression en tête du modulateur. Trois niveaux ont été choisis pour chaque facteur et sont présentés dans le tableau 3.2. La modulation possède deux valeurs qui correspondent à la position remplissage et injection respectivement. Le deuxième niveau représente les valeurs au centre du domaine expérimental. Le plan utilisé est de type factoriel complet 2^3 avec trois points au centre.

Tableau 3.2. Facteurs et niveaux utilisés pour le plan d'expérience pour déterminer des paramètres de fonctionnement du modulateur

Niveau (grandeur codée)	Pression ¹ D, kPa	Modulation, A/B, s	Pression ² D, kPa
-1	90	3/0,4	60
0	110	4,5/0,7	70
1	130	7/0,9	90

Les réponses utilisées pour déterminer l'efficacité de la modulation sont le nombre de modulations par pic ¹D, la largeur du pic ²D et l'intensité du pic de butyle butyrate (injection liquide de 1 µl d'un échantillon à 100 mg/l). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.3.

Tableau 3.3. Matrice d'expériences du plan d'expériences avec les valeurs obtenues pour les différentes réponses choisies

Essai	Pression ¹ D	Modulation	Pression ² D	Modulations par pic	Largeur pic ² D (s)	Intensité pic ² D
1	-1	-1	-1	4	3,4	6 10 ⁵
2	-1	1	-1	4	3,4	1,3 10 ⁶
3	1	-1	1	2	7	3,5 10 ⁶
4	0	0	0	2	5,2	1,7 10 ⁶
5	-1	1	1	4	0,9	3 10 ⁵
6	1	-1	-1	2	3,4	2,7 10 ⁶
7	1	1	-1	1	3,4	1,7 10 ⁶
8	0	0	0	2	5,2	2,4 10 ⁶
9	-1	-1	1	9	0,64	1,15 10 ⁶
10	1	1	1	1	7	3,6 10 ⁶
11	0	0	0	2	5,2	1,9 10 ⁶

Les largeurs de pic observées correspondent souvent à la période de modulation. C'est le cas pour les essais 1 à 4, 5 à 8 et 10 et 11. Lorsque ce phénomène se produit, le modulateur n'arrive pas à séparer les fractions les unes des autres et les pics ²D se recouvrent. La largeur de pic annoncée correspond alors à la période de modulation mais elle est en réalité plus grande. Ainsi, parmi les dix expériences effectuées, huit ne permettent pas d'observer une modulation correcte des pics ¹D. Cela ne permet pas d'exploiter ce plan d'expérience de manière conventionnelle ni de calculer des effets pour chaque paramètre étudié.

Un unique jeu de facteurs fournit une modulation acceptable, il s'agit de l'essai 9. C'est l'essai pour lequel le pic ²D est le plus fin et l'intensité du pic la plus élevée. Cela correspond à une pression en ¹D de 90 kPa, d'une période de modulation de 3,4 s et d'une pression ²D en tête du modulateur de 90 kPa. La pression plus élevée en ²D doit permettre de vider la boucle

d'échantillonnage. Cependant, ces paramètres de modulation entraînent un suréchantillonnage du pic de 1D . L'essai 5 n'est pas retenu car l'intensité du pic est faible malgré un échantillonnage correct du pic $1D$. Une fuite doit avoir eu lieu lors de la modulation.

Un exemple de chromatogramme $1D$ modulé obtenu dans les conditions de l'essai 9 est montré dans la figure 3.24.

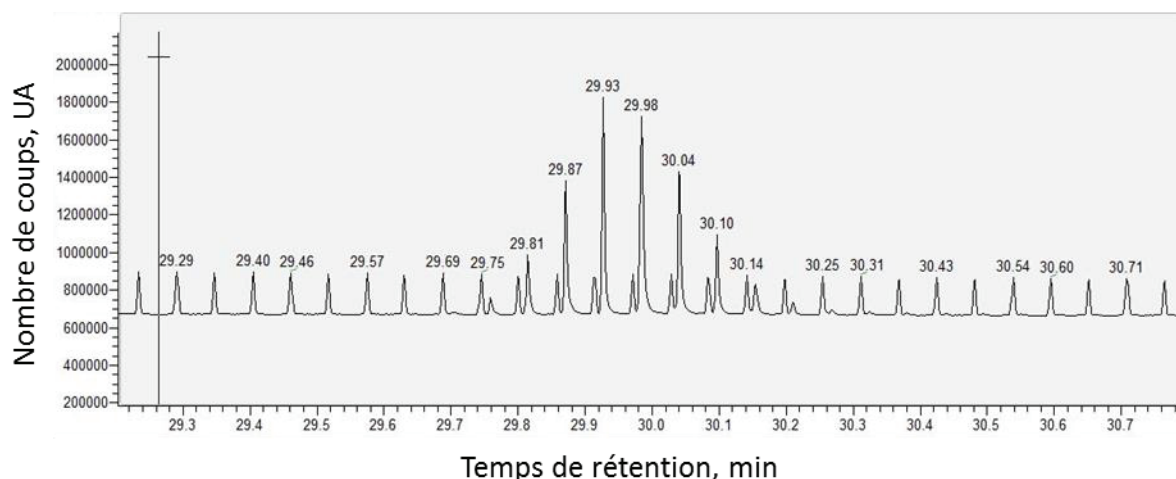


Figure 3.24. Chromatogramme $1D$ modulé du butyle butyrate obtenu avec les nouvelles conditions de modulation déterminées grâce au plan d'expérience

Le plan d'expérience a donc permis de déterminer de nouveaux paramètres de modulation pour utiliser un FID à la place du spectromètre de masse. La pression plus grande en tête du modulateur permet d'augmenter le débit et la vitesse linéaire dans la boucle d'échantillonnage. Ainsi, la fraction prélevée dans la boucle d'échantillonnage est injectée entièrement dans la 2D .

Ce plan d'expérience illustre également la difficulté d'améliorer le fonctionnement du modulateur. La pression en tête de modulateur modifie l'efficacité de séparation en 2D et la compatibilité avec les détecteurs. Mais la pression en tête du modulateur a également un effet sur l'injection du contenu de la boucle d'échantillonnage dans la 2D et la vitesse linéaire, c'est-à-dire sur l'efficacité de séparation, dans la 1D . Cela signifie donc que lorsque la pression en 2D est modifiée, il peut être également intéressant de modifier le temps de modulation, la pression en 1D , la longueur de la boucle d'échantillonnage et la perte de charge dans les branches A et B du modulateur. L'interdépendance des paramètres complique grandement

l'amélioration du fonctionnement du modulateur. De fait, cela illustre également l'intérêt des plans d'expériences pour ces investigations.

3.3.5.2 Étude de la robustesse des paramètres de modulation

Les différents résultats publiés dans la littérature [272,301–303] et les résultats présentés dans l'expérience précédente laissent penser que la gamme de fonctionnement du modulateur utilisé est limitée. Pour vérifier cela, la robustesse des paramètres de modulations a été étudiée. La robustesse est définie comme la capacité d'une méthode analytique à rester inchangée lorsque des petites variations dans les conditions expérimentales se produisent. Dans le cadre d'une étude de robustesse, les variations des paramètres sont faibles de manière à simuler ce qui pourrait se passer en cas de transfert de la méthode dans un autre laboratoire par exemple.

Les paramètres de modulation ont donc été légèrement modifiés pour étudier l'influence de cette modification sur les performances au moyen d'un plan d'expérience. Les facteurs utilisés sont les mêmes que ceux de la partie précédente. Les variations représentent entre 2 et 4 % pour la pression en 1D et la période de modulation et entre 5 et 8 % pour la pression en 2D . Les niveaux utilisés pour chaque paramètre sont montrés dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4. Facteurs et niveaux utilisés pour le plan d'expériences pour l'étude de la robustesse des paramètres de modulations

Coordonnées réduites	P 1D , kPa	Période de modulation	Pression 2D , kPa
-1,63	86,73	3,23	82,4
-1	88	3,3	86,5
0	90	3,4	90
1	92	3,5	94,5
1,63	93,26	3,56	97,2

La matrice d'expérience ainsi que les résultats associés sont présentés dans le tableau 3.5. Il s'agit d'un plan composite centré.

Tableau 3.5 Matrice d'expériences du plan d'expériences utilisé pour l'étude de la robustesse avec les valeurs obtenues pour les différentes réponses choisies

Essai	Facteurs			Réponse		
	Pression ¹ D	Modulation	Pression ² D	Modulation par pic	Largeur pic ² D, s	Intensité pic ² D
1	1	1	-1	8	0,81	1,2 10 ⁶
2	-1	1	1	Aucun pic	ND	ND
3	-1	-1	-1	8	1,2	4,5 10 ⁵
4	1	-1	1	9	0,9	7,4 10 ⁵
5	0	0	0	8	0,63	1,4 10 ⁶
6	0	0	0	9	0,63	2,1 10 ⁶
7	0	0	0	9	0,55	8,1 10 ⁵
8	1	-1	-1	8	3,3	1,2 10 ⁵
9	-1	1	-1	10	0,82	1,9 10 ⁵
10	1	1	1	10	0,4	2,2 10 ⁵
11	0	0	0	10	0,63	1,4 10 ⁵
12	-1	-1	1	Aucun pic	ND	
13	0	-1,63	0	Aucun pic	ND	
14	0	1,63	0	Aucun pic	ND	
15	1,63	0	0	6	0,78	3,7 10 ⁵
16	-1,63	0	0	12	0,47	1,6 10 ⁵
17	0	0	0	8	0,55	3,7 10 ⁵
18	0	0	1,63	Aucun pic	ND	ND
19	0	0	0	8	0,51	3,6 10 ⁵
20	0	0	-1,63	7	3,4	3,8 10 ⁵

Les résultats présentés dans le tableau 3.5 montrent que des changements minimes de paramètres ont une réelle influence sur la modulation au point que dans certains cas plus aucun pic n'est observé. Cependant, pour des répétitions des mêmes facteurs, comme pour les essais 5, 6, et 7, nous observons une variabilité. Pour le moment, les résultats publiés dans la littérature avec ce modulateur ne comportent pas de données sur la variabilité ce qui n'est pas bon signe. Ces premiers travaux méritent donc d'être approfondis.

3.4 Conclusion du chapitre

La description du fonctionnement de la GC $\times$ GC et de ses avantages, espace de séparation plus grand, meilleure limite de détection, organisation des chromatogrammes, a justifié l'intérêt de cette méthode analytique pour l'analyse de l'air expiré. Malgré ces différents avantages, la GC $\times$ GC reste pour l'instant peu utilisée dans ce domaine. Cependant, l'intérêt pour la GC $\times$ GC va croissant comme le montrent les résultats déjà publiés en 2018.

La description de nos contraintes et du mode de fonctionnement des différentes familles de modulateurs a justifié le choix d'une architecture nouvellement décrite dans la littérature basée sur un processus de modulation fluidique. Cette architecture simple et facilement miniaturisable a été reproduite au sein de notre laboratoire et testée avec des mélanges de molécules simples. Le couplage avec une injection par TD a été montré, ainsi que la compatibilité avec des systèmes de GC-MS standard. Une comparaison de cette méthode de GC $\times$ GC à une séparation de GC simple a démontré que ce modulateur permet bien d'augmenter l'espace de séparation. Cela est spécialement utile pour les COV légers présents dans l'air expiré qui sont difficilement modulés avec des modulateurs cryogéniques. Cependant, l'augmentation des RSB semble plus limitée que dans le cas des modulateurs cryogéniques, probablement en raison de l'utilisation du TD.

L'étude de la robustesse du processus de modulation, au moyen de plans d'expériences, a montré que si l'architecture du modulateur est simple, le processus de fonctionnement et d'optimisation du modulateur est complexe. Cependant, une fois les paramètres du modulateur fixés, il serait miniaturisé et destiné à des analyses de routine. Ce modulateur reste encore mal caractérisé. À notre connaissance peu d'études de la variabilité existe. L'utilisation de plans d'expériences pour la nécessaire amélioration des conditions de fonctionnement de ce modulateur semble adaptée au vu de l'interdépendance des différents facteurs impliqués.

4 Utilisation de la GC × GC et du micropréconcentrateur sur des cas réels

4.1 Introduction

Nous avons décrit l'intérêt des μ PC et de la GC × GC dans les deux chapitres précédents, ainsi que les dispositifs mis en place au sein du laboratoire utilisant ces deux techniques. Dans ce chapitre nous illustrerons l'intérêt de ces méthodes pour l'analyse de l'air expiré.

Dans une première partie, nous décrirons les travaux effectués sur une maladie métabolique, la phénylcétonurie. Nous avons analysé l'espace de tête d'urine et l'air expiré d'une patiente. Dans une deuxième partie, nous décrirons l'utilisation du μ PC pour la détection de marqueurs de tabagisme dans l'air expiré de six personnes. Le μ PC servira également pour suivre la cinétique de ces marqueurs chez une personne. Enfin, dans une dernière partie, nous montrerons les travaux effectués pour le développement d'un échantillonneur d'air expiré compatible avec le μ PC.

4.2 Recherche de marqueurs de la phénylcétonurie dans l'air expiré

4.2.1 Introduction

La phénylcétonurie est une anomalie innée du métabolisme héréditaire. Chez les malades, une enzyme du foie, la phénylalanine hydroxylase, fonctionne mal. Cette enzyme permet de transformer la phénylalanine assimilée par la nourriture en tyrosine. Son dysfonctionnement provoque une accumulation de phénylalanine chez les malades et une baisse de la concentration en tyrosine. La phénylalanine en excès est dégradée en molécules toxiques pour le système nerveux qui entraînent des retards de développement chez les enfants non traités. Ces métabolites constituent également des marqueurs très spécifiques à cette maladie. Les faibles concentrations en tyrosine sont également néfastes pour les malades.

La phénylcétonurie est systématiquement dépistée en France chez les nouveau-nés. Le traitement consiste en un régime alimentaire extrêmement pauvre en phénylalanine jusqu'à l'adolescence. C'est un régime très stricte qui peut provoquer des carences. Cela nécessite un suivi très régulier des concentrations en phénylalanine mais également des concentrations d'autres acides aminés. Si le traitement est bien suivi, les personnes phénylcétonuriques ne présentent pas de retards de développement. Une fois l'adolescence terminée, le régime

alimentaire est moins stricte et les concentrations des marqueurs augmentent alors dans le sang et l'urine des malades.

La grossesse chez une femme phénylcétonurique nécessite également un régime alimentaire très strict. Les taux de phénylalanine ne doivent pas être trop élevés pour éviter l'apparition de métabolites toxiques pour le fœtus. Cependant les taux doivent également être assez élevés pour éviter des carences chez la mère qui entraîneraient un retard de développement du fœtus. Un contrôle strict des concentrations en phénylalanine, tyrosine et des métabolites est donc indispensable et nécessite des analyses très régulières. Une analyse qui permettrait d'assurer le suivi de ces composés dans l'air expiré durant l'enfance et la grossesse pourrait donc présenter un intérêt pour faciliter ce suivi.

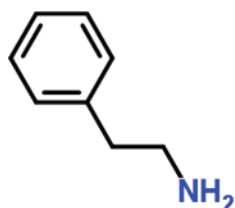
Cette maladie présente plusieurs avantages dans notre cas. Tout d'abord, ses marqueurs sont décrits, spécifiques à cette maladie et les voies métaboliques sont élucidées. Les marqueurs sont connus pour donner une odeur aux malades, ce qui laisse penser qu'ils sont plutôt volatils, et leurs concentrations dans le sang et l'urine sont relativement élevées. Enfin, nos partenaires au CHU de Grenoble suivent des personnes atteintes de phénylcétonurie. Ces différents marqueurs peuvent être utilisés pour le suivi des malades, ce qui est également plus simple. Malgré ces avantages, les résultats que nous présentons dans la suite de cette partie sont peu concluants.

Nous commencerons par décrire rapidement les marqueurs et nous montrerons que l'analyse de ces composés demande la mise en place d'une méthode analytique dédiée. À la suite de cette description, nous présenterons les résultats obtenus pour vérifier la compatibilité des μ PC avec l'analyse de ces marqueurs et quelques résultats d'analyse d'échantillons d'urine et d'air expiré d'une personne atteinte de phénylcétonurie.

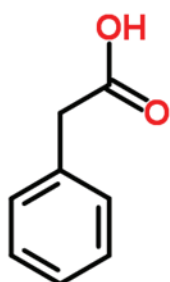
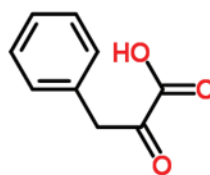
4.2.2 Structure des marqueurs

Quatre marqueurs de la phénylcétonurie sont décrits dans la littérature. La figure 4.1 présente la structure de ces quatre composés.

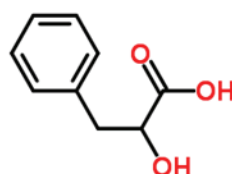
Phénéthylamine



Acide phénylpyruvique



Acide phénylacétique



Acide phényllactique

Figure 4.1. Structure et nom des quatre marqueurs de la phénylcétonurie

Le tableau 4.1 présente les numéros CAS, ainsi que les pKa les températures d'ébullition et les masses molaires de ces molécules.

Tableau 4.1. CAS, pKa et température d'ébullition des quatre marqueurs de la phénylcétonurie

	CAS	pKa	Teb, °C	Masse molaire
Phénéthylamine	64-04-0	9,8	200 °C	121,2 g/mol
Acide phénylpyruvique	156-06-9	3,3	ND	164,2 g/mol
Acide phénylacétique	103-82-2	4,3	265 °C	136,2 g/mol
Acide phényllactique	828-01-3	4	327 °C	166,2 g/mol

La présence de fonctions acides et amines dans la structure de ces composés ainsi que leurs températures d'ébullition laisse penser que ces molécules sont difficilement analysables en GC. Cependant, des spectres de masse existent pour ces quatre composées dans la base de données du NIST [304]. Dans la partie suivante, nous tenterons de déterminer s'il est possible d'analyser ces molécules par GC-MS en utilisant une chimie de colonne adaptée.

4.2.3 Analyse des marqueurs purs

4.2.3.1 Analyse par GC

Les molécules polaires qui contiennent des groupements acides ou amines sont complexes à analyser par GC. En effet, les groupements acides et amines forment des interactions secondaires de type liaisons hydrogène avec la phase stationnaire. Cela a comme conséquence de déformer les pics. De plus, la formation de liaisons hydrogène entre les molécules augmente la température d'ébullition des composés ce qui les rend plus difficiles à analyser par GC.

Des techniques de dérivation sont utilisées pour limiter ces problèmes. Brièvement, un agent de dérivation réagit avec les composés acides. Généralement, ces agents de dérivation permettent de greffer des silanes peu polaires sur les fonctions incriminées. Ce greffage masque les fonctions acides et amines des molécules et empêche la formation de liaisons hydrogènes. Les nouveaux composés formés possèdent alors des températures d'ébullition plus faibles et forment moins d'interactions secondaires avec la phase stationnaire. Cette étape de dérivation prend du temps et apporte de la variabilité aux résultats. De plus, les agents de dérivation sont des produits souvent toxiques. Cette méthode reste cependant très utilisée dans le milieu hospitalier.

Nous avons effectué des premières analyses de ces marqueurs par GC-MS en utilisant une colonne qui contient une phase stationnaire à base de polymère de silphenylene équivalent à une chimie 5% diphényle / 95% diméthyle polysiloxane. Ces résultats confirment la difficulté d'analyser les marqueurs acides de la phénylcétonurie directement par GC. Les chromatogrammes obtenus lors de l'injection des molécules à 100 ppm dans l'acétone sont montrés dans la figure 4.2, la figure 4.3 et la figure 4.4.

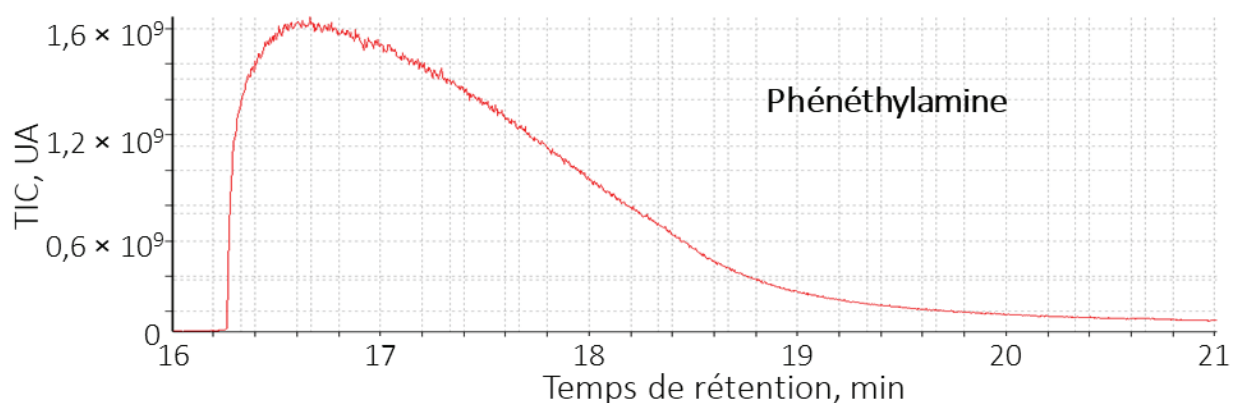


Figure 4.2. Pic de phényéthylamine obtenu avec la colonne 5ms. MS 4 Hz, 30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m, 50 °C pendant 1 min, 20 °C/ min jusqu'à 300 °C

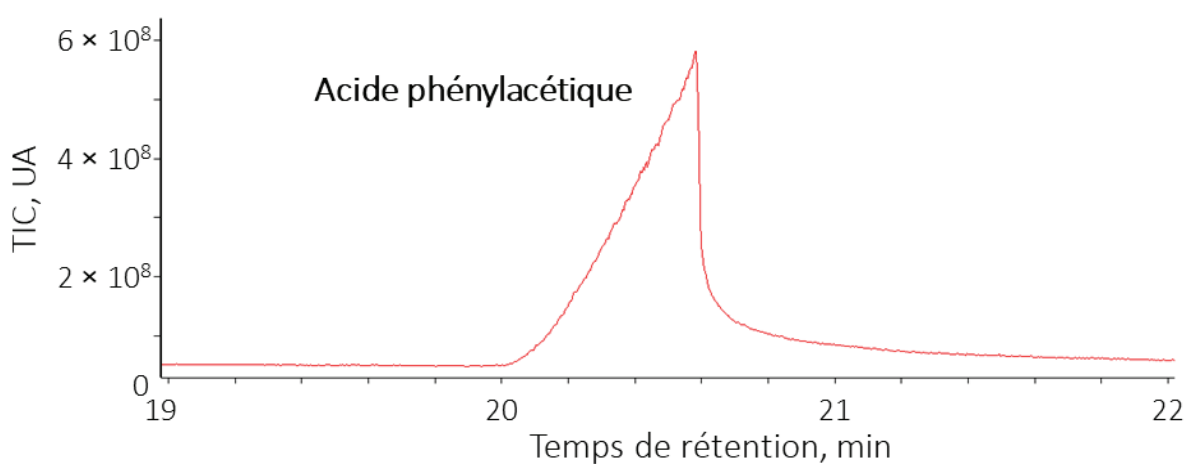


Figure 4.3. Pic d'acide phénylacétique obtenu avec la colonne 5ms. MS 4 Hz, 30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m, 50 °C pendant 1 min, 20 °C/ min jusqu'à 300 °C

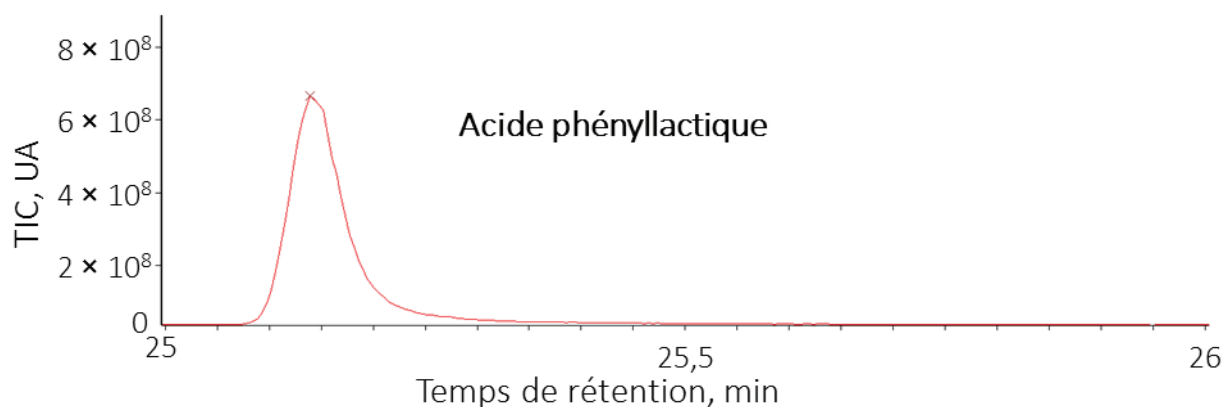


Figure 4.4. Pic d'acide phényllactique obtenu avec la colonne 5ms. MS 4 Hz, 30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m, 50 °C pendant 1 min, 20 °C/ min jusqu'à 300 °C

Le pic de phényéthylamine traîne beaucoup. Le pic d'acide phénylacétique présente une forme caractéristique des acides analysés directement en GC avec un *fronting* marqué. Étrangement

le pic d'acide phényllactique est symétrique. Cependant, le spectre de masse obtenue pour l'acide phényllactique ne correspond pas tout à fait à celui présent dans la base de données NIST. L'acide phénylpyruvique n'a pas pu être détecté dans ces conditions. Lors de l'injection de cette molécule, un pic est observé, mais le spectre de masse observé ne correspond pas à celui du NIST.

Une colonne de chimie FFAP, c'est-à-dire du polyéthylèneglycol modifié à l'acide nitrotéréphthalique, a été testée. Cette chimie de colonne polaire est spécialement prévue pour l'analyse des composés acides. Les pics obtenus pour la phénéthylamine, l'acide phénylacétique et l'acide phényllactique sont montrés respectivement dans la figure 4.5, la figure 4.6 et la figure 4.7.

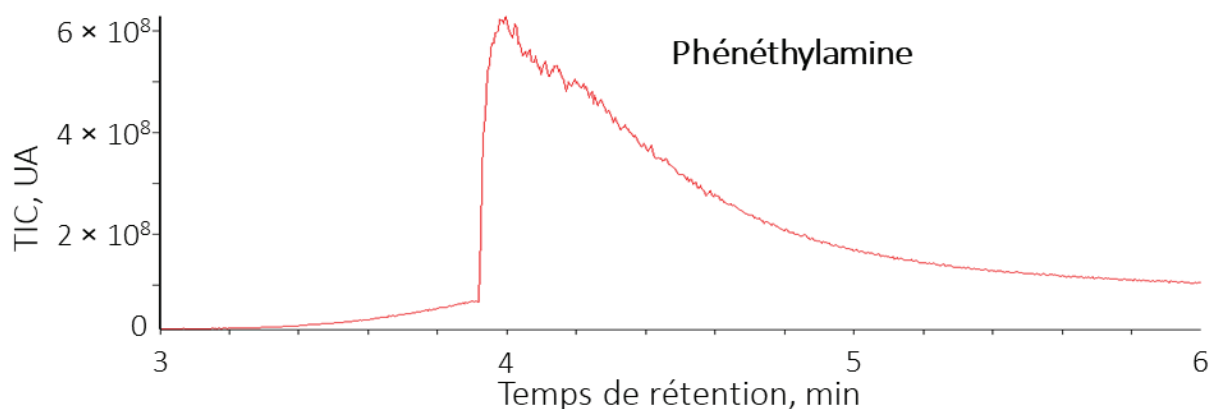


Figure 4.5. Pic de phénéthylamine obtenu avec une colonne FFAP. MS 4 Hz, 30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m, 50 °C pendant 1 min, 20 °C/ min jusqu'à 250 °C

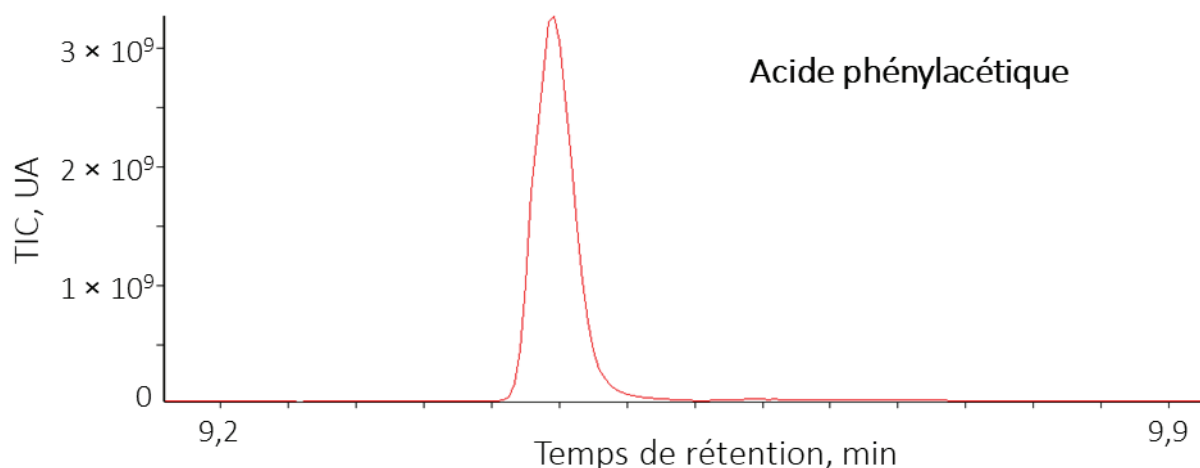


Figure 4.6. Pic d'acide phénylacétique obtenu avec une colonne FFAP, MS 4 Hz, 30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m, 50 °C pendant 1 min, 20 °C/ min jusqu'à 250 °C

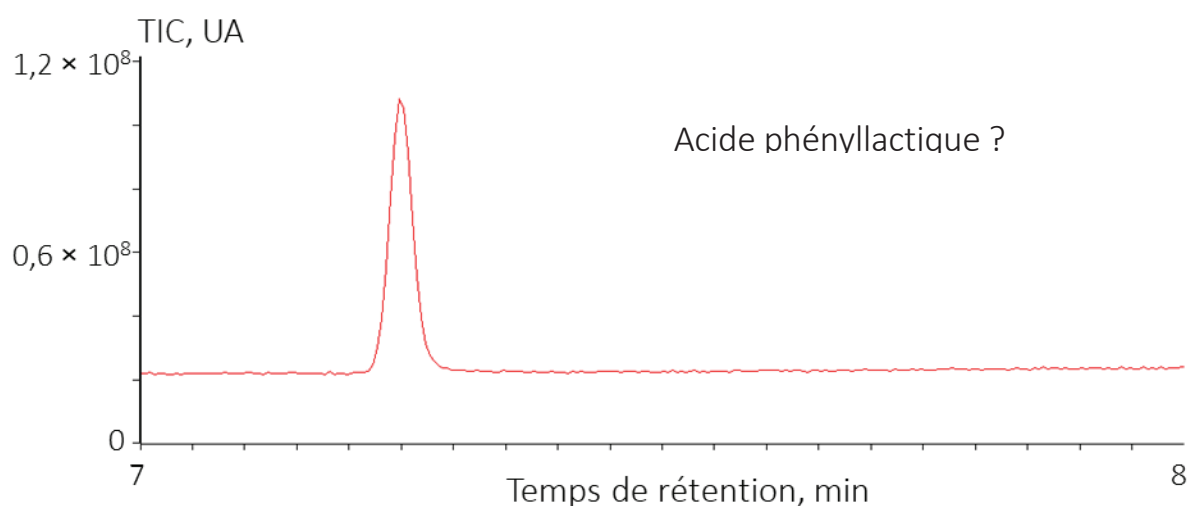


Figure 4.7. Pic obtenue pour l'injection d'un standard d'acide phényllactique avec une colonne FFAP, MS 4 Hz, 30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m, 50 °C pendant 1 min, 20 °C/ min jusqu'à 250 °C

La colonne FFAP ne permet pas d'améliorer la forme du pic de phénéthylamine. En revanche, la forme du pic de l'acide phénylacétique est nettement améliorée par l'utilisation d'une colonne FFAP.

Le temps de rétention de l'acide phényllactique est, quant à lui, étrange. En effet, au vu de la structure de la molécule, elle semble plus polaire que l'acide phénylacétique. Les coefficients de partage octanol/eau de ces molécules ne sont pas disponibles dans la littérature pour confirmer cette observation de la structure chimique. Cependant, le temps de rétention de l'acide phényllactique est inférieur au temps de rétention de l'acide phénylacétique. De plus, le spectre de masse obtenu est différent du spectre de masse proposé dans NIST. Ce dernier est présenté dans la figure 4.8 et le spectre de masse obtenu expérimentalement et

correspondant au pic présenté dans le chromatogramme de la figure 4.7 est présenté dans la figure 4.9.

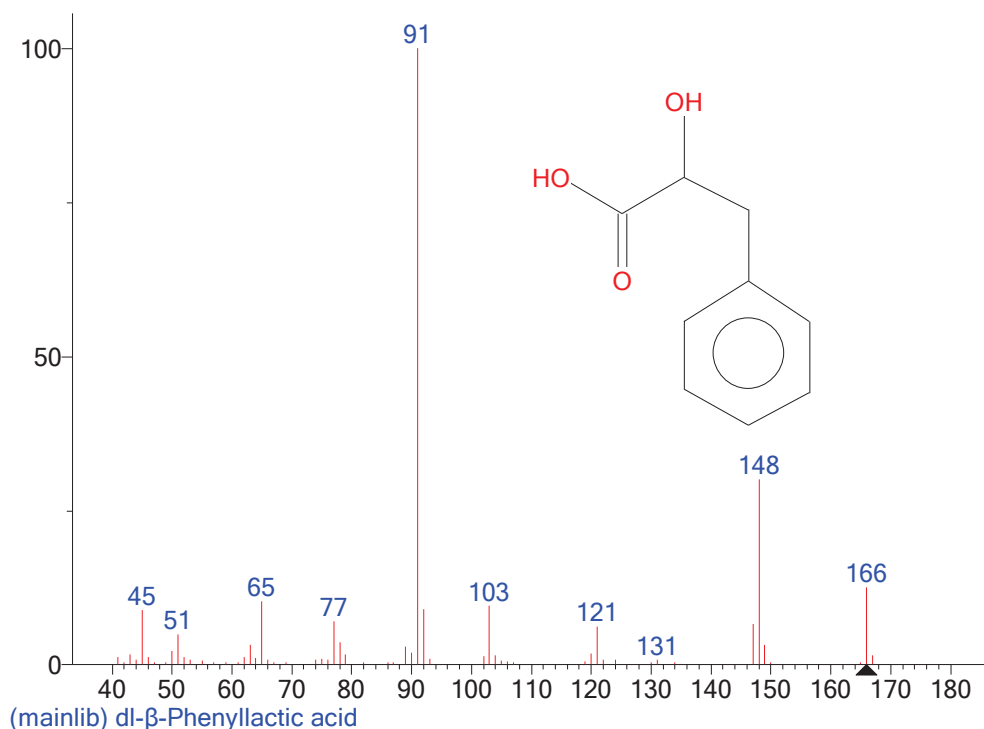


Figure 4.8. Spectre de masse obtenu par EI à 70 eV de l'acide phényllactique dans le NIST

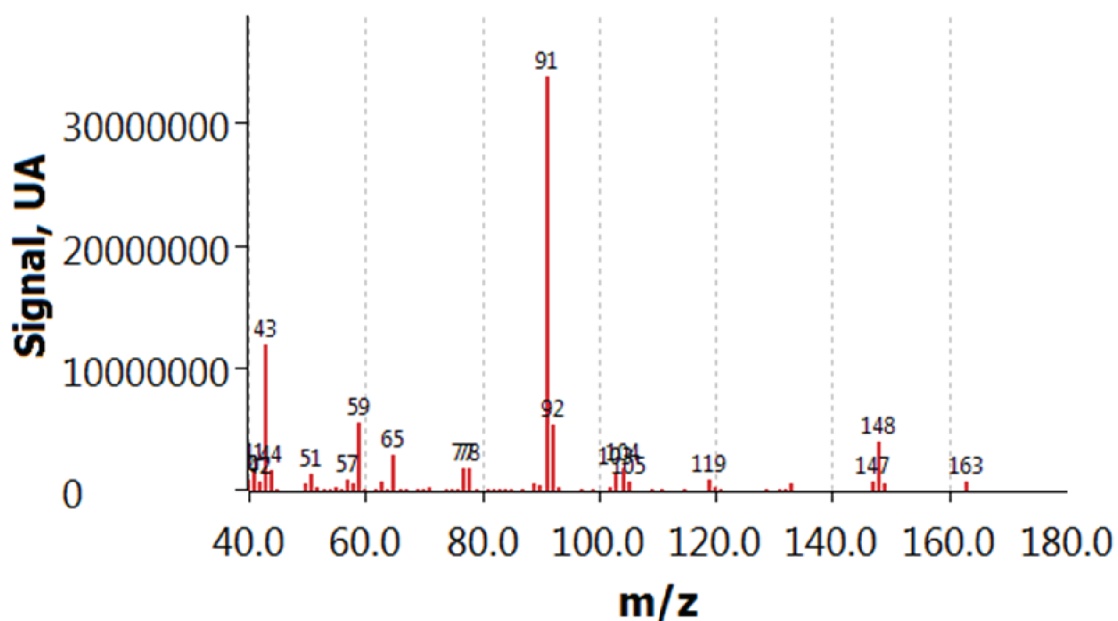


Figure 4.9. Spectre de masse expérimental obtenu pour une injection d'acide phényllactique au laboratoire

La différence entre les deux spectres de masse se situe principalement au niveau de la masse 166. Elle correspond à l'ion moléculaire et est absente du spectre de masse expérimentale. L'ion 121 est également absent du spectre expérimental alors qu'il est présent dans le spectre

de la base de données. Au vu de la forme du pic de la phénéthylamine et du spectre de masse étrange de l'acide phényllactique, nous nous sommes concentrés sur l'acide phénylacétique pour les expériences suivantes.

4.2.3.2 Essais d'analyse des marqueurs par GC $\times$ GC

Le système de GC $\times$ GC décrit dans le chapitre 3 a également été utilisé pour analyser l'acide phénylacétique. Un chromatogramme obtenu en utilisant une colonne 5ms en 1D et une colonne WAX en 2D est montré dans la figure 4.10. Il montre plus précisément le pic d'acide phénylacétique à 46 min. L'injection est réalisée en injectant 1 μ l d'une solution d'acétone à 10 ppm. Les conditions d'analyse sont précisées dans la légende du chromatogramme.

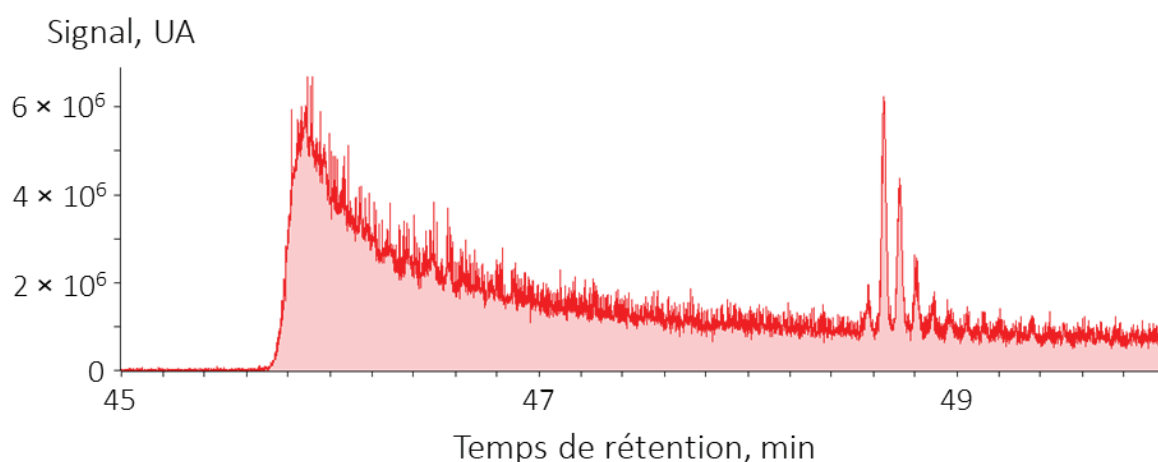


Figure 4.10. Chromatogramme 1D modulé du rapport $m/z = 91$ montrant le pic d'acide phénylacétique obtenu avec le jeu de colonne 5ms, WAX. Modulation et MS, voir chapitre 3, gradient : 50 °C 1 min, 5 °C/min jusqu'à 230 °C, 230 °C pendant 15 min

Le pic d'acide phénylacétique, vers 46 min, est complètement déformé, comme nous pouvions nous y attendre. Sur le chromatogramme, un autre pic non identifié vers 48,6 min, est convenablement modulé et montre bien la mauvaise modulation du pic d'acide phénylacétique. En effet, les colonnes de type 5ms en 1D et de type WAX en 2D ne sont pas adaptées pour analyser des molécules acides. Nous avons d'abord utilisé ce jeu de colonnes car il était monté sur le système de modulation.

Pour tenter d'améliorer ces résultats, la colonne de 2D a été remplacée par une colonne de chimie FFAP. Un chromatogramme obtenu pour l'acide phénylacétique est présenté dans la figure 4.11.

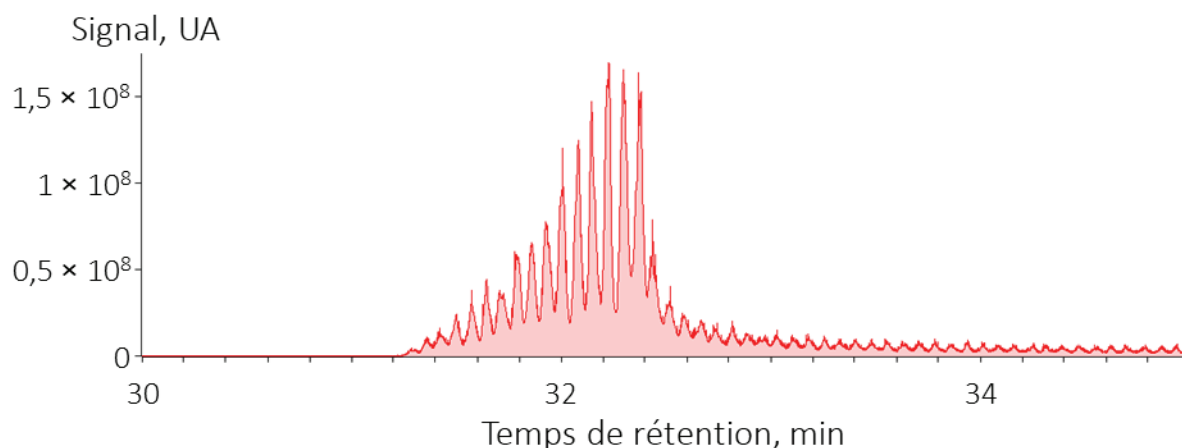


Figure 4.11. Chromatogramme 1D modulé du rapport $m/z = 91$ montrant le pic d'acide phénylacétique obtenue avec le jeu de colonne 5ms, FFAP. Pression et MS, voir chapitre 3, gradient : 70 °C, 5 °C/min jusqu'à 230 °C ; 230 °C pendant 15 min

Remplacer la colonne WAX par une colonne FFAP, permet d'améliorer la forme des pics 2D , comme le montre la comparaison entre la figure 4.10 et la figure 4.11. Cependant, la forme des pics de deuxième dimension n'est tout de même pas satisfaisante pour cette molécule car l'utilisation de la colonne FFAP ne permet pas de compenser l'élargissement des pics entraîné par la 1D . De plus, les pics 2D restent mal résolus, ce qui peut également provenir de la boucle d'échantillonnage du modulateur.

Nous pouvons également remarquer que le temps de rétention 1D change entre les deux expériences car le gradient a été modifié entre les deux expériences. En effet, dans les conditions de la première expérience, les premiers pics étaient observés à partir de 10 min environ.

En utilisant la GC × GC, les pics de l'acide phénylacétique sont déformés, ce qui aura un impact négatif sur les RSB. L'utilisation du système de GC × GC pour l'analyse des marqueurs de la PCU ne semble pas apporter un avantage pour ces types de molécules. De manière générale, la GC × GC n'est pas justifiable pour la recherche d'un seul pic, à part pour l'augmentation du RSB. Comme notre modulateur n'améliore pas les RSB, il est donc judicieux de rester en 1D pour cette analyse.

4.2.4 Prélèvement sur Tenax

4.2.4.1 Influence du micropréconcentrateur sur la forme des pics

Les molécules acides forment des interactions secondaires. Nous avons d'abord vérifié si les μPC permettaient de préconcentrer et d'injecter ces composés tout en conservant des

formes de pics acceptables. En effet, l'efficacité de l'injection pourrait être dégradée à cause de la formation d'interactions secondaires entre l'acide phénylacétique et un ou plusieurs des composants du μ PC : capillaires, raccords, puces et adsorbant.

Nous avons utilisé l'injecteur liquide du four de GC avec le montage schématisé dans la figure 4.12 pour doper les μ PC avec les marqueurs.

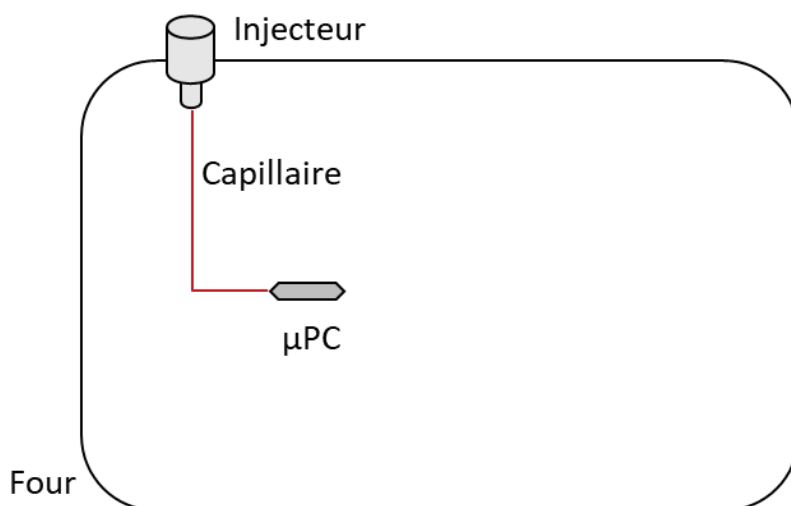


Figure 4.12. Schéma du montage utilisé pour doper les μ PC avec l'injecteur liquide

1 μ l d'une solution d'acide phénylacétique à 10 ppm dans l'acétone est injecté avec l'injecteur liquide pour doper le μ PC. Le contenu du μ PC est ensuite injecté dans le système de GC-MS comme lors d'une injection normale avec le système Primosamp. Le chromatogramme obtenu lors de l'injection du contenu d'un μ PC dopé avec de l'acide phénylacétique est montré dans la figure 4.13.

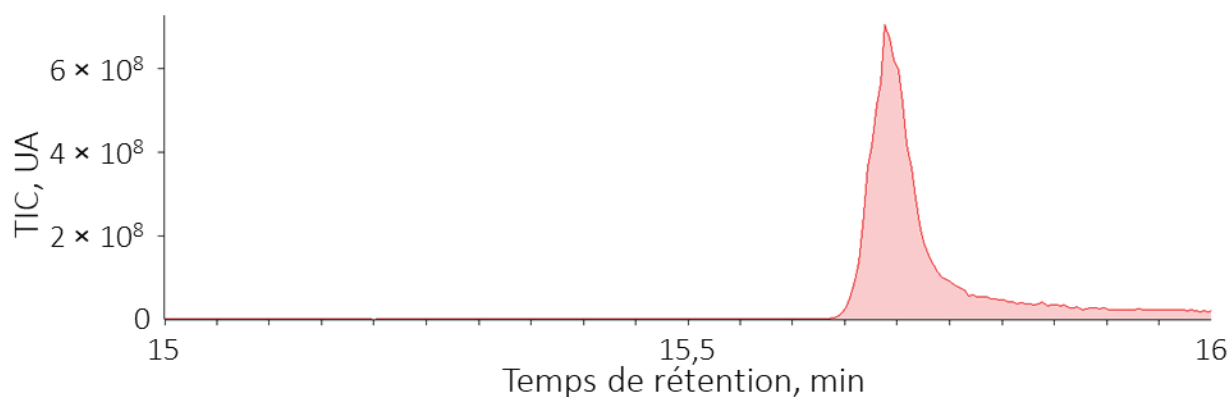


Figure 4.13. Chromatogramme ionique extrait, $m/z = 91$, montrant le pic d'acide phénylacétique obtenu avec le μ PC après dopage avec l'injecteur liquide. MS : 4 Hz, Colonne FFAP, 15 m ; 0,25 mm, 0,250 μ m, gradient : 50 $^{\circ}$ C 1 min, 10 $^{\circ}$ C/min jusqu'à 230 $^{\circ}$ C

La largeur à mi-hauteur du pic vaut environ 3 s ce qui correspond à peu près à la largeur à mi-hauteur du pic montré dans la figure 4.6 obtenue avec l'injecteur split. Cependant, l'utilisation du μ PC provoque une traîne du pic, le retour à la ligne de base ne se fait pas bien. Cela peut être lié à l'existence d'interactions secondaires entre un des constituants de la cartouche qui ne sont pas désactivés, capillaire en nickel, silicium, verre, raccord en acier inoxydable, et l'acide phénylacétique.

4.2.4.2 Étude du volume de fuite

La figure 4.14 présente un schéma du montage utilisé pour étudier le volume de fuite de l'acide phénylacétique sur une puce de Tenax. La température du four est fixée à 50 °C et l'injecteur impose un débit constant de 1,3 ml/min pendant toute l'expérience, même après l'injection.

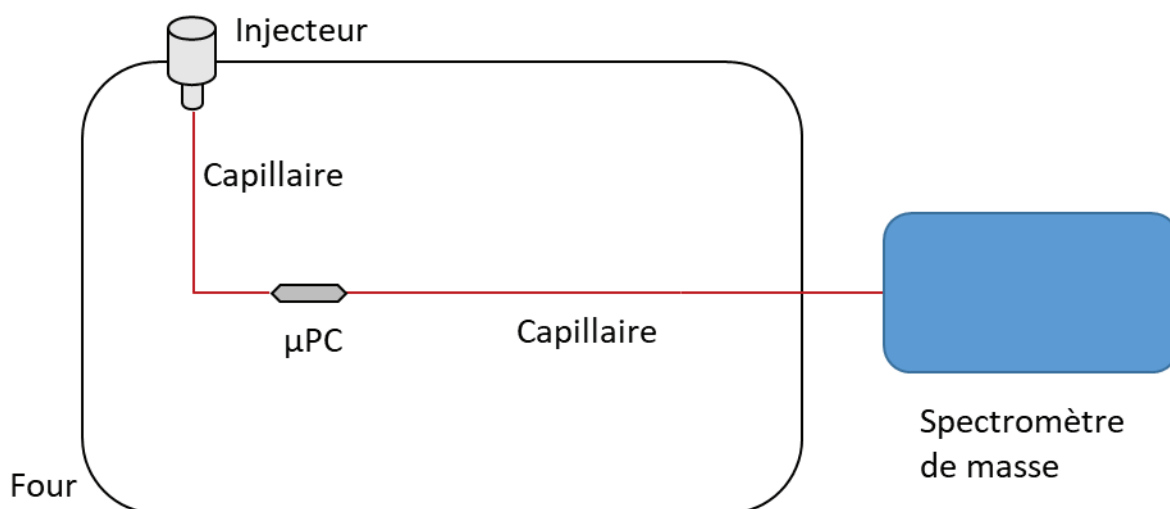


Figure 4.14. Schéma du montage utilisé pour déterminer le volume de fuite de l'acide phénylacétique sur le μ PC

Ce montage permet d'étudier en temps réel ce qui sort du μ PC. Le capillaire entre le μ PC et le spectromètre de masse a la même perte de charge qu'une colonne de 15 m de long et de 0,25 mm de diamètre interne. Un volume important, 1 μ l, à une concentration importante, 1000 ppm, est volontairement injecté pour pouvoir détecter facilement la fuite éventuelle du composé. La figure 4.15 montre le signal obtenu et justifie que le volume de fuite de l'acide phénylacétique n'est pas dépassé durant cette expérience.

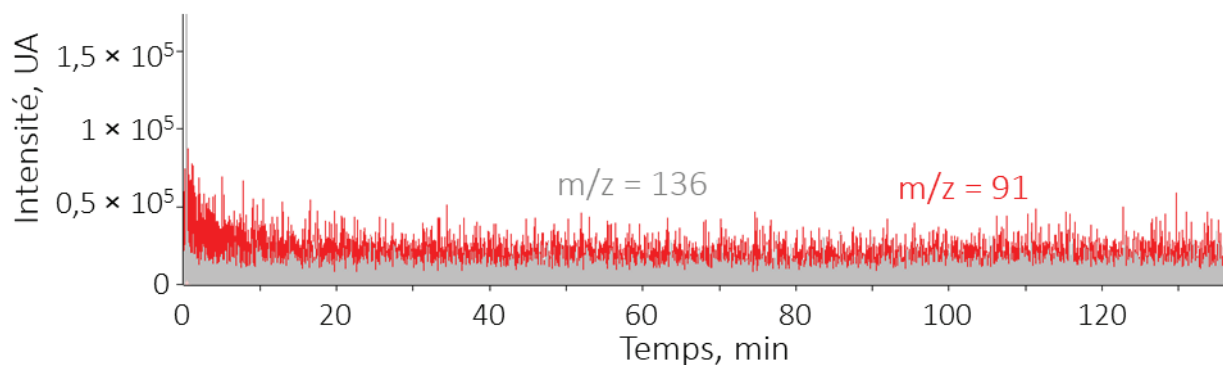


Figure 4.15. Signal au cours du temps des ions 91 et 136 après dopage du μ PC pour déterminer la fuite de l'acide phénylacétique

Afin de vérifier que l'acide phénylacétique n'a pas fui du μ PC pour condenser sur le capillaire ou n'est pas resté bloqué dans le capillaire situé entre la puce et l'injecteur, le μ PC est démonté et une analyse est lancée en connectant les deux capillaires. La figure 4.16 montre le signal obtenu lors de cette analyse.

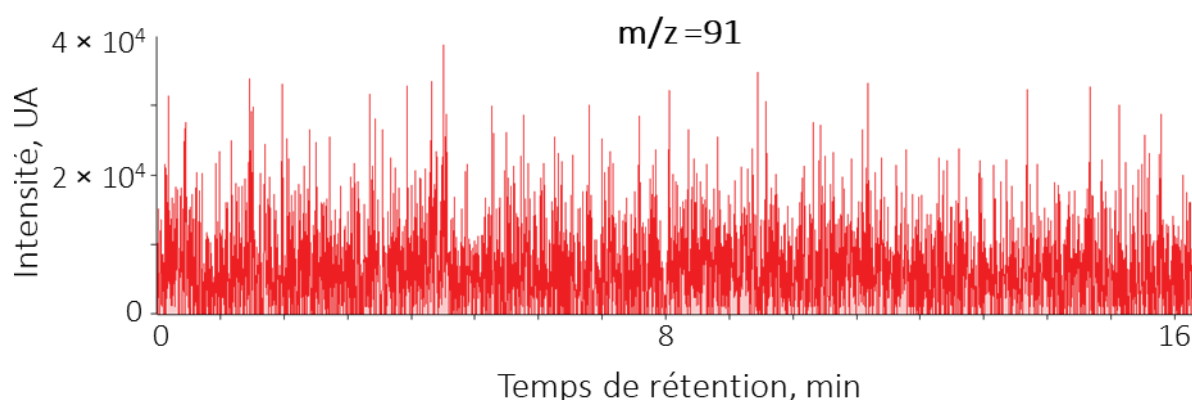


Figure 4.16. Signal obtenu lors de l'application d'un gradient sur le système utilisé pour la détermination du volume de fuite après démontage du μ PC MS : 4 Hz, Colonne FFAP, 15 m ; 0,25 mm, 0,250 μ m. gradient : 50 °C 1 min, 20 °C/min jusqu'à 230 °C

Le débit vaut 1,3 ml/min dans l'expérience de la figure 4.15, ce qui signifie qu'en 136 min, environ 180 ml d'hélium sont passés à travers le μ PC sans que l'acide phénylacétique soit détecté en sortie. Le μ PC contient environ 2 mg de Tenax. Le volume de fuite de l'acide phénylacétique est donc supérieur à 90 ml/mg à 50 °C.

Un prélèvement d'un échantillon réel s'effectue à température ambiante, ce qui signifie que le volume de fuite sur le Tenax n'est pas un problème car il sera bien supérieur à 90 ml/mg.

4.2.5 Test sur des échantillons réels d'urine

L'urine est une des voies d'excrétion des marqueurs chez les personnes atteintes de phénylcétonurie. La concentration des marqueurs dans l'urine est plutôt élevée, aux

alentours de la centaine de milligrammes par litre. L'analyse des acides urinaires est également un des tests de référence. L'hôpital possède ainsi des échantillons d'urine au congélateur facilement disponible pour nous. Travailler sur l'analyse d'urine nous permettrait également de tester Primosamp sur d'autres matrices que l'air expiré. Nous avons donc décidé de rechercher également les marqueurs dans l'espace de tête de l'urine de personnes phénylcétonuriques.

4.2.5.1 Étude de l'espace de tête d'une solution d'eau dopée

Pour étudier l'intérêt d'analyser l'acide phénylacétique dans l'espace de tête d'urine, nous avons commencé par analyser l'espace de tête d'une solution d'eau pure dopée avec de l'acide phénylacétique à différentes concentrations. Pour ces expériences, nous avons utilisé le système Primosamp et les μ PC. 20 ml d'eau pure dopée sont chauffés dans un bécher de 25 ml à 40 °C grâce à une plaque chauffante et le système Primosamp est fixé de manière à placer l'entrée de la cartouche juste au-dessus du bécher. Nous avons prélevé l'espace de tête pendant 10 min à un débit de 25 ml/min et le contenu du μ PC est ensuite analysé par GC-MS.

L'aire de l'ion 91 est utilisée pour la quantification et l'ion 136 est utilisé comme ion de confirmation en plus du temps de rétention. Une courbe de calibration obtenue pour ces manipulations pour des concentrations d'acide phénylacétique comprises entre 0,1 g/l et 0,65 g/l est montrée dans la figure 4.17.

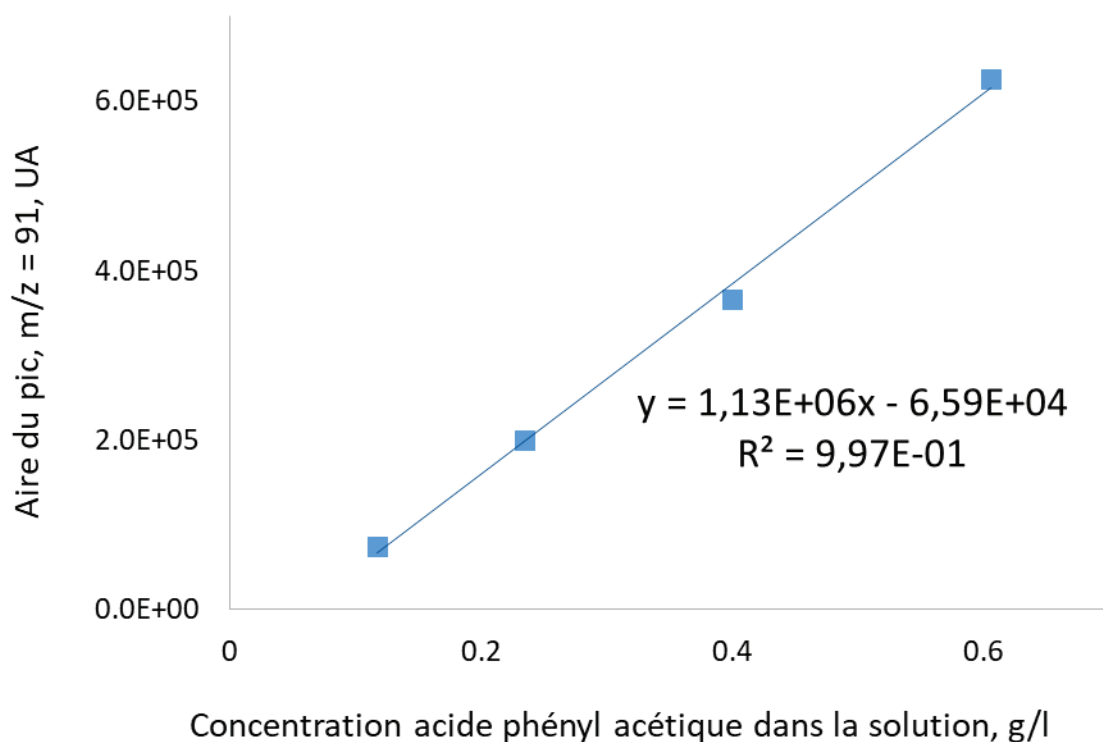


Figure 4.17. Courbe d'étalonnage pour l'analyse de l'espace de tête d'une solution dopée avec de l'acide phénylacétique

Le chromatogramme obtenu pour l'analyse de l'espace de tête de la solution à 0,11 g/l est montré dans la figure 4.18.

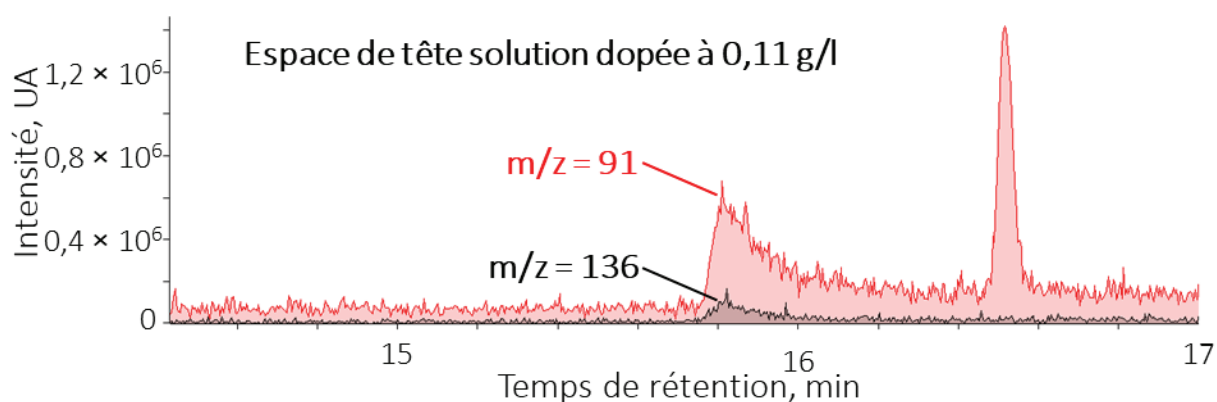


Figure 4.18. Chromatogrammes extraits des ions 136 et 91 montrant le pic d'acide phénylacétique obtenu pour l'analyse de l'espace de tête d'une solution dopée. Colonne FFAP, 15 m ; 0,25 mm, 0,250 μ m. gradient : 50 °C 1 min, 10 °C/min jusqu'à 230 °C, MS : 4 Hz,

La courbe d'étalonnage montre que l'analyse quantitative de l'acide phénylacétique dans une solution est possible en prélevant l'espace de tête de cette solution chauffée à 40 °C. Cette

courbe de calibration montre également qu'il est possible d'effectuer des analyses quantitatives avec le μ PC.

Le chromatogramme de la figure 4.18 montre que la limite de détection dans ces conditions vaut environ 0,1 g/l. En effet le RSB du pic de l'ion de confirmation vaut environ 3 pour l'analyse de l'espace de tête de la solution à 0,11 g/l.

Le chromatogramme de la figure 4.18 montre également que la forme du pic de l'acide phénylacétique dégrade les limites de détection. La faible intensité des pics rend ce phénomène spécialement visible. La base du pic traîne beaucoup, comme le montre le non-retour à la ligne de base, spécialement visible pour l'ion 91.

Malgré l'utilisation d'une colonne FFAP, le pic est déformé en utilisant le μ PC et cela est spécialement visible pour les signaux peu intenses. Cette traîne des pics peut provenir des raccords utilisés dans la cartouche, ou bien des capillaires utilisés dans le μ PC ou bien des matériaux utilisés pour fabriquer le μ PC.

4.2.5.2 Analyse d'un échantillon réel d'urine

Les premières expériences ont été effectuées par prélèvement sur tube de TD et analysé par GC × GC-MS. En effet, à ce moment de la thèse nous n'avions pas encore analysé l'effet de la GC 2D sur les RSB et nous voulions utiliser du matériel de laboratoire pour les premières expériences. Nous n'avions encore jamais utilisé Primosamp en dehors du laboratoire à ce moment-là de la thèse. La figure 4.19 montre le chromatogramme 2D obtenue pour cette expérience

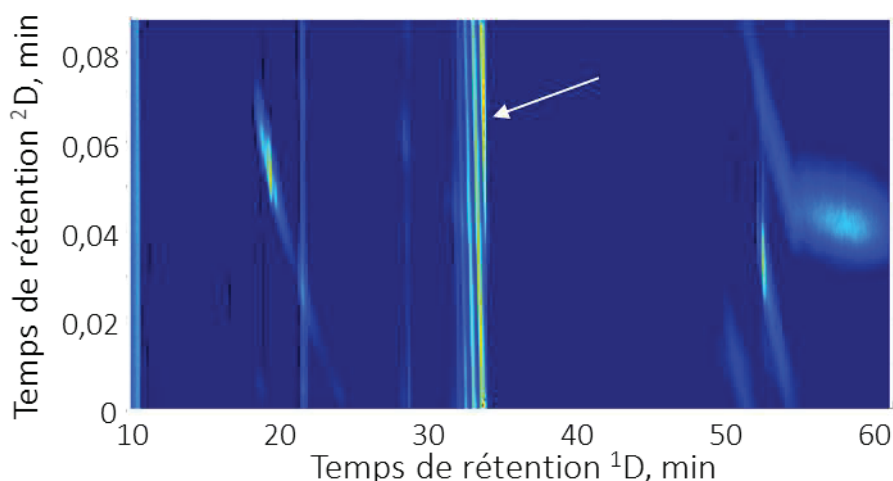


Figure 4.19. Chromatogramme 2D de l'espace de tête d'urine d'une patiente phénylcétonurique, prélevé avec un tube et de TD et analysé par GC $\times$ GC-MS. prélèvement, 10 min à 100 ml/min

Le pic indiqué par une flèche correspond à l'acide phénylacétique. Ce pic est très large dans la 1D et, malgré l'utilisation de la colonne FFAP en 2D , la modulation ne s'effectue pas correctement. C'est suite à ce premier résultat obtenu sur des tubes de TD que nous avons effectué les travaux présentés auparavant sur les volumes de fuites et l'analyse de l'espace de tête d'une solution dopé en utilisant le μPC .

Suite à ces premiers résultats, nous avons effectué une autre campagne d'échantillonnage au CHU de Grenoble en utilisant des μPC . L'espace de tête d'un échantillon d'urine d'une patiente phénylcétonurique a été prélevé en utilisant un μPC . La durée de la percolation est de 20 min et correspond à 560 ml. L'échantillon est chauffé à 40 °C pendant le prélèvement au moyen d'une plaque chauffante. Le chromatogramme obtenu est montré dans la figure 4.20.

Aucun pic correspondant à l'acide phénylacétique n'a pu être détecté dans ce chromatogramme dans les conditions utilisées.

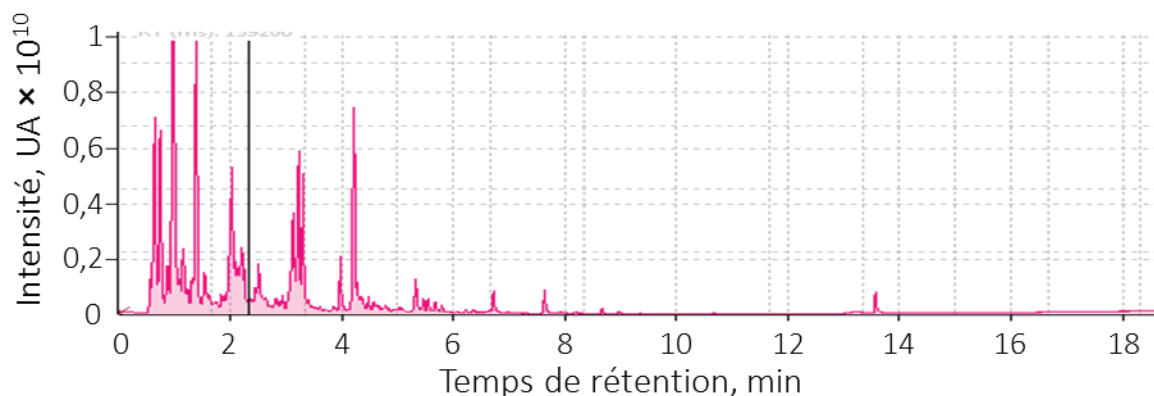


Figure 4.20. Chromatogramme de l'espace de tête d'une urine de personne phénylcétonurique obtenue par prélèvement sur le μ PC. MS : 4 Hz, GC : FFAP, Colonne FFAP, 15 m ; 0,25 mm, 0,250 μ m. gradient : 50 °C 1 min, 10 °C/min jusqu'à 230 °C

Le pic d'acide phénylacétique est très intense avec le tube de TD et l'analyse par GC × GC-MS. Cela ne rend que plus étrange l'absence de ce pic dans le chromatogramme obtenu par GC-MS avec le μ PC, d'autant plus que le temps de prélèvement est plus important avec ce dernier.

4.2.6 Test sur échantillons d'air expiré d'une malade

4.2.6.1 Influence du prélèvement sur sac Tedlar

En l'absence de système de prélèvement spécifique, l'air expiré des malades est prélevé dans des sacs Tedlar avant d'être préconcentré sur les μ PC. De nombreuses molécules sont extrêmement sensibles au stockage dans les sacs Tedlar et peuvent se dégrader ou s'adsorber sur les parois du sac [305,306]. De plus lors, d'expériences préliminaires nous avons constaté que des gouttes d'eau se formaient par condensation dans l'air. La structure de l'acide phénylacétique laisse penser que c'est une molécule très hydrophile qui peut être solvaté dans les gouttelettes d'eau qui se forment dans le sac Tedlar. La molécule peut également réagir.

Nous avons donc effectué des expériences pour étudier l'influence du sac Tedlar lui-même et de l'humidité contenue dans l'air expiré sur le prélèvement dans un sac Tedlar. Pour cela, 1 μ l d'une solution d'acide phénylacétique à 1 ppm dans l'acétone est injecté par voie liquide en GC-MS et deux sacs Tedlar contenant respectivement de l'air sec et de l'air expiré sont également dopés avec cette même quantité d'acide phénylacétique. Le contenu de ces sacs est ensuite transféré intégralement sur des tubes de TD en reliant le sac et le tube avec un

bout de tuyau en teflon et injecté en GC-MS. La figure 4.21 montre les pics d'acide phénylacétique obtenus dans les trois cas.

Les chromatogrammes ioniques extraits de la masse 91 sont présentés pour les trois expériences. La méthode de GC-MS est identique dans les trois cas, mais une différence de temps de rétention est observée en raison de la ligne de transfert de l'injecteur par TD qui se situe en dehors du four. La colonne est directement connectée à l'injecteur liquide lorsque ce dernier est utilisé. Deux fois moins de matière est injectée avec l'injecteur liquide qu'avec le système de TD en raison de la différence de split, 10 ml/min pour le TD et 20 ml/min pour l'injecteur liquide.

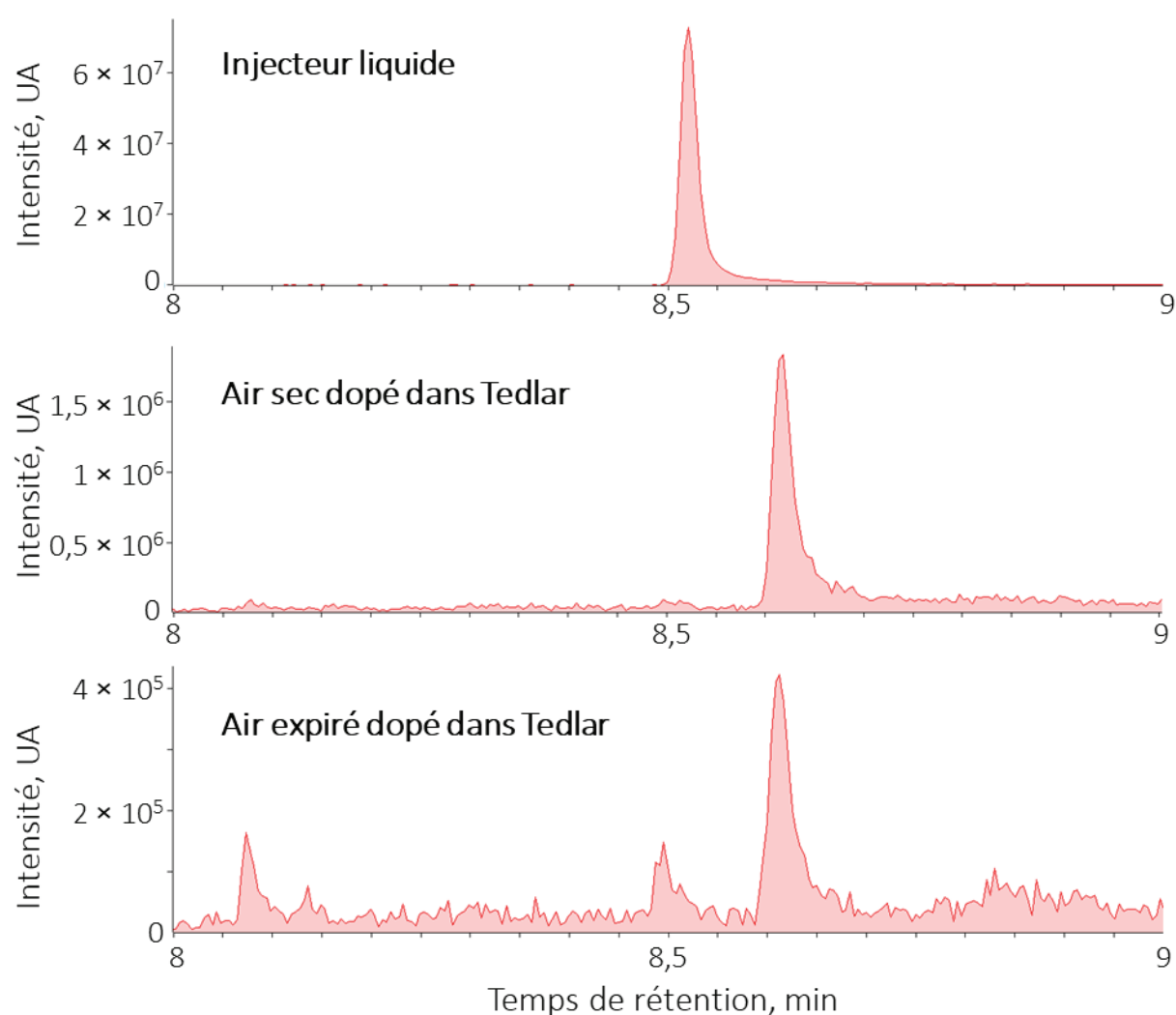


Figure 4.21. Comparaison de l'intensité du pic d'acide phénylacétique, $m/z = 91$, obtenue pour l'injection de la même quantité avec l'injecteur liquide, dopé dans un sac Tedlar contenant de l'air sec ou de l'air expiré, MS : 4 Hz, Colonne FFAP, 15 m ; 0,25 mm, 0,250 μ m. Gradient : 50 °C 1 min, 20 °C/min jusqu'à 230 °C

Nous pouvons observer dans la figure 4.21 que le signal est moins intense pour le sac Tedlar contenant de l'air expiré d'environ un facteur 4 par rapport au sac qui contient de l'air sec et d'environ un facteur 100 par rapport à l'injecteur liquide. Le signal obtenu pour le sac Tedlar dopé avec de l'air sec est plus intense, mais reste moins intense que le signal obtenu avec l'injecteur liquide. L'humidité contenue dans l'air expiré semble influencer négativement la récupération de l'acide phénylacétique. Ces résultats justifient l'utilisation de systèmes adaptés pour le prélèvement de l'air expiré qui n'impliquent pas l'utilisation de sac Tedlar. Tester d'autres types de sacs réalisés à partir d'autres matériaux semble également intéressant.

4.2.6.2 Analyse de l'air expiré d'une malade

Malgré les résultats qui montrent les limites de nos systèmes pour l'analyse de l'acide phénylacétique, nous avons tout de même analysé des échantillons réels.

Nous avons d'abord analysé l'air expiré d'une patiente atteinte de phénylcétonurie en utilisant un μ PC. Son air expiré a été prélevé grâce à un sac Tedlar d'un litre, puis l'intégralité de l'échantillon a été transférée sur un μ PC. Ensuite, l'échantillon prélevé sur le μ PC a été analysé par GC-MS. Cependant, aucun pic correspondant à l'acide phénylacétique n'a été détecté. L'influence du sac Tedlar peut être à l'origine de l'absence de détection de ce composé.

Pour tenter de nous affranchir des problèmes du sac Tedlar, nous avons également prélevé des échantillons sur des tubes de TD en utilisant le système de prélèvement ReCIVA. Un litre d'air expiré a été prélevé sur quatre tubes et deux échantillons d'air environnant ont également été prélevés. Pour tenter d'améliorer les limites de détections de la méthode, nous avons également décidé d'utiliser une méthode SIM en MS. Au vu du spectre de masse de l'acide phénylacétique [304] nous avons décidé d'observer uniquement les masses 91, 136 et 65. Le mode SIM peut améliorer d'un facteur dix à cent les limites de détection. Les chromatogrammes obtenus pour un échantillon d'air expiré et un échantillon d'air environnant dans ces conditions sont montrés dans la figure 4.22.

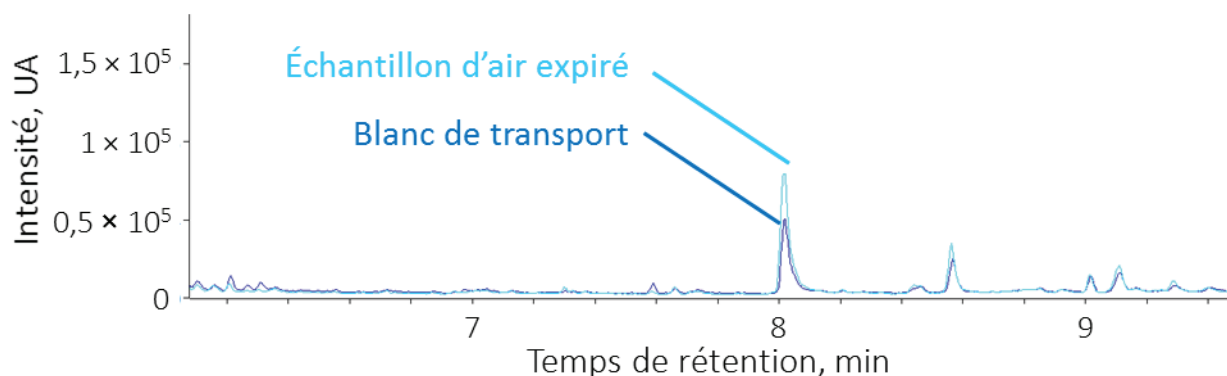


Figure 4.22, MS : mode *S/M* colonne FFAP, 15 m ; 0,25 mm, 0,250 μm . Gradient : 50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à 230 $^{\circ}\text{C}$

Les conditions analytiques sont les mêmes que celles dans la figure 4.21. Dans ces conditions le temps de rétention de l'acide phénylacétique vaut environ 8,6 min. Dans les chromatogrammes présentés dans la figure 4.22, nous n'observons pas de différence entre le chromatogramme de l'air expiré de la malade et le chromatogramme de l'air environnant aux environs des temps de rétention de l'acide phénylacétique. Ces chromatogrammes ne permettent donc pas de conclure sur la présence de l'acide phénylacétique dans l'air expiré de cette patiente.

4.2.7 Conclusion

Nous avons justifié notre choix de travailler sur la phénylcétonurie par l'existence de quatre marqueurs très bien décrits dans la littérature et spécifiques à cette maladie. Cependant, ces marqueurs sont peu volatils et acides ou basiques, ce qui complexifie leurs analyses par GC. Nous avons ensuite montré qu'en utilisant une chimie de colonne adaptée, certaines de ces molécules biologiques polaires et acides pouvaient être analysées directement sans dérivation par TD, avec des μPC ou par injection liquide. Cependant, les méthodes de prélèvement entraînent des pertes lors de l'échantillonnage et l'utilisation de μPC entraîne également un élargissement des pics.

Afin de commencer un travail sur des échantillons biologiques, nous avons ensuite effectué des tests sur l'espace de tête d'urine d'une personne atteinte de phénylcétonurie. Cet échantillon a été utilisé comme première approche car il est stocké à l'hôpital ce qui nous permet d'effectuer des tests plus facilement sans solliciter des individus. Ces tests préliminaires nous ont permis de détecter l'acide phénylacétique en utilisant un système de TD de laboratoire mais ce composé n'a pas été observé en utilisant un μPC . Ces résultats sont

très surprenants et nécessitent des investigations supplémentaires car les autres résultats que nous avons présentés jusqu'à maintenant montraient des performances similaires entre le μ PC et le TD, aussi bien pour des échantillons simples de BTEX que pour de l'air expiré. Ces travaux sur l'analyse de l'espace de tête de l'urine avec des μ PC montrent cependant les capacités de ce dispositif à analyser d'autres types d'échantillons.

Finalement, nous avons montré que les méthodes de prélèvement sur sac Tedlar pour les μ PC entraînaient des pertes des composés d'intérêt. Cela peut expliquer en partie l'absence de ces composés dans les chromatogrammes d'air expiré d'une patiente phénylcétonurique préconcentré et injecté avec un μ PC. Ces résultats justifient de nouveau l'intérêt de développer un échantillonneur d'air expiré compatible avec le μ PC.

Pour limiter les pertes des composés d'intérêt et améliorer les limites de détection, nous avons prélevé des échantillons avec le ReCIVA d'Owlstone et travaillé en mode SIM. Cependant, même dans ces conditions, nous n'avons pas pu trouver l'acide phénylacétique dans l'air expiré d'une patiente phénylcétonurique.

Ces expériences nous ont toutefois permis d'effectuer des premiers prélèvements à l'hôpital et de sortir nos instruments du laboratoire pour les confronter à des échantillons réels.

4.3 Analyse des marqueurs du tabagisme dans l'air expiré avec un micropréconcentrateur

4.3.1 Introduction

Nous avons déterminé les performances du μ PC dans le chapitre 2. Cette caractérisation des performances est rarement décrite dans la littérature, tout comme la comparaison avec un système de laboratoire de TD pour l'analyse d'échantillons complexes tels que l'air expiré. Nous avons choisi un cas simple pour démontrer l'intérêt du μ PC pour des applications biomédicales. Cette sous-partie illustre l'utilisation du μ PC pour un cas réel, l'analyse des marqueurs du tabagisme dans l'air expiré.

La partie bibliographique a montré que l'air expiré pouvait être utilisé pour déterminer l'exposition des populations à certains composés ou événements, l'exposome [181]. Cette exposition peut être involontaire comme lors de l'exposition à des polluants ou bien volontaire comme lors de la prise de médicaments. Elle inclut également l'environnement général et la nourriture. L'étude de l'exposome, grâce à l'air expiré, est possible en recherchant directement la molécule à laquelle les individus sont exposés ou un de ses métabolites, ou encore en observant une modification du profil général de l'air expiré. L'environnement général et le régime alimentaire influencent également la composition de l'air expiré. L'étude de l'influence de l'exposome se révèle indispensable pour comprendre et détecter certains facteurs confondants [42,117].

Les marqueurs du tabagisme dans l'air expiré ont été choisis comme cas simple pour illustrer l'intérêt du μ PC sur un cas réel. Ce cas de figure présente plusieurs avantages. Tout d'abord, des marqueurs sont proposés dans la littérature et la présence et la structure de ces marqueurs sont expliquées plus facilement que dans le cas de maladie. Ces données permettent donc de comparer nos résultats à des données déjà existantes. De plus, trouver des personnes qui fument pour obtenir des échantillons est simple.

Une première partie sera dédiée à la description rapide des résultats déjà publiés dans la littérature sur les marqueurs du tabagisme retrouvés dans l'air expiré. Une seconde partie expérimentale présentera nos résultats obtenus pour l'analyse de l'air expiré de trois fumeurs et de trois non-fumeurs. Cette partie expérimentale présentera également des résultats de suivi cinétique des marqueurs chez une personne après la consommation d'une cigarette.

Nous montrerons également que nos résultats, obtenus en utilisant un μ PC, sont en accord avec les données disponibles dans la littérature obtenues en utilisant d'autres instruments pour la préconcentration et l'injection.

4.3.2 Bibliographie

Différents résultats existent sur l'étude de marqueurs du tabagisme dans l'air expiré [17,30,32,42,53,106–108,111,164,194,307–310]. Ces études comparent la composition de l'air expiré de fumeurs et non-fumeurs grâce à divers modes de prélèvement, préconcentration, injection et analyse. Le tableau 4.2 résume les travaux qui permettent d'identifier des marqueurs.

Tableau 4.2. Résumé de certaines publications sur l'étude des marqueurs du tabagisme dans l'air expiré

Date	Conditions	Prélèvement	Préconcentration	Méthode	Échantillons	Marqueurs	Remarques	Ref
1987	Non précisées	Spiromètre modifié, 40 l	TD Tenax	GC-MS	200 fumeurs 300 non-fumeurs	benzène	Étude centrée sur le benzène	[194]
1990	Non précisées	Spiromètre modifié	TD Tenax	GC-MS	26 fumeurs 43 non-fumeurs	2,5-diméthylfurane		[32]
2002	Non précisées	15 ml dans un pilulier	Espace de tête	GC-MS	15 fumeurs 46 non-fumeurs	2,5-diméthylfurane	Détection ciblée sur les 3 molécules recherchées	[310]
2006	1 h sans manger ni boire	Tedlar, avec 10 premières secondes de l'expiration non prélevée	TD Carbopack B ; X, Carbopack X ; C, Carboxen 1000 en série	GC × GC-MS	3 fumeurs 11 non-fumeurs	2,5-diméthylfurane, 2-méthylfurane furane	30 min après la dernière cigarette le benzène n'est pas un bon marqueur	[53]
2008	Non précisées	Tedlar	Non nécessaire	PTR-MS	81 fumeurs 73 anciens fumeurs 210 non-fumeurs	HCN, acétonitrile, benzène	La PTR-MS ne permet que de proposer des structures des marqueurs	[309]
2008	Non précisées	Tedlar	TD, 1TD/Carbopack	GC-MS	11 fumeurs 11 non-fumeurs	2,5-diméthyl hexane, dodécane, 2,5-diméthylfurane, 2-méthylfurane		[308]
2009	Non précisées	Tedlar 1 l	10 ml SPME, CAR/PDMS	GC-MS	14 fumeurs 24 non-fumeurs	Acétonitrile	Seule la présence des molécules est comparée entre les groupes, pas de quantifications des aires	[30]
2010	Non précisées	Tedlar 1 l	TD Carbopack B ; X, Carbopack X ; C, Carboxen 1000 en série	GC-MS, avec 5 composés ciblés	100 fumeurs 104 non-fumeurs	2,5-diméthylfurane	La méthode de MS ne mesure que certains m/z. Le 2,5-diméthylfurane est présent uniquement chez les fumeurs. Le benzène est marqueur de forte consommation ou de	[107]

							consommation récente	
2012	Pas de nourriture 1 h avant, pas de cigarette 2 h avant	Tedlar, contrôlé par CO ₂	« multibed sorption tube »	GC-MS	47 fumeurs 68 non-fumeurs	86 molécules, dont 2,5-diméthylfurane, benzène et toluène	30 composés ne sont jamais trouvés chez les non-fumeurs, mais ne sont pas forcément trouvés chez tous les fumeurs	[108]
2016	30 min après consommation de tabac	BIO-VOC	TD Tenax	GC-MS	?	Benzène, toluène, 2,5-diméthylfurane	Nombre d'échantillons inconnu. Article plutôt centré sur la composition de la fumée de cigarette	[106]
2016	Rien 2 h avant le prélèvement	Réservoir en acier	TD Tenax	GC-MS	86 fumeurs 104 non-fumeurs	Dix marqueurs sont proposés dont le toluène et le benzène	Il est étonnant que le 2,5-diméthylfurane ne soit pas considéré comme un marqueur alors que le signal est intense chez les fumeurs et faible chez les non-fumeurs	[17]
2017	Détaillées dans les données supplémentaires, impossible de les trouver	Détaillées dans les données supplémentaires, impossible de les trouver	TD Carbograph 1TD/Carbopack X	GC-MS	284 fumeurs 439 anciens fumeurs 694 non-fumeurs	Trichloréthylène, pyridine, 3-méthylheptane, 2-éthyl- ou 3-ethylfuran	Très grande cohorte, possibilité de séparer les populations en fonction du statut tabagique	[42]

Le tableau 4.2 présente uniquement les études qui permettent d'identifier des marqueurs. Comme dans le cas des études qui impliquent l'air expiré en général, la TD constitue la méthode de préconcentration la plus utilisée [43].

L'étude réalisée sur la plus grande cohorte montre qu'une population peut être séparée en deux sous populations en fonction du statut tabagique grâce aux COV contenus dans l'air expiré [42]. Les phénomènes qui entraînent cette séparation de populations doivent être compris puisque le tabagisme est un facteur confondant.

Comme le montre le tableau 4.2, le temps entre le prélèvement et la dernière cigarette n'est parfois pas précisé, et, quand il est imposé, la durée peut varier. Cela peut expliquer la variabilité des marqueurs proposés entre les différentes études. Une autre source de variabilité résulte du mode de prélèvement [43,48]. L'utilisation de différentes techniques de préconcentration peut également influencer les résultats. Malgré la quinzaine d'études publiées, aucun consensus ne semble ressortir sur la nature des marqueurs du tabagisme dans l'air expiré. Finalement, les différentes études proposent plusieurs dizaines de marqueurs.

Cependant, des marqueurs tels que le 2,5-diméthylfurane, le benzène et le toluène reviennent fréquemment dans les études. [17,32,53,106–108,194,308,310]. Dans le cas du benzène et du toluène, les concentrations redescendent rapidement à des niveaux semblable aux personnes qui ne fument pas entre 30 min [53] et 2 h [107] après la dernière cigarette. Le 2,5-diméthylfurane semble plus spécifique. L'analyse d'autres fluides ainsi que d'autres résultats semblent montrer que la consommation de tabac entraîne une exposition à ces COV. Ces molécules sont retrouvées dans la fumée de cigarette [106] et la consommation de cigarette peut être détectée par analyse du benzène urinaire [109]. La concentration sanguine du 2,5-diméthylfurane est corrélée au nombre de cigarettes fumées par jour [110,311].

L'étude de 2017 impliquant la plus grande cohorte, composée de 1417 personnes, ne propose pas ces marqueurs. Puisque nous n'avons pas réussi à trouver les conditions de prélèvement, nous concluons que le prélèvement doit s'effectuer au bout d'un temps relativement long après la dernière cigarette sinon le benzène et le toluène seraient surement proposés comme marqueurs.

Au vu des résultats publiés dans la littérature, nous donc décidé de prélever l'air expiré rapidement après la consommation de cigarette afin de vérifier que nous pouvons observer les trois marqueurs qui reviennent le plus dans la littérature : benzène, toluène et 2,5-diméthylfurane.

4.3.3 Résultats

4.3.3.1 *Matériel et méthode*

Nous avons utilisé le même dispositif que celui utilisé pour caractériser les puces sur des mélanges simples et de l'air expiré. Nous le présentons rapidement à nouveau tout en ajoutant des détails concernant les prélèvements d'air expiré.

4.3.3.1.1 Échantillonnage de l'air expiré

Tous les sacs Tedlar de 1 l sont fournis par Supelco. Avant chaque utilisation, les sacs sont remplis d'azote 5.0, Air Liquide, et vidés avec une pompe à vide, ce protocole est répété trois fois.

Trois fumeurs et trois non-fumeurs ont participé à cette étude. L'air expiré des non-fumeurs est prélevé de manière aléatoire au cours de la journée, en fonction de la disponibilité de la machine, tandis que l'air expiré des personnes qui fument est prélevé dans les 15 min suivant la consommation d'une cigarette.

Pour le prélèvement, il est demandé aux volontaires d'expirer normalement une fois dans un sac Tedlar de 1 l fraîchement nettoyé. Remplir le sac n'est pas nécessaire afin d'éviter une expiration forcée. 125 ml d'échantillon sont alors immédiatement transférés sur un μ PC au moyen du dispositif Primosamp. Pour cela, le sac Tedlar est connecté à la cartouche contenant le μ PC, elle-même connectée au prototype Primosamp. L'échantillon est ensuite directement analysé.

Le même mode de prélèvement est utilisé pour les cinétiques des marqueurs du tabac dans l'air expiré. Une puce unique a été utilisée pour l'ensemble des analyses.

4.3.3.1.2 Système de GC-MS

Nous utilisons ici un système de chromatographie en phase gazeuse, Clarus 500, Perkin Elmer couplé à un spectromètre de masse, Clarus 560 S, Perkin Elmer. La séparation est effectuée grâce à une colonne de 15 m de long, 250 μ m de diamètre interne et 0,25 μ m d'épaisseur de

phase. La phase stationnaire est de type 5 ms, Supelco, 28469-U. La pression en hélium dans l'injecteur est de 69 kPa. Le gradient de température est le suivant : 50 °C pendant 1 min puis une rampe de 20 °C/min jusqu'à 230 °C puis cette température est maintenue pendant 5 min. La sortie de la colonne est connectée au spectromètre de masse au moyen d'une ligne de transfert chauffée à 300 °C. Le spectromètre de masse est de type simple quadripôle avec une source d'ionisation électronique à 70 eV et mesure les rapports masse/charge compris entre 15 et 200 à une fréquence de 4 Hz. La source est chauffée à 200 °C.

4.3.3.1.3 Injection avec Primosamp

Lors de l'injection, une source d'hélium programmable, dans notre cas l'injecteur split splitless monté sur le four de GC, est reliée à la cartouche qui contient le μ PC par un capillaire en silice fondue de 250 μ m de diamètre interne et 360 μ m de diamètre externe. La connexion entre le capillaire et le μ PC est réalisée grâce à une férule réductrice, VICI, FS1.4-5, et un écrou 1/16". Le même dispositif permet de connecter la sortie du μ PC à la colonne. Lors de l'injection, le chauffage du μ PC est lancé manuellement en appuyant sur un bouton sur le prototype, en même temps que le gradient et l'acquisition MS sont déclenchés sur le four de GC. Plus de détails concernant l'utilisation du système Primosamp pour le prélèvement et l'injection ont été donnés dans le chapitre 2.

4.3.3.1.4 Masses utilisées pour la détection des composés

Le rapport m/z le plus intense d'après les spectres de masse du NIST [312] est utilisé pour chaque molécule. Pour le benzène, il s'agit de l'ion 78 [313], pour 2,5-diméthylfurane de l'ion 96 [314] et pour le toluène de l'ion 91 [315]. Pour la confirmation de ces molécules dans les échantillons d'air expiré, les ions 77 et 51 sont utilisées pour le benzène, les ions 95 et 53 pour le 2,5-diméthylfurane et les ions 92 et 65 pour le toluène.

4.3.3.2 *Blancs de puce et blancs de prélèvements*

Pour commencer, nous avons effectué des blancs de désorption des puces pour vérifier que le μ PC ne relargue ni benzène, toluène ou 2,5-diméthylfurane. Une première injection est réalisée pour conditionner les μ PC. Après la première analyse, nous effectuons une seconde injection pour vérifier si le μ PC relargue des molécules. Un chromatogramme ionique total est présenté dans la figure 4.23, ainsi que les chromatogrammes ioniques extraits des ions 78, 96 et 91 qui correspondent au benzène, au 2,5-diméthylfurane, et au toluène respectivement.

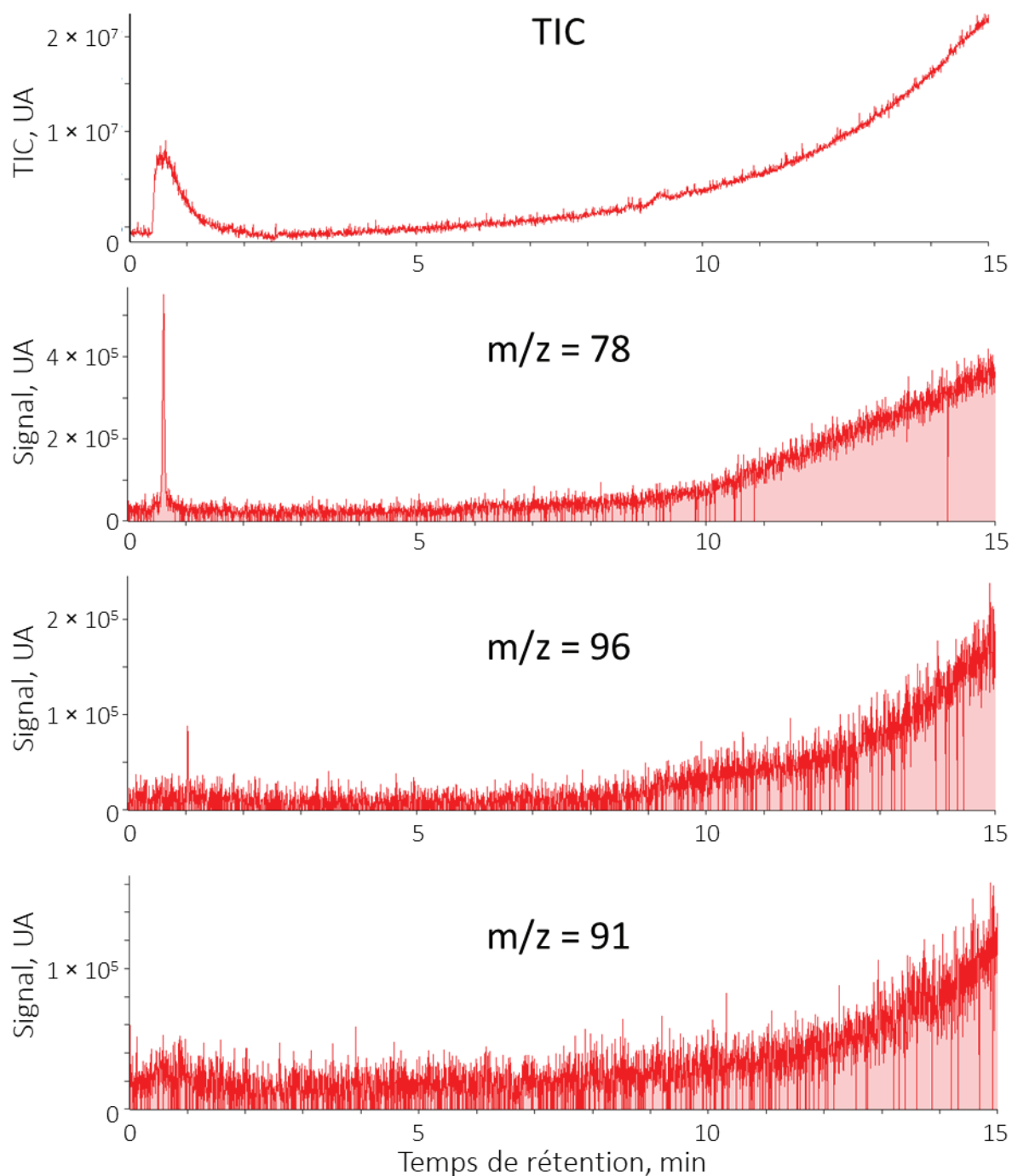


Figure 4.23. Chromatogramme ionique total d'un blanc de puce, ainsi que les chromatogrammes ioniques extraits des rapports m/z 78, 96 et 91, correspondant respectivement au benzène au 2,5-diméthylfurane et au toluène

Le premier pic à 0,6 min est interprété comme le pic d'injection. Mis à part celui-ci, le chromatogramme ne semble pas présenter de pics. Les chromatogrammes ioniques extraits du 2,5-diméthylfurane et du toluène confirment l'absence de ces composés. Celui du benzène présente un pic peu intense au bon temps de rétention, ce qui peut être lié à la dégradation du Tenax. En effet, la structure chimique du Tenax contient des groupements phényles qui peuvent se dégrader, entre autres, en benzène lors du chauffage de la puce [268,316].

Un autre aspect très intéressant est que les blancs de puce ne présentent quasiment aucun pic. Lors de l'utilisation de tubes de TD contenant du Tenax, il est rare d'obtenir des blancs de désorption exempts de pics comme celui montré dans la figure 4.23. En effet, les chromatogrammes obtenus contiennent souvent des dérivés de l'acide benzoïque issus de la dégradation du Tenax [268,316–318]. Les tubes contiennent environ 300 fois plus de Tenax que les μ PC, ce qui peut expliquer ces différences. De plus, avec le système de TD de laboratoire, le chauffage du piège froid peut également relâcher des produits de dégradation du Tenax. Dans le cas de l'injection de laboratoire, le tube est également chauffé plus longtemps pour désorber tous les COV.

De même, des blancs de sacs Tedlar sont également réalisés pour vérifier que les sacs Tedlar ne relarguent pas les trois marqueurs recherchés. Les sacs sont remplis avec de l'azote 5.0 puis 125 ml sont préconcentrés sur le μ PC au moyen du prototype avant la désorption et l'analyse par GC-MS. Un chromatogramme est montré dans la figure 4.24 ainsi que les chromatogrammes ioniques extraits des ions 78, 96 et 91 qui correspondent au benzène, 2,5-diméthylfurane et toluène.

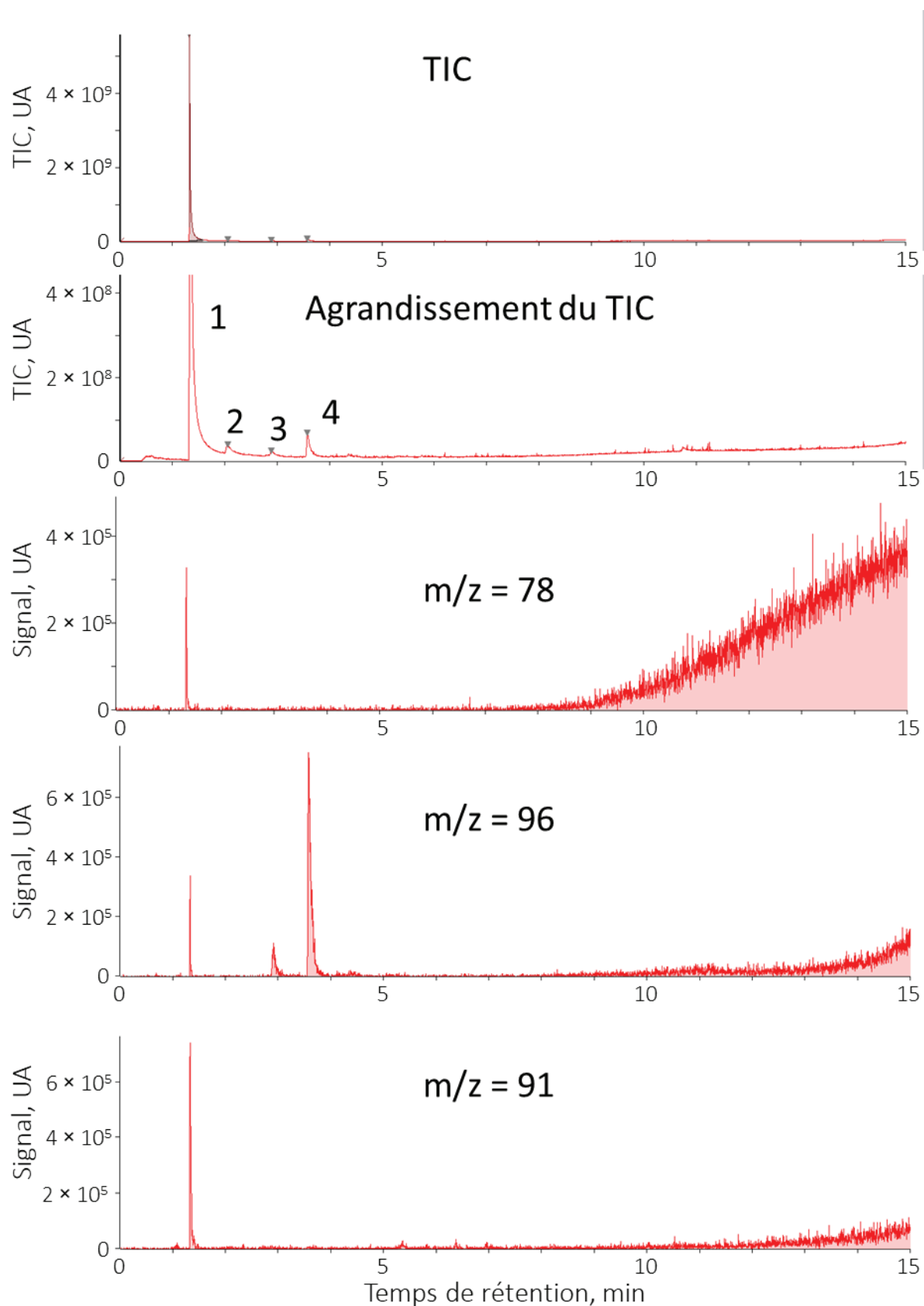


Figure 4.24. Chromatogramme ionique total d'un blanc de sac Tedlar, ainsi que les chromatogrammes ioniques extraits des rapports m/z 78, 96 et 91, correspondant respectivement au benzène au 2,5-diméthylfurane et au toluène

Le chromatogramme obtenu contient quatre pics majoritaires. Le pic 1 correspond au N,N-diméthylacétamide et le pic 2 au phénol. Ce sont des contaminants connus des sacs Tedlar. Le chromatogramme ionique extrait de $m/z = 78$ présente un pic, mais avec un temps de rétention différent de celui du benzène, vers 1,5 min. Ce n'est donc pas le benzène. C'est également le cas pour le chromatogramme ionique extrait du 2,5-diméthylfurane qui présente un pic à un temps de rétention différent, vers 1,5 min. Pour le toluène le chromatogramme contient un pic peu intense au bon temps de rétention, avec une hauteur de pic inférieure à 4×10^5 .

Le μ PC en lui-même ainsi que le système de prélèvement par sac Tedlar ne relarguent donc pas des quantités de benzène, toluène ou 2,5-diméthylfurane susceptibles de perturber la recherche de ces marqueurs du tabagisme.

4.3.3.3 Recherche des marqueurs du tabagisme dans l'air expiré

Nous avons prélevé l'air expiré de trois fumeurs et de trois non-fumeurs volontaires. Toutes ces personnes travaillent au même endroit. Nous ne leur avons donné aucune consigne spécifique concernant la prise de nourriture ou de boisson avant le prélèvement, car aucun consensus n'existe actuellement sur les protocoles à appliquer. L'unique consigne concerne les fumeurs dont l'air expiré a été prélevé au maximum 15 min après la dernière cigarette. Les trois chromatogrammes obtenus pour les non-fumeurs sont présentés dans la figure 4.25 et les trois chromatogrammes obtenus pour les fumeurs sont présentés dans la figure 4.26.

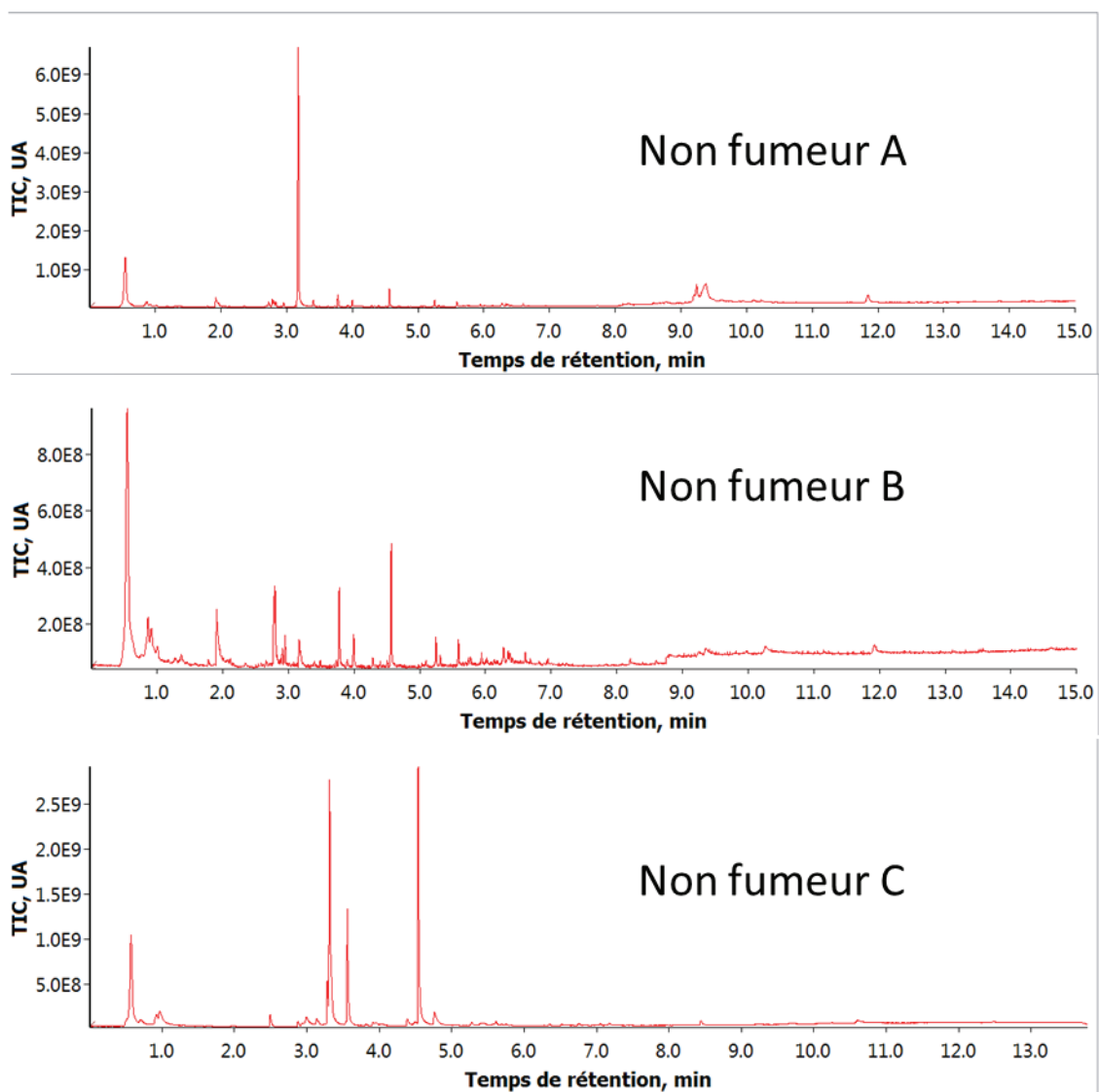


Figure 4.25. Chromatogrammes d'air expiré obtenus pour les trois non-fumeurs

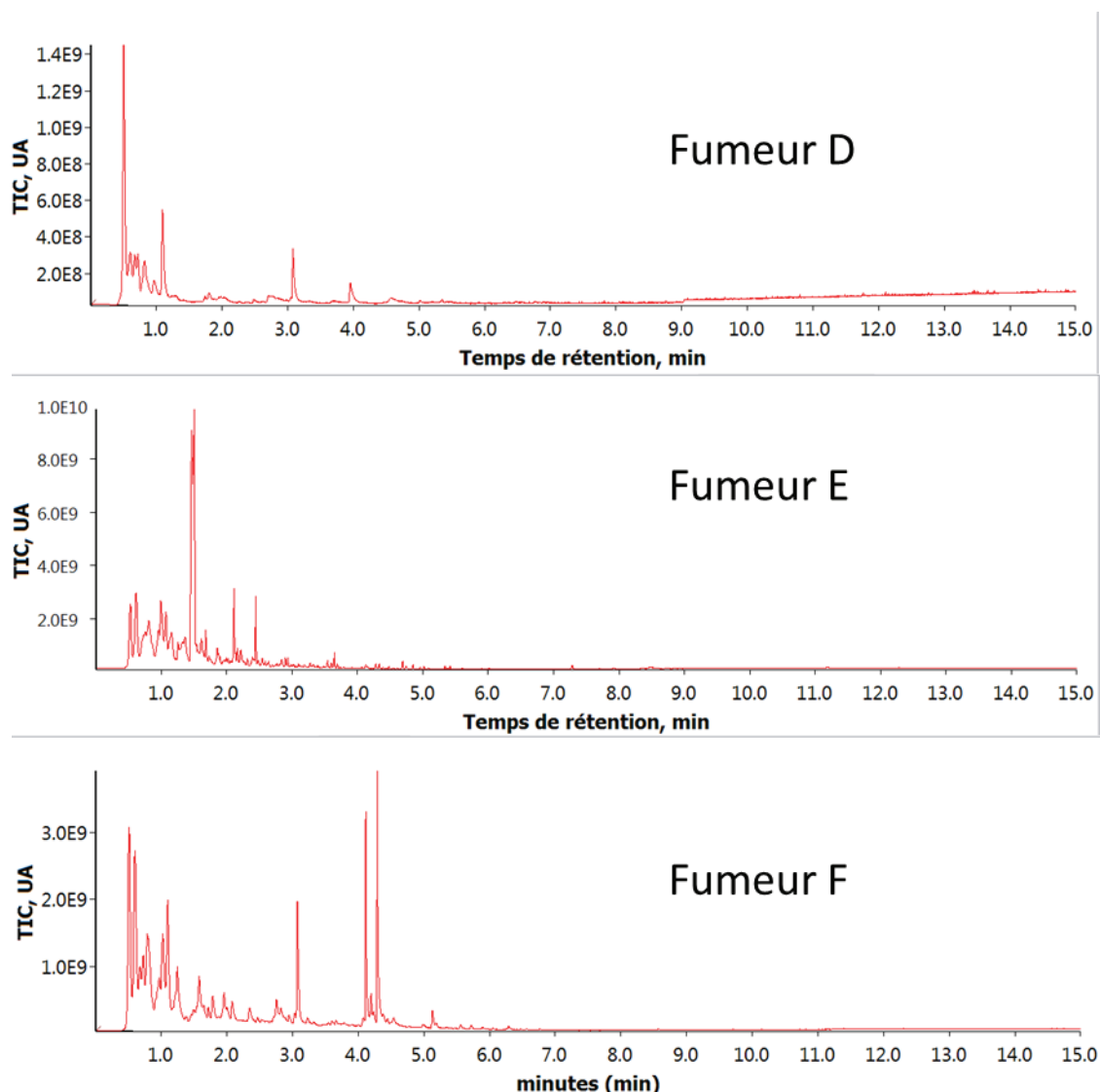


Figure 4.26. Chromatogrammes d'air expiré obtenus pour les trois fumeurs

Une première comparaison rapide entre les six chromatogrammes montre une différence de compositions entre les six échantillons, ce qui correspond aux résultats présentés précédemment sur la variabilité de la composition en COV de l'air expiré entre les individus [54,56,57,71,74,79,80,82,113,181]. Les chromatogrammes des non-fumeurs ne sont pas identiques, mais nous observons plus de molécules pour les fumeurs aux temps de rétention courts. L'intensité des pics aux temps de rétentions courts chez les fumeurs est environ dix fois plus élevée que chez les non-fumeurs.

4.3.3.4 Recherche des marqueurs du tabagisme

Les chromatogrammes ioniques extraits des rapports m/z spécifiques au benzène, 2,5-diméthylfurane, et toluène sont comparés pour les 6 personnes. En effet comme l'échantillon contient de nombreux COV, les chromatogrammes ioniques extraits permettent de plus facilement observer les pics. Les chromatogrammes ioniques extraits des rapports m/z 78, 95 et 91, sont présentés respectivement dans la figure 4.27, la figure 4.28, et la figure 4.29. Ils correspondent aux signaux du benzène, 2,5-diméthylfurane et toluène pour les six individus.

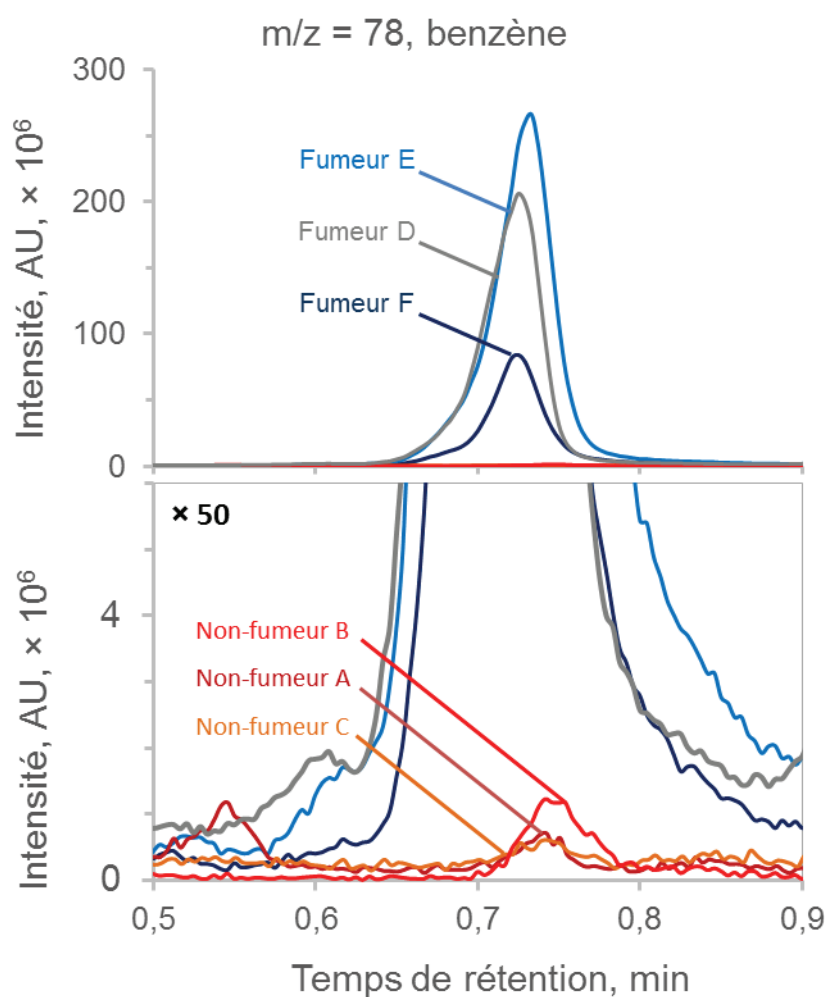


Figure 4.27. Chromatogrammes ioniques extraits de $m/z = 78$ montrant les pics de benzène dans l'air expiré de trois fumeurs 15 min maximum après avoir fumé une cigarette et de trois non-fumeurs

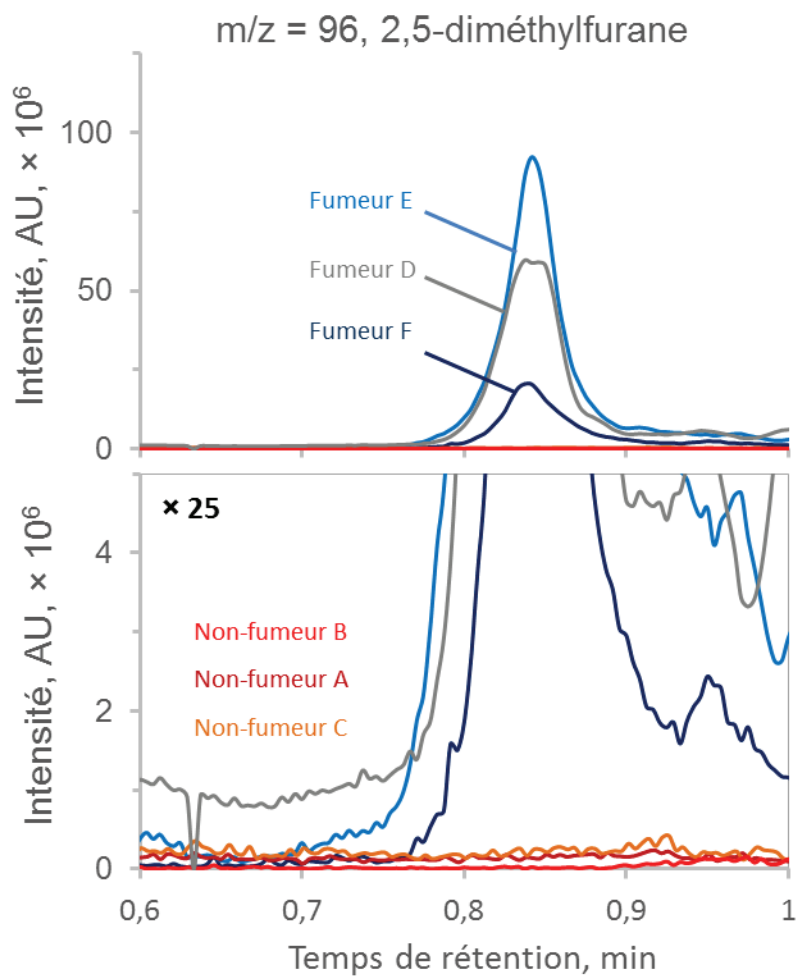


Figure 4.28. Chromatogrammes ioniques extraits de $m/z = 96$ montrant les pics de 2,5-diméthylfurane dans l'air expiré de trois fumeurs 15 min maximum après avoir fumé une et de trois non-fumeurs

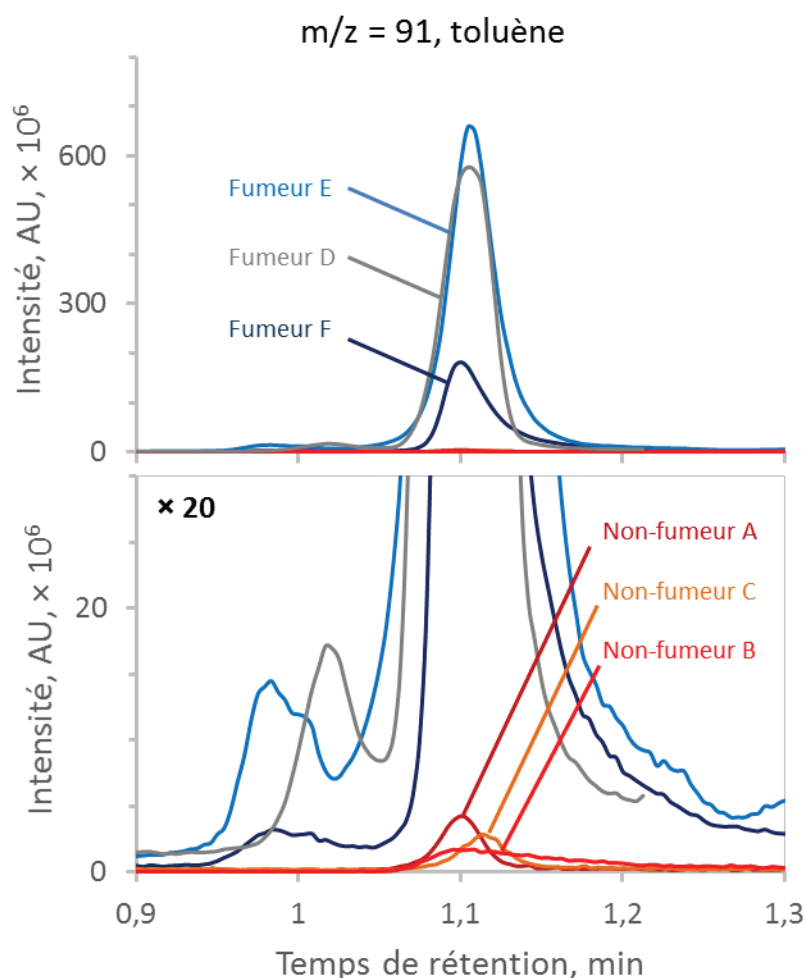


Figure 4.29. Chromatogrammes ioniques extraits de $m/z = 91$ montrant les pics de toluène dans l'air expiré de trois fumeurs 15 min maximum après avoir fumé une et de trois non-fumeurs

Pour confirmer que ces chromatogrammes ioniques extraits correspondent bien aux trois molécules recherchées, les chromatogrammes ioniques extraits d'autres rapports m/z caractéristiques de ces molécules sont également observés, comme nous l'avons expliqué dans la partie matériel et méthode.

Les pics de ces trois molécules sont beaucoup plus intenses chez les fumeurs que chez les non-fumeurs. Pour le benzène, la hauteur des pics chez les fumeurs est entre 30 et 275 fois plus intense que chez les non-fumeurs. Pour le 2,5-diméthylfurane, aucun pic n'est observé chez les non-fumeurs alors que des pics sont observés chez les fumeurs. Les pics de toluène sont entre 40 et 350 fois plus intenses chez les fumeurs que chez les non-fumeurs. On constate également que le fumeur E, chez qui le pic de benzène est le plus intense, présente également les pics de toluène et de 2,5-diméthylfurane les plus intenses. C'est également le même fumeur, le F, qui présente le moins de signal pour les trois marqueurs.

Certaines études publiées dans la littérature ont déterminé des valeurs des aires des pics mesurés pour ces trois marqueurs chez des fumeurs et chez des non-fumeurs. Le tableau 4.3 présente les aires des pics afin de comparer nos résultats à ceux de la littérature.

Tableau 4.3. Aires des pics des trois marqueurs chez les six personnes

	Non-fumeur A	Non-fumeur B	Non-fumeur C	Fumeur D	Fumeur E	Fumeur F
Benzène, m/z = 78	$2,0 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	$6,2 \times 10^4$	$8,9 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$
2,5-diméthylfuran, m/z = 96	ND	ND	ND	$2,8 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$
Toluène, m/z = 91	$1,4 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^7$	$7,6 \times 10^6$	$2,6 \times 10^7$

Les aires des pics du benzène et du toluène sont plus intenses d'un facteur 100 au minimum dans l'air expiré des fumeurs que dans celle des non-fumeurs. Gaida et coll., dans une étude qui implique 86 fumeurs et 104 non-fumeurs [17], ont trouvé un rapport 10 pour les aires du toluène et du benzène entre les fumeurs et les non-fumeurs. Filipiak et coll. [108] ont trouvé, en moyenne, un rapport 5 pour le toluène et 3 pour le benzène entre l'air expiré de 47 fumeurs et l'air expiré de 68 non-fumeurs. Alonso et coll. [107] trouvent en moyenne un rapport 3 pour le toluène et 7 pour le benzène chez 100 fumeurs et 104 non-fumeurs. Dans le cas de Filipiak et coll. et de Gaida et coll. les résultats sont obtenus avec un spectromètre de masse en mode «full scan». Dans le cas d'Alonso et coll., les résultats sont obtenus avec un spectromètre de masse qui ne détecte que certaines masses spécifiques à certaines molécules choisies par les auteurs. Ainsi, nos résultats montrent une plus grande différence entre le signal des fumeurs et des non-fumeurs que les résultats décrits dans la littérature. Une première explication pour ces différences peut être les conditions des patients lors du prélèvement. Dans notre cas, l'air expiré a été prélevé au maximum 15 min après la consommation de cigarette. Filipiak et coll. [108] tout comme Gaida et al [17] imposent 2 h sans consommation de cigarette avant le prélèvement. Alonso et coll. n'imposent rien avant le prélèvement [107]. Les rapports plus élevés dans notre cas peuvent donc être expliqués par un prélèvement plus rapproché de la dernière cigarette. De plus, les cinétiques de ces marqueurs ont été étudiées dans l'air expiré et montrent une diminution rapide des concentrations au cours des 20 premières minutes [107]. Concernant le 2,5-diméthylfurane, il est retrouvé chez les trois fumeurs et la concentration dans l'air expiré des non-fumeurs se situe sous la limite de détection pour les trois individus. D'autres travaux ont comparé ce

marqueur chez des fumeurs et des non-fumeurs. Les résultats de Gaida et coll. [17] retrouvent cette molécule chez 93 % d'une population de 86 fumeurs et chez 2 % d'une population de 104 non-fumeurs. Étonnamment, cette molécule n'est pas retenue dans leur modèle pour séparer les fumeurs et les non-fumeurs. Dans le travail publié par Alonso et coll. [107], le 2,5-diméthylfurane est retrouvé dans l'air expiré des 100 fumeurs et la concentration de cette molécule se situe sous la limite de détection, 5 pptv, dans l'air expiré de 104 non-fumeurs. Dans les travaux publiés par Filipiak et coll. [108], cette molécule est retrouvée dans l'air expiré de 9 % des 68 non-fumeurs et dans l'air expiré de 81 % des 47 fumeurs. De plus, dans ce dernier cas, l'aire du 2,5-diméthylfurane est en moyenne 50 fois plus élevée chez les fumeurs que chez les non-fumeurs. Ainsi, la présence de cette molécule dans l'air expiré des non-fumeurs pourrait s'expliquer par un tabagisme passif ou par une exposition environnementale à cette molécule par un autre vecteur, la nourriture par exemple [319]. L'absence de ce marqueur chez certains fumeurs pourrait s'expliquer par une consommation plus faible ou par le type de cigarette consommée. Le 2,5-diméthylfurane est le composé le moins intense parmi les trois marqueurs étudiés. C'est peut-être pour cette raison que l'étude de Buszewski et coll. [30] propose le benzène et le toluène comme marqueurs mais pas le 2,5-diméthylfurane. Dans cette étude [30], le composé est détecté chez un seul fumeur. La concentration de ce composé doit se situer sous la limite de détection chez toutes les personnes.

4.3.3.5 Cinétique des trois marqueurs dans l'air expiré d'un fumeur

La cinétique de ces trois marqueurs a été étudiée chez un seul fumeur pour comparer nos résultats à ce qui est décrit dans la littérature [107]. Nous voulions également vérifier au bout de combien de temps les concentrations de ces marqueurs reviennent à des niveaux équivalents à ceux des non-fumeurs. L'étude de la cinétique ou le suivi au cours du temps de COV dans l'air expiré peut également présenter un intérêt pour d'autres applications : suivi de sédation, efficacité de certains médicaments. Étudier la cinétique nous semble également une bonne méthode de validation d'un marqueur d'un événement contrôlable.

Le même μ PC est utilisé pour tous les prélèvements. Un nouveau prélèvement est effectué dès que le μ PC est à nouveau disponible pour stocker au minimum l'air expiré dans un sac Tedlar. Une analyse GC-MS dure 15 min, il faut ensuite laisser refroidir le four et le μ PC après l'analyse. Le transfert de l'échantillon d'air expiré du sac Tedlar vers le μ PC dure 5 min et il

faut installer le μ PC dans le four pour l'analyse suivante. Cela explique qu'il a été possible d'effectuer une analyse environ toutes les 25 min.

Les aires des trois marqueurs dans l'air expiré d'une personne pendant les 4 h qui suivent la consommation d'une cigarette sont présentées dans la figure 4.30 pour le benzène, dans la figure 4.31 pour le 2,5-diméthylfurane et dans la figure 4.32 pour le toluène. Le chromatogramme ionique extrait de l'ion le plus intense pour chaque molécule a été utilisé. Un insert dans les graphes montre un agrandissement sur le signal à la fin de l'expérience pour mieux observer les variations après 50 min. Les lignes bleues sur les graphes servent uniquement à mieux visualiser la tendance du signal au cours du temps et ne constituent pas une tentative pour modéliser mathématiquement la cinétique de ces marqueurs dans l'air expiré.

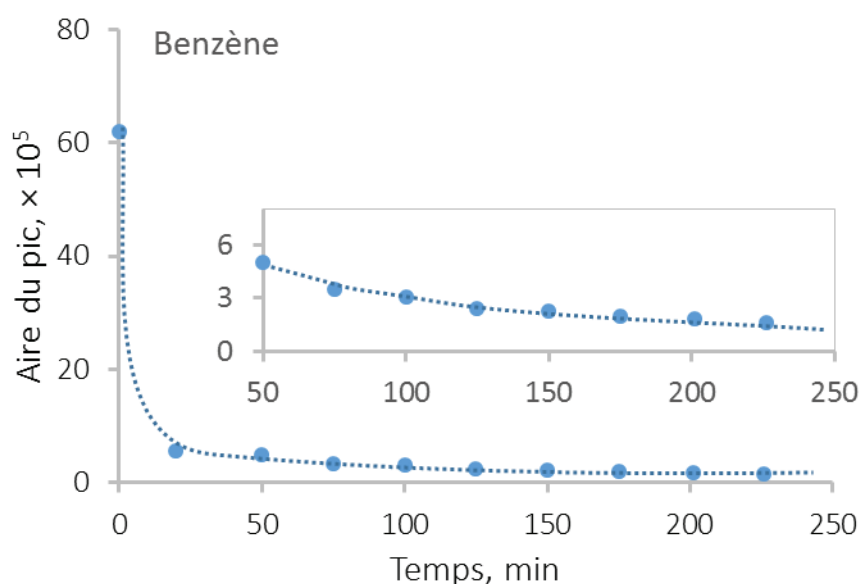


Figure 4.30. Aire du $m/z = 78$ du benzène au cours du temps dans l'air expiré d'un individu après avoir fumé une cigarette

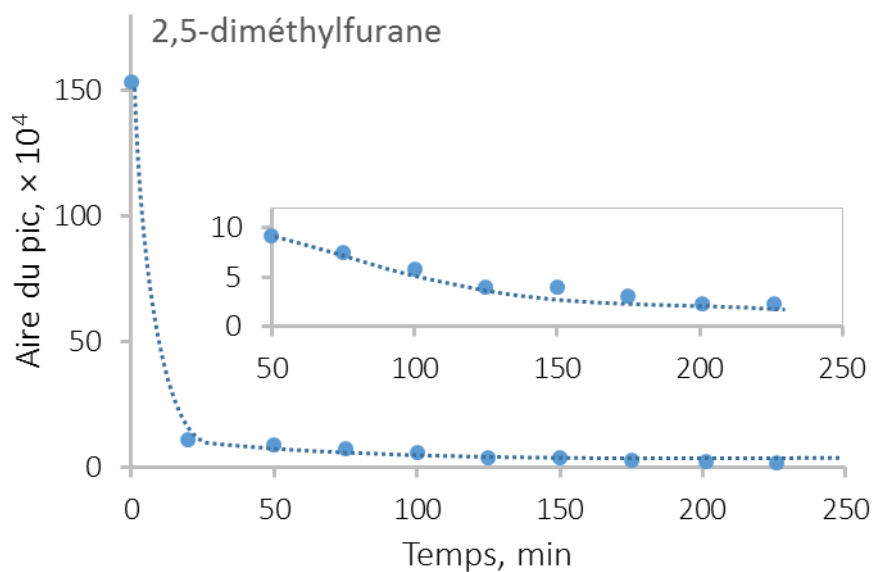


Figure 4.31. Aire du pic de $m/z = 96$ du 2,5-diméthylfurane au cours du temps dans l'air expiré d'un individu après avoir fumé une cigarette

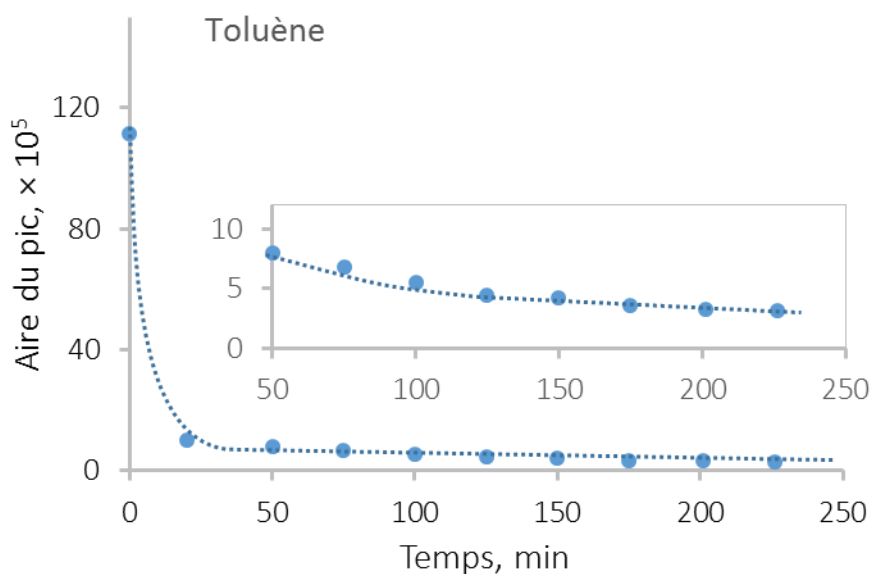


Figure 4.32. Aire du pic de $m/z = 91$ du toluène au cours du temps dans l'air expiré d'un individu après avoir fumé une cigarette

Le signal du benzène diminue d'un facteur 10 après 235 min. Dans le cas du 2,5-diméthylfurane, le signal est divisé par 20 après 235 min. Ces résultats sont en accord avec d'autres résultats publiés sur les cinétiques de ces molécules dans l'air expiré après avoir fumé une cigarette [107].

Pour le toluène, nous observons une diminution d'un facteur 20 après 25 min et d'un facteur 60 après 235 min. Alonso et coll. [107] décrivent une diminution d'un facteur 2 après 20 min et d'un facteur 4 après 235 min. Cependant, dans le cas d'Alonso et coll. les cinétiques

sont étudiées chez trois personnes différentes et les écarts-types semblent élevés. Cela est aussi le cas chez Jo et Pack [320]. Cela laisse penser qu'il existe une grande variabilité des cinétiques en fonction des individus et que nos résultats n'entrent pas en contradiction avec ceux déjà publiés.

Les signaux du benzène et du toluène retrouvent au bout de deux heures des niveaux proches des signaux observés chez les non-fumeurs, ce qui correspond bien à d'autres résultats publiés précédemment [53,107]. Cela pourrait également expliquer pourquoi les résultats obtenus pour la plus grande cohorte [42] ne proposent pas le benzène ni le toluène comme marqueur. Il semble en effet que pour cette étude le prélèvement d'air expiré ait eu lieu plus de deux heures après la dernière cigarette.

4.3.4 Conclusion sur les marqueurs du tabagisme dans l'air expiré

Les marqueurs du tabagisme dans l'air expiré ont été choisis pour illustrer les performances du μ PC sur un cas réel simple. En effet, des données disponibles dans la littérature proposent différents marqueurs, avec une explication de leurs structures et obtenir des échantillons de personnes qui fument est simple.

Nos résultats obtenus sur trois fumeurs et trois non-fumeurs sont en accord avec ce qui est décrit dans la littérature. Cela est vrai aussi bien en ce qui concerne l'intensité des marqueurs chez les fumeurs que la cinétique de ces marqueurs chez un fumeur unique. Les différences observées peuvent être liées aux types d'instruments, aux conditions de prélèvements, aux marques de cigarettes ou encore à la consommation tabagique.

Les μ PC utilisés pendant cette thèse permettent donc de retrouver des résultats compatibles avec ceux décrits dans la littérature en utilisant des machines de laboratoire pour l'analyse de COV marqueurs de tabagisme dans l'air expiré. Le faible nombre d'analyses effectuées avec le μ PC nécessiterait cependant une confirmation de ces résultats préliminaires sur des groupes plus grands.

L'emploi du μ PC permet de diminuer le volume d'échantillon nécessaire à l'analyse et il peut être intégré dans un système portable alimenté par batterie. Le faible volume d'échantillon nécessaire pour une analyse ouvre la possibilité d'un prélèvement sur respiration unique. Le μ PC pourrait constituer une technologie clé dans le développement d'un système portable d'analyse d'air expiré pour des applications biomédicales.

Comme l'ont montré les blancs du sac Tedlar, utiliser ces contenants provoque des pollutions dans les chromatogrammes. Un prélèvement direct d'air expiré sur un μ PC semble donc intéressant et permettrait de s'affranchir des manipulations nécessaires lors de l'utilisation de Primosamp. La partie suivante présentera le travail effectué pour le développement d'un instrument dédié à l'échantillonnage direct d'air expiré sur un μ PC.

4.4 Intégration du micropréconcentrateur dans un échantillonneur d'air expiré, stage de Morgan Cellier

4.4.1 Introduction

Jusqu'à présent, nous avons uniquement utilisé des sacs Tedlar pour prélever de l'air expiré lorsqu'un μ PC servait à la préconcentration. Nous avons montré que ce dispositif n'est pas complètement adapté pour ces applications en raison des pollutions qu'il engendre et des nombreuses manipulations qu'il oblige à effectuer. Nous avons également montré dans le chapitre 3 que le μ PC permettait de réduire le volume d'échantillon nécessaire pour obtenir des résultats identiques à ceux obtenus avec un TD. En plus de ce premier avantage, le μ PC permet également de simplifier l'architecture de l'injecteur et peut s'intégrer dans des systèmes nécessitant de faibles puissances électriques.

Afin de valoriser les avantages des μ PC pour l'analyse de l'air expiré et de tenter de nous affranchir des inconvénients des échantillonneurs existants, nous avons travaillé au développement d'un échantillonneur d'air expiré spécifique au μ PC. Ce travail a été effectué par Morgan Cellier, dans le cadre de son stage de fin d'études, et nous a permis d'appréhender les paramètres importants pour le développement d'un échantillonneur d'air expiré et de mieux comprendre le fonctionnement des systèmes déjà existants. Cette partie reprend majoritairement le travail qu'il a effectué ainsi que le rapport de stage qu'il a produit [321].

Nous commencerons par décrire le développement d'un échantillonneur d'air expiré sur μ PC qui fonctionne grâce à un suivi du taux de CO_2 . Ce premier prototype nous a permis de comprendre les différents problèmes liés aux systèmes de prélèvement de l'air expiré. Nous ferons ressortir des inconvénients liés spécifiquement au prototype que nous avons fabriqué et des inconvénients liés au choix de prélever l'air expiré en suivant la concentration en CO_2 . Pour tenter de résoudre ces inconvénients, nous présenterons ensuite une étude des avantages et des inconvénients des échantillonneurs existants. Elle nous permettra de faire ressortir un cahier des charges qui sera utilisé pour proposer une nouvelle architecture d'échantillonneur dont le but est d'effectuer un prélèvement sur expiration unique.

Les figures reprises directement ou adaptées du rapport de stage de Morgane Cellier seront explicitement signalées.

4.4.2 Une architecture basée sur le suivi du taux de CO₂

4.4.2.1 Description du dispositif

Nous nous sommes inspirés de l'échantillonneur le plus utilisé actuellement. Ce dispositif de prélèvement d'air expiré sur tube de TD, le ReCIVA, fabriqué par Owlstone, a été présenté dans la partie 1.3.1.4. Il permet de sélectionner la portion de l'air expiré prélevé en suivant le taux de CO₂ dans l'air expiré. En effet, l'air de fin de respiration est plus riche en CO₂ que l'air de début de respiration. Lorsque le CO₂ atteint la gamme de concentration souhaitée, une pompe transfère l'air expiré directement sur des tubes de TD placés devant le visage de la personne. Nous avons réadapté cette architecture pour développer un échantillonneur de ce type adapté aux μ PC. Pour commencer, le schéma proposé dans la figure 4.33 a été réalisé.

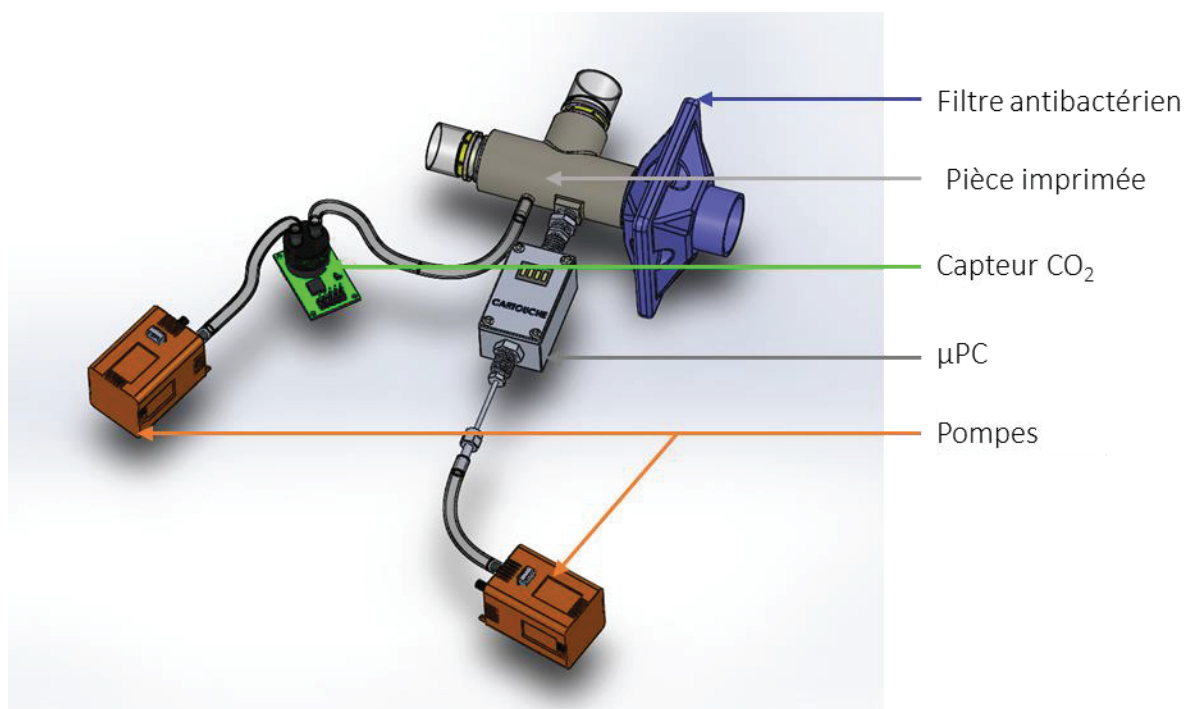


Figure 4.33. Proposition d'architecture, adapté de [321]

Lors du prélèvement d'air expiré, une personne respire par la bouche à travers le filtre antibactérien. La pompe reliée au capteur de CO₂ fonctionne en permanence et permet de suivre la concentration en temps réel. La pompe reliée au μ PC est enclenchée quand le CO₂ atteint une certaine concentration. Cela permet de prélever la portion souhaitée de l'air expiré. Lorsque la fin de l'expiration est détectée grâce à la chute du taux de CO₂ le prélèvement sur le μ PC s'arrête. Cela est répété pour plusieurs expirations jusqu'à obtenir le volume souhaité d'échantillon prélevé sur le μ PC. L'intégration de ce mode de fonctionnement dans un prototype est présentée dans la partie suivante.

4.4.2.2 Fabrication du dispositif

Afin d'intégrer ces différentes possibilités dans un dispositif portable, le prototype présenté dans la figure 4.34 a été conçu. Le schéma montre uniquement l'extérieur du dispositif, mais le prototype contient également une pompe, une batterie, un capteur de CO₂ et l'électronique.

Le système de molette qui permet une fixation rapide des cartouches contenant le μ PC sans outils a été repris du système Primosamp. Il permet de mettre et d'enlever facilement la cartouche contenant le μ PC dans le prototype.

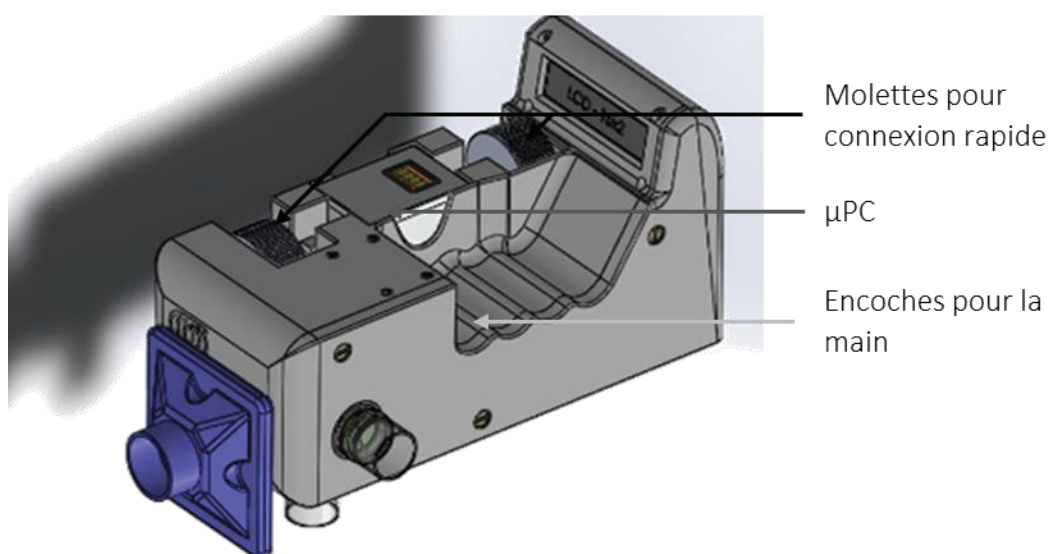


Figure 4.34. Dessin CAO du prototype de prélèvement d'air expiré sur μ PC basé sur le fonctionnement du ReCIVA, d'après [321]

Un emplacement pour les mains est prévu pour pouvoir tenir facilement le prototype, comme montré dans la figure 4.35. Elle permet au patient de tenir le dispositif pendant le prélèvement.

Les premières secondes du prélèvement servent à analyser la manière de respirer de la personne pour déterminer à partir de quelle concentration en CO₂ prélever l'air expiré. L'écran affiche le volume restant à prélever.

La partie suivante présente les résultats obtenus avec de prototype.



Figure 4.35. Photographie du prototype fini, d'après [321], crédits Morgan Ceillier

4.4.2.3 Résultats obtenus avec le dispositif

Pour le prélèvement, la personne souffle le plus normalement possible, par la bouche, à travers le filtre, ce qui permet de prélever la portion souhaitée de l'expiration. Le prélèvement dure une dizaine de minutes. Pour tester ce dispositif, nous avons prélevé un échantillon d'air expiré avec ce prototype sur un μ PC en même temps qu'un échantillon était prélevé avec un sac Tedlar puis également transféré sur un μ PC. Nous avons ensuite analysé ces échantillons par GC-MS. Les chromatogrammes obtenus ainsi qu'un agrandissement de la base sont présentés dans la figure 4.36. Le chromatogramme en rouge est obtenu en utilisant l'échantillonneur développé et le chromatogramme en vert est obtenu en utilisant un sac Tedlar. Les paramètres expérimentaux sont précisés dans la légende.

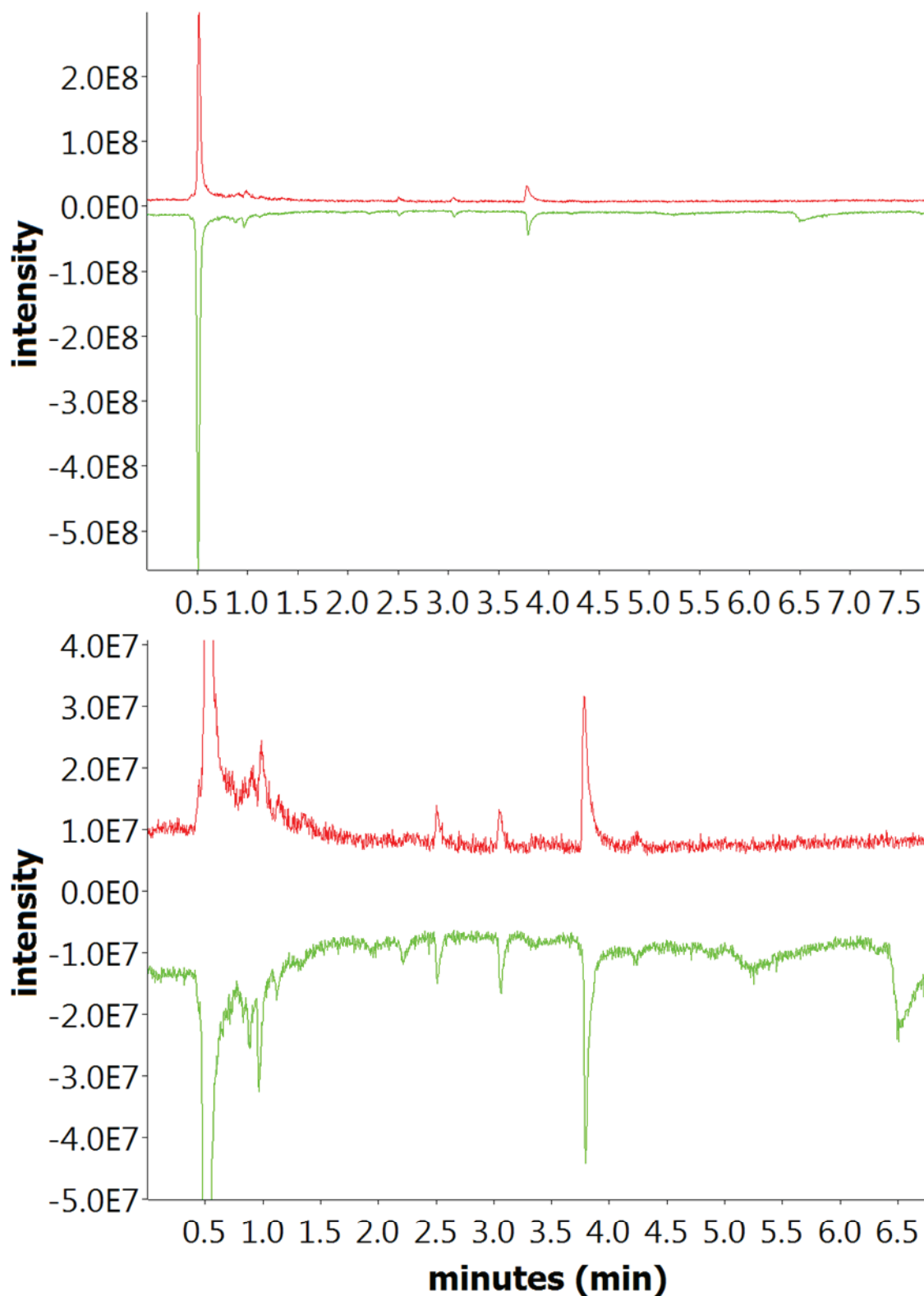


Figure 4.36. Comparaison des chromatogrammes d'air expiré obtenus avec l'échantillonneur développé, en rouge, et un sac Tedlar, en vert. Colonne 5 ms, 15 m, 0,25 mm, 0,25 μ m, 69 kPa d'hélium, 50 °C pendant 1 min, 10 °C/min jusqu'à 230 °C

Les chromatogrammes obtenus sont assez étonnants car ils ne comportent pas beaucoup de pics contrairement aux autres chromatogrammes d'air expiré présentés auparavant.

Les deux chromatogrammes sont toutefois assez proches et utiliser l'échantillonneur que nous avons développé ne semble pas apporter un bénéfice quant à la possible contamination par l'air de début d'expiration. Il permet cependant d'automatiser complètement le prélèvement sur le μ PC. Plus aucune manipulation n'est nécessaire comme lors de l'utilisation d'un sac Tedlar, il suffit à la personne de respirer dans le dispositif et le prélèvement s'effectue directement sur le μ PC.

4.4.2.4 Retours sur l'utilisation du prototype

Quatre problèmes ont été rencontrés lors de l'utilisation du dispositif. Comme expliqué précédemment, le débit de prélèvement est d'environ 30 ml/min sur les μ PC à cause de la perte de charge de ces derniers et de la différence de pression applicable par les pompes. Ainsi, même si le μ PC nécessite moins d'échantillon qu'un tube de TD, le temps de prélèvement reste à peu près identique. En effet, le μ PC nécessite environ cinq fois moins d'échantillon, mais le débit de prélèvement est 5 fois plus faible. Au final, la durée du prélèvement est d'une dizaine de minutes environ comme avec le ReCIVA et entraîne deux problèmes spécifiques à notre échantillonneur.

Le premier problème est lié au choix d'effectuer le prélèvement par une expiration par la bouche dans un embout pendant une dizaine de minutes. Ce choix nous permettait de réutiliser des filtres bactériens disponibles pour d'autres applications. Cependant, expirer par la bouche dans un tube pendant 10 min ne permet pas de fermer la bouche et d'avaler sa salive ce qui a pour conséquence de faire beaucoup baver. Avec un prélèvement d'une dizaine de minutes, ce phénomène est particulièrement désagréable. Le choix d'Owlstone d'utiliser un masque pour le prélèvement avec le ReCIVA semble plus adapté. De plus, en utilisant un masque, la personne respire dans des conditions plus proches de la normale, même si le port du masque peut être quelque peu inconfortable.

Le second problème est lié à la taille du prototype. La possibilité de le faire fonctionner sur batterie nous a amené à intégrer toutes les fonctions dans un unique boîtier. Cela rend finalement le boîtier de prélèvement assez volumineux et lourd. Comme le prélèvement se fait par la bouche, le boîtier doit être tenu à bout de bras pendant toute cette période, soit pendant une dizaine de minutes. Cela est finalement assez désagréable et probablement fatigant. Poser le boîtier sur un support semble une solution intéressante.

Un autre problème est lié à l'arrêt du prélèvement à la fin de chaque expiration. Il existe un décalage entre la fin de l'expiration et la fin du prélèvement. Ce décalage peut être lié au trop grand volume de tubulures entre le capteur de CO₂ et l'endroit où le patient souffle. Cela peut aussi être lié à l'algorithme utilisé. Le ReCIVA résout ce problème en incluant un capteur de pression dans le dispositif de prélèvement. Le capteur de pression détecte facilement la fin de l'expiration car la pression chute brusquement lors du passage de l'expiration à l'inspiration.

Enfin, un dernier problème est lié au capteur de CO₂. Il est nécessaire d'allumer le prototype une dizaine de minutes avant le début du prélèvement. Cela permet de chauffer le capteur de CO₂. Si cette étape préliminaire n'est pas effectuée, l'eau peut condenser sur le capteur ce qui empêche son fonctionnement. Si ce phénomène a lieu, la valeur renvoyée par le capteur est fausse et indique 1000000 ppm. Le ReCIVA rencontre le même genre de problème.

Pour tenter de s'affranchir des problèmes qui viennent d'être évoqués, la partie suivante analyse les avantages et les inconvénients des différents échantillonneurs existants pour faire ressortir le cahier des charges d'un échantillonneur idéal.

4.4.3 Avantages et inconvénient des systèmes existants

4.4.3.1 Analyse des dispositifs existants

Le μ PC ne nécessite qu'une seule expiration pour obtenir assez de matière pour une analyse. Cependant, les systèmes compatibles avec le μ PC ne permettent pas d'obtenir une quantité suffisante d'air de fin de respiration avec une seule expiration. Le BIO-VOC n'est pas compatible avec un transfert vers un μ PC et les sacs Tedlar ne permettent pas de prélever uniquement l'air de fin de respiration.

Les trois systèmes majoritairement utilisés dans la littérature pour préconcentrer l'air expiré pour des analyses hors ligne ont été décrits précédemment. Il s'agit du système BIO-VOC, du système ReCIVA et des sacs Tedlar. Le tableau 4.4 compare les différentes caractéristiques des échantillonneurs existants.

Tableau 4.4. Comparaison des caractéristiques des trois systèmes les plus utilisées pour l'échantillonnage de l'air expiré, d'après [321]

	 BIO-VOC	 ReCIVA	 Sac Tedlar
Compatibilité avec le μ PC	-	---	+++
Contamination de l'échantillon	+	+++	--
Temps de conservation	-	+	-
Prix	++	---	+++
Réutilisable	-	++	+
Volume prélevable	--	+++	+
Confort du patient	++	-	++
Facilité d'utilisation	+	++	+
Séparation air alvéolaire	+	+++	---
Temps de prélèvement	+++	---	+++
Protection bactérienne	-	+	-

Parmi les trois systèmes présentés, seul le sac Tedlar est compatible avec le μ PC, mais il ne permet pas de sélectionner la partie de l'air expiré qui est prélevée.

Le mode de fonctionnement du BIO-VOC est extrêmement simple et permet en partie de sélectionner l'air de fin de respiration. Cependant, la rigidité du dispositif ne permet pas d'utiliser une pompe pour transférer l'échantillon sur un μ PC. De plus, le volume est fixé par avance.

Le prélèvement avec le ReCIVA est basé sur un suivi en CO_2 . Cependant, le débit de prélèvement sur le tube est bien inférieur au débit d'expiration. Le débit expiratoire vaut environ 10 l/min et le débit de prélèvement est de 1 l/min maximum. Ainsi, lors de chaque expiration, seule une partie de l'air expiré est prélevée sur le tube. Cela explique en partie la durée du prélèvement. De plus, lors de l'injection avec le TD une partie de l'échantillon est

perdue. Finalement, seule une faible partie de l'air expiré est injectée dans le système d'analyse.

4.4.3.2 Cahier des charges

L'étude des avantages et inconvénients des échantillonneurs existants permet de faire ressortir le cahier des charges présenté dans le tableau 4.5.

Tableau 4.5 Cahier des charges de l'échantillonneur d'air expiré développé pour fonctionner avec la puce, d'après [321]

Fonctions	Contraintes	Niveau
Prélever l'air expiré	Partie de l'haleine prélevée	Air de fin respiration
	Préconcentration	Le système doit inclure la préconcentration sur la puce
	Temps de conservation	Celui du Tenax car préconcentration incluse dans le système
	Sensibilité de l'analyse	Au moins égale à celle obtenue en utilisant un sac Tedlar
	Contamination échantillon	La plus faible possible
	Type d'expiration	Bouche
	Filtre antibactérien	Oui
Être ergonomique	Réutilisable	Oui
	Temps de prélèvement	Une expiration
	Confort du patient	Pas de masque (claustrophobie)
	Facilité d'utilisation	Utilisable sans formation
	Fixation de la puce	Puce amovible facilement sans outils
	Prix	< 1 000 €
Être autonome et utilisable n'importe où	Alimentation	Batterie 12 V, 2 A
	Arrivée d'air pur	Non pour être complètement autonome

Ce cahier des charges a permis de faire ressortir une architecture qui sera décrite. Le but de cette architecture est de pouvoir prélever assez de matière avec une seule expiration tout en sélectionnant spécifiquement l'air de fin de respiration. Pour cela, il est nécessaire de prélever l'intégralité d'une expiration malgré le débit de prélèvement faible sur le μ PC. Utiliser un μ PC dans ce cas est un avantage, car comme montré dans le chapitre 3,

l'intégralité de l'échantillon prélevé est injectée dans le système d'analyse. Un second but de cette architecture est de limiter les éléments nécessaires au prélèvement. Ainsi, nous nous sommes affranchis du capteur de CO₂ qui ne permettait pas de sélectionner simplement la portion de l'air souhaité.

4.4.4 Vers un prélèvement sur expiration unique

4.4.4.1 Description de l'architecture

Sur la base du cahier des charges décrit précédemment, le dispositif imaginé pour prélever l'air de fin de respiration sur une expiration unique peut être considéré comme un mélange entre un sac Tedlar et un BIO-VOC. Un dessin 3D du dispositif est présenté la figure 4.37.

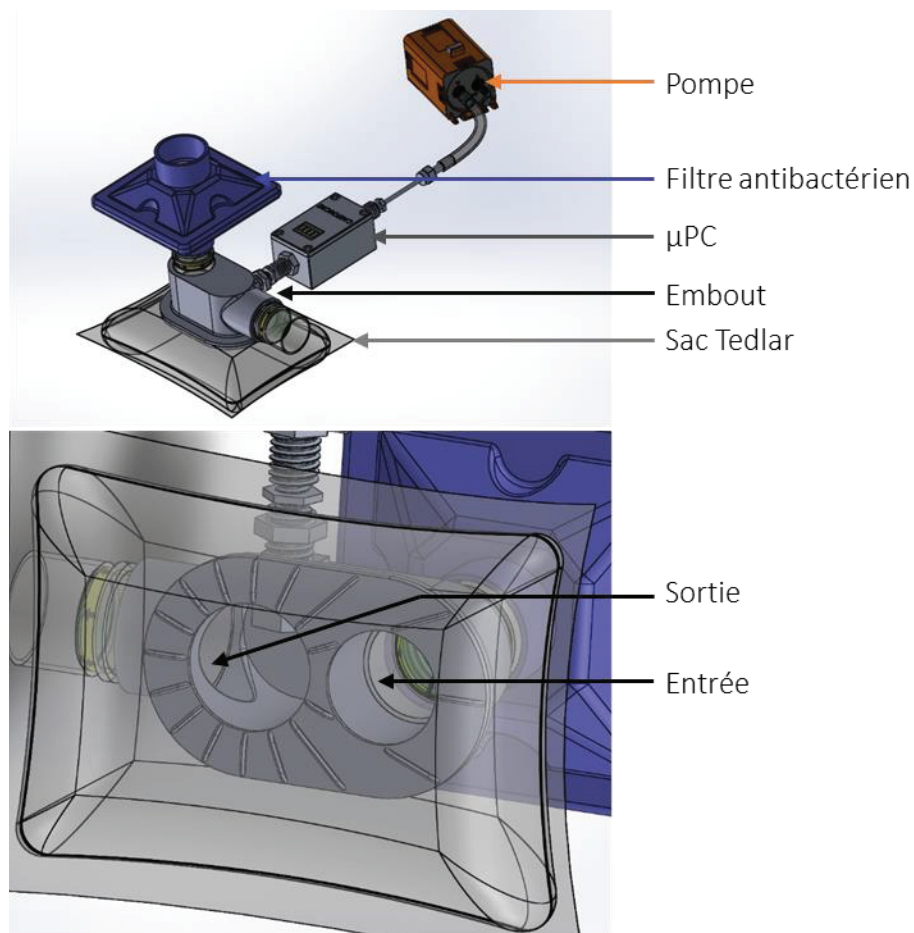


Figure 4.37. Dessin 3D de l'architecture proposée, d'après [321]

Le volume du sac Tedlar est fixé aux alentours de 200 ml, comme pour le BIO-VOC. À ce dispositif, nous avons ajouté un embout développé par nos soins, composé d'une entrée par laquelle la personne expire, une sortie par laquelle l'air expiré ressort, et une troisième voie sur laquelle est branché le µPC. Une expiration est composée de 300 ml d'air de début de respiration et de 300 ml d'air de fin de respiration. En effectuant une expiration complète à

travers le dispositif le sac se remplit d'abord avec l'air de début de respiration qui est ensuite expulsé hors du sac par l'air de fin de respiration. Ainsi, après une expiration complète dans le dispositif, seul l'air de fin de respiration est conservé à l'intérieur du sac. Le BIO-VOC fonctionne sur ce principe. Dans notre dispositif, une pompe transfère ensuite l'échantillon vers le μ PC branché sur la troisième entrée du sac. L'échantillon préconcentré sur le μ PC peut ensuite être analysé. Pour tester ce dispositif, nous avons fabriqué un prototype qui puisse être utilisé avec Primosamp. La partie suivante présente des résultats préliminaires.

4.4.4.2 Fabrication du dispositif basé sur un sac à trois voies

Un sac Tedlar possédant trois voies est nécessaire pour obtenir le dispositif qui vient d'être décrit. Ce type de sac n'existe pas commercialement. De plus, une expiration forcée par un petit orifice, comme ceux présents sur les sacs Tedlar, peut influencer la composition de l'air expiré. Pour ces raisons, nous avons développé les éléments de ce prototype. L'embout à trois voies a été conçu par CAO et réalisé par fabrication additive. Du film de type Tedlar a été acheté en rouleau pour donner la forme souhaitée au dispositif. Le Tedlar n'est pas le matériau le plus adapté pour le prélèvement de l'air expiré, mais il est facilement disponible sous de nombreuses formes. C'est pour cela que nous l'avons choisi pour réaliser les premiers dispositifs. Le prototype réalisé est présenté dans la figure 4.38.

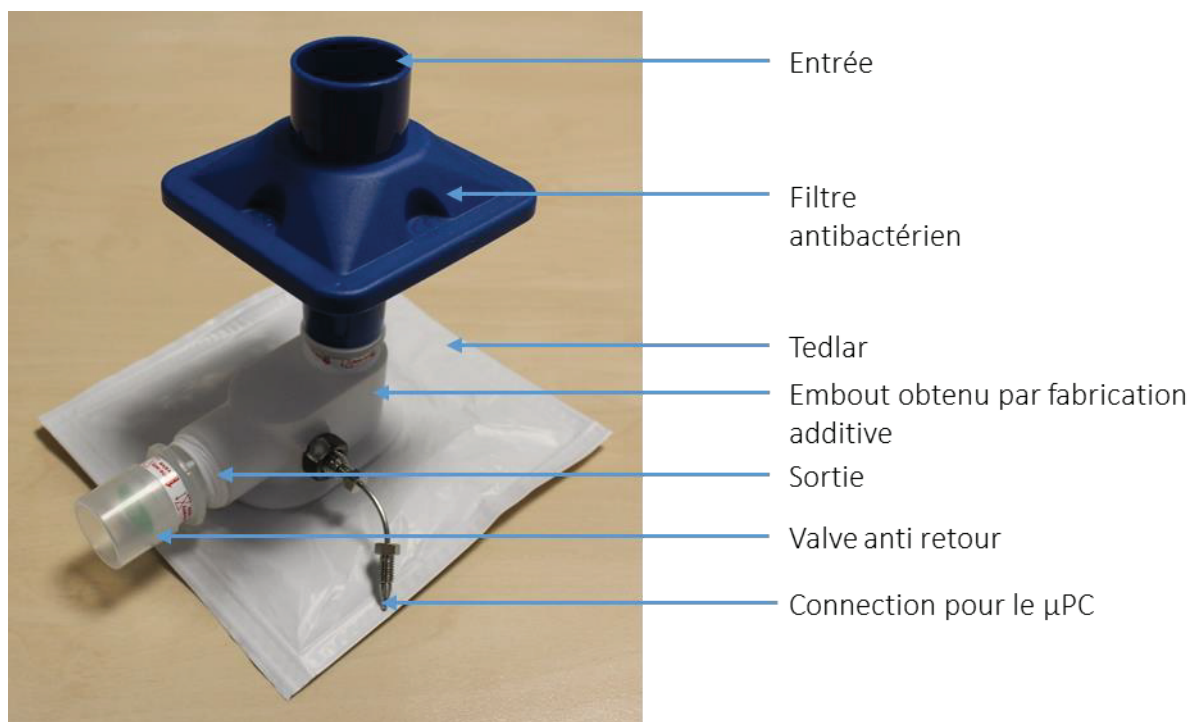


Figure 4.38. Dispositif construit pour le prélèvement de l'air expiré

Pour obtenir un sac de la forme souhaitée nous avons thermosoudé deux feuilles de Tedlar entre elles. Une des feuilles comporte un trou de la taille de l'embout afin de pouvoir l'insérer à l'intérieur. L'embout est conçu à partir de deux pièces obtenues par fabrication additive. Une pièce est positionnée à l'intérieur du sac et une à l'extérieur du sac. Le film de Tedlar est bloqué entre les deux pièces en collant les deux parties ensemble et le collage est censé assurer l'étanchéité du dispositif. Nous n'avons cependant pas réussi à obtenir des dispositifs totalement étanches car lorsqu'une personne souffle dans le dispositif l'air expiré fuit au niveau de la jonction entre le sac Tedlar et l'embout.

Au début du stage nous avons également commandé des sacs Tedlar deux voies, afin d'étudier l'intérêt de ce genre d'architecture. En effet, si un sac Tedlar deux voies permettait de prélever sélectivement l'air de fin de respiration, cela présenterait également un intérêt. La figure 4.39 montre une photographie de ce sac Tedlar deux voies. Des résultats préliminaires obtenus avec ces sacs sont présentés dans la partie suivante.



Figure 4.39. Photographie d'un sac Tedlar deux voies de 200 ml

4.4.4.3 Résultats préliminaires avec des sacs Tedlar deux voies

Nous avons demandé à plusieurs personnes de remplir un sac Tedlar de 1 l avec une entrée et des sacs Tedlar de 200 ml. Puis 115 ml sont transférés sur un μ PC et les échantillons sont analysés par GC-MS selon les conditions présentées précédemment. Ces tests ont été effectués pour deux personnes. Les chromatogrammes obtenus pour la personne A sont présentés dans la figure 4.40 et ceux pour la personne B dans la figure 4.41.

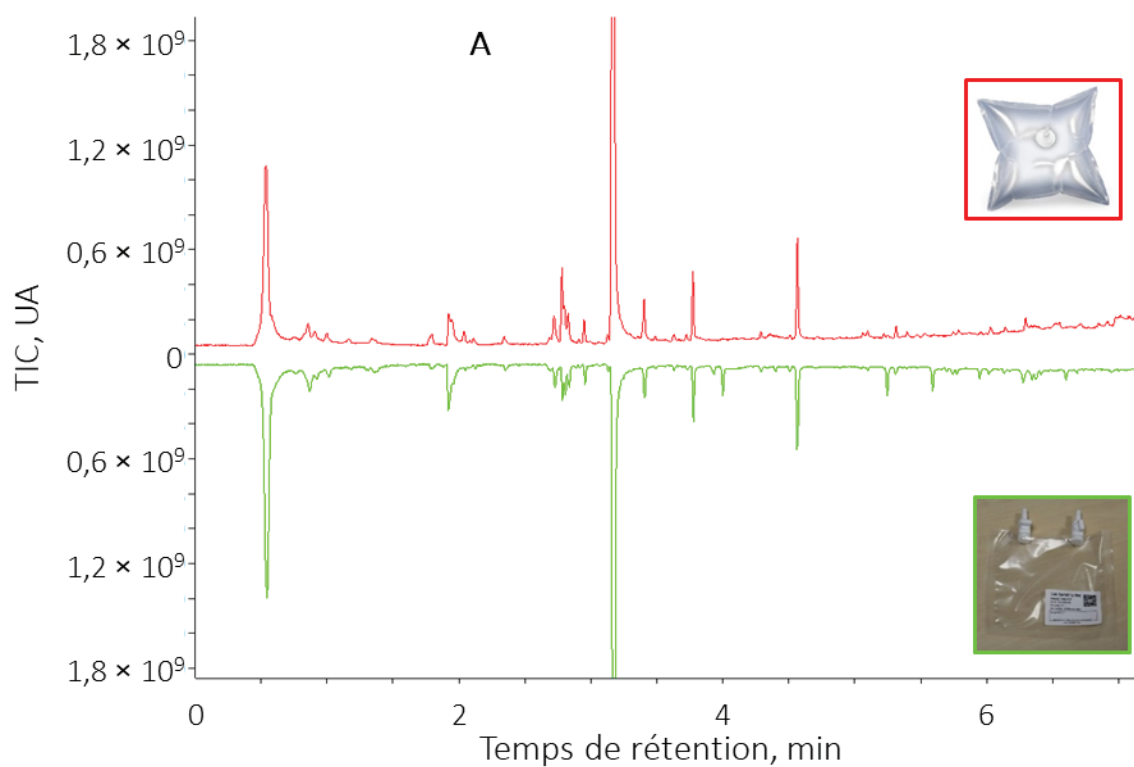


Figure 4.40. Comparaison des chromatogrammes obtenus par μ PC-GC-MS en utilisant un sac Tedlar de 1 l avec une voie, en rouge, ou un sac Tedlar de 200 ml avec deux voies, en vert, pour le prélèvement, pour le patient A, d'après [321]

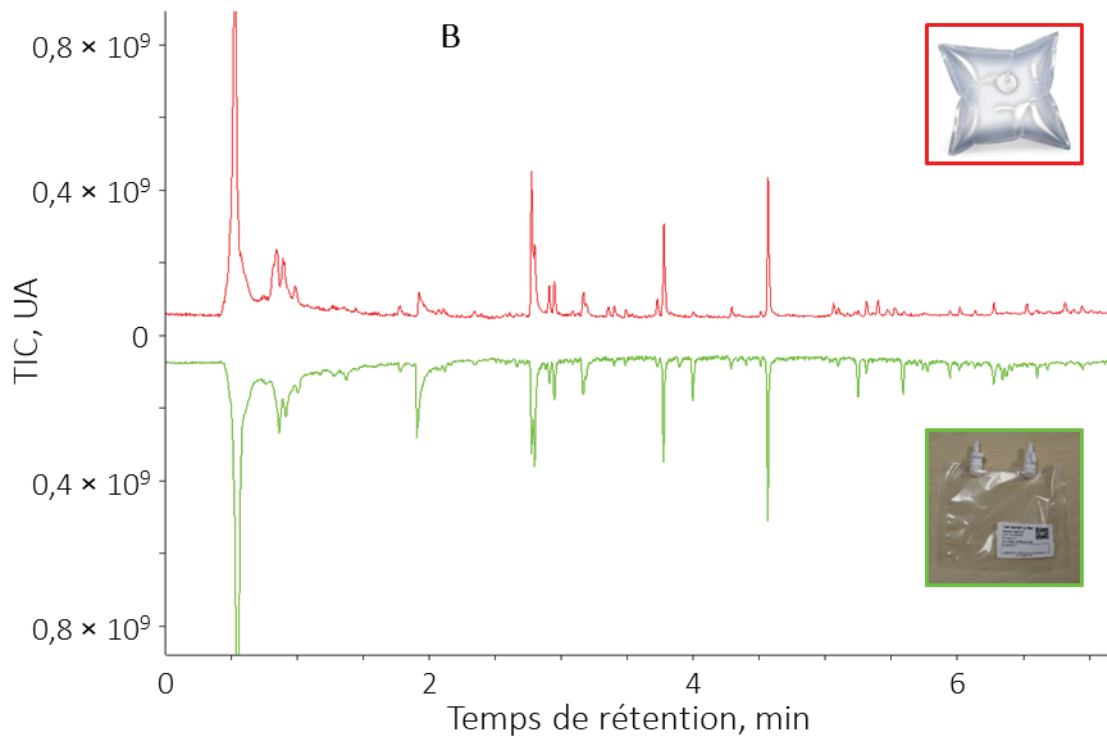


Figure 4.41. Comparaison des chromatogrammes obtenus par μ PC-GC-MS en utilisant un sac Tedlar de 1 l avec une voie en rouge, ou un sac Tedlar de 200 ml avec deux voies, en vert, pour le prélèvement, pour le patient B, d'après [321]

Comme le montrent les quatre chromatogrammes, nous n'observons pas de grandes différences entre les chromatogrammes obtenus avec le sac qui possède deux voies ou le sac à une voie, aussi bien pour la personne A que pour la personne B. Cela peut signifier que lors de l'expiration dans le sac deux voies, l'air de début de respiration et l'air de fin de respiration se mélangent et que ce mode de sélection de l'air de fin de respiration n'est pas adapté. Pour vérifier si un sac Tedlar de 200 ml permettait de prélever uniquement l'air de fin d'expiration sans se mélanger avec l'air de début de respiration, nous avons réalisé le montage présenté dans la figure 4.42.

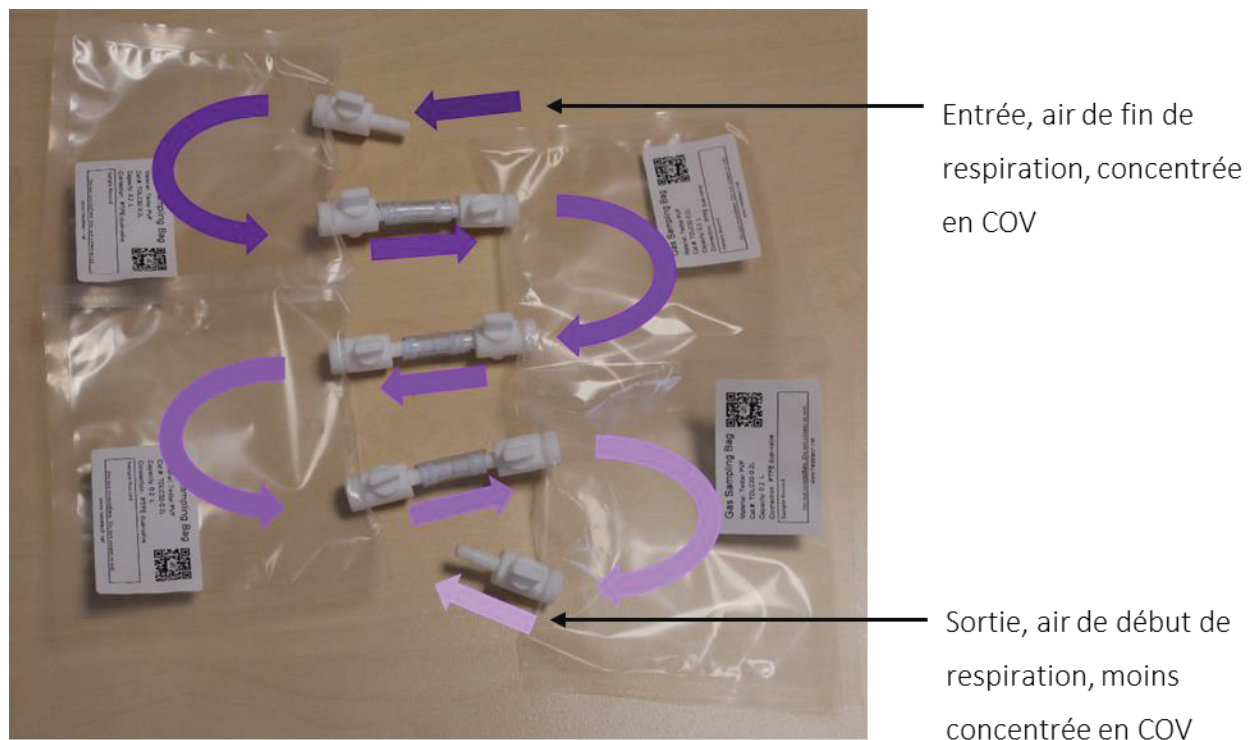


Figure 4.42. Montage utilisé pour vérifier si le sac Tedlar deux voies de 200 ml permet de sélectionner uniquement l'air de fin de respiration, (adapté de [321])

Il s'agit de quatre sacs Tedlar deux voies de 200 ml reliés entre eux. Lorsqu'une personne remplit ces sacs lors du prélèvement d'air expiré, le sac le plus proche de la personne devrait être rempli d'air de fin de respiration et le sac du début être rempli d'air de début de respiration. 115 ml du sac 1 et du sac 4 sont analysés avec un μ PC pour comparer la composition de ces deux prélèvements différents. Cette expérience a été effectuée trois fois pour la même personne. Les six chromatogrammes obtenus sont présentés par deux pour chaque expérience dans la figure 4.43.

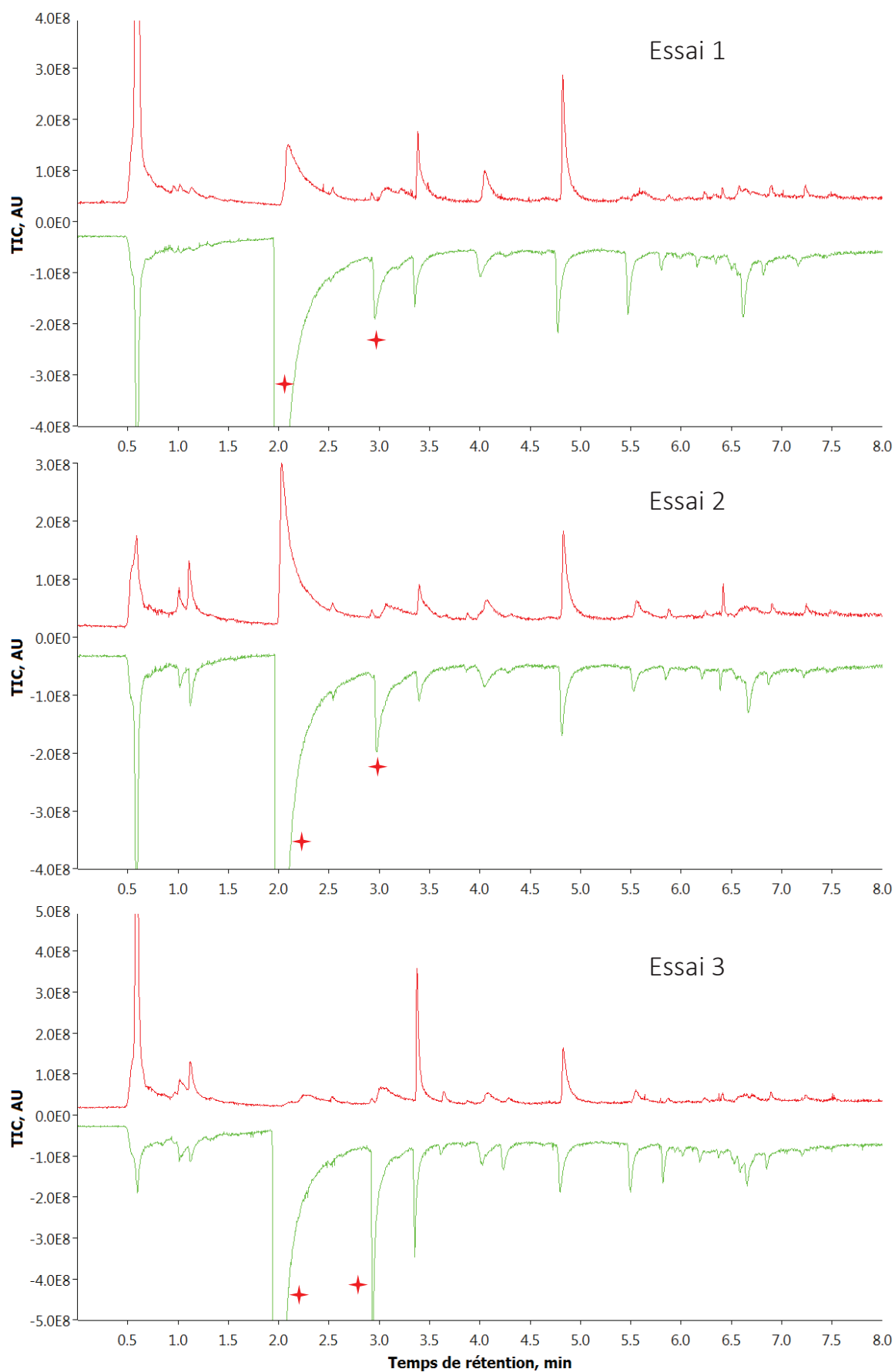


Figure 4.43. Comparaison des chromatogrammes d'air expiré contenu dans le sac 1 proche de la personne, en vert, et le sac 4 le plus éloigné de la personne, en rouge, pour trois essais

Les pics signalés par des étoiles correspondent aux artéfacts des sacs Tedlar. Ils sont présents dans la deuxième analyse, en vert, car l'échantillon a été stocké plus longtemps. La comparaison de chromatogrammes issus du premier sac et du dernier sac ne montre pas de grosses différences. Le deuxième échantillon est stocké plus longtemps ce qui peut entraîner la disparition de certaines molécules à cause de la dégradation ou de l'adsorption sur le sac, ou entraîner l'apparition d'autres molécules.

Il semble donc que les sacs Tedlar de 200 ml deux voies ne permettent pas de sélectionner l'air de fin de respiration. Cela peut être lié à la taille des entrées et des sorties qui entraîne un mélange de l'air de début et de fin de respiration

4.4.5 Conclusion sur les échantillonneurs d'air expiré

Dans ce sous-chapitre, nous avons présenté un travail d'instrumentation et de caractérisation de deux prototypes développés pour valoriser la réduction des volumes d'échantillon permise par les μ PC.

Un premier prototype basé sur le suivi du taux de CO_2 dans l'air expiré nous a permis d'appréhender les différentes problématiques importantes pour un échantillonneur d'air expiré. Le prélèvement par la bouche n'est pas adapté pour de longues périodes car il empêche d'avaler sa salive. La détection des différentes portions de l'air expiré grâce au taux de CO_2 doit être soignée et nécessite des algorithmes adaptés. L'intégration de tous les éléments, pompes, électroniques, écran, dans un boîtier porté à la main est inadaptée pour des prélèvements qui durent une dizaine de minutes.

Suite à l'étude de ces inconvénients et des avantages et des inconvénients des échantillonneurs existants, nous avons proposé une seconde architecture. Nous voulions simplifier au maximum l'architecture de l'échantillonneur et souhaitons obtenir le prélèvement d'une quantité suffisante d'air de fin de respiration grâce à une unique expiration. Les expériences concernant ce deuxième prototype, n'ont pas pu être menées à leurs termes. Nous avons également effectués quelques tests, peu concluants, en utilisant des sacs Tedlar deux voies qui ne sont cependant pas représentatifs du mode de fonctionnement du second prototype que nous avons proposé.

Tous ces travaux nous ont permis d'engendrer beaucoup de savoir-faire sur les échantillonneurs d'air expiré et méritent d'être poursuivis. En effet, un dispositif de

prélèvement fonctionnant sur une expiration unique grâce à l'utilisation de μ PC présente deux avantages pour le développement de l'analyse de l'air expiré. Il faciliterait beaucoup le prélèvement et rendrait possible l'intégration de l'étape de préconcentration dans un système simple.

Conclusion générale et perspectives

L'analyse de l'air expiré présente de nombreux avantages pour des applications médicales. En effet, le prélèvement de cet échantillon est à la fois non invasif, simple à effectuer pour les personnels médicaux, peu pathogène, et répétable à une fréquence élevée. Afin de développer l'usage de cet échantillon, différents points nécessitent d'être étudiés plus en détail.

Dans le premier chapitre consacré à l'étude de la bibliographie, nous avons montré que l'air expiré constitue un échantillon complexe et variable. Les sources de variabilité, aussi bien physiologiques qu'environnementales, sont nombreuses. Différentes techniques analytiques sont utilisées pour résoudre cette complexité. Malgré leur diversité et leurs avantages respectifs, des difficultés demeurent tout au long de la chaîne analytique, tant sur les conditions du prélèvement de l'échantillon, de son transfert au système d'analyse que sur l'injection, l'analyse et le traitement de données. La mise en place de la méthodologie de validation des marqueurs nécessite également d'être minutieuse. Les pratiques spécifiques à chaque laboratoire amplifient ces différents problèmes. Cela complique la comparaison des résultats entre les études et la compréhension des étapes qui nécessitent le plus de travail. Ces différentes raisons expliquent, entre autres, que seuls quelques tests simples sont autorisés à l'heure actuelle. Cependant, de nombreux essais cliniques utilisent actuellement le dispositif de prélèvement ReCIVA de la société Owlstone medical ainsi que des méthodes d'analyse identiques. Ces essais réalisés sur de grandes cohortes multicentriques, surement supérieures à 3000 personnes, permettront de savoir si cette méthodologie résout certains des problèmes évoqués.

À la suite de ce constat, nous avons présenté l'intérêt des micropréconcentrateurs et la GC $\times$ GC, deux outils analytiques peu employés pour l'analyse de l'air expiré. Leur intérêt potentiel concernait quatre aspects : le prélèvement, la préconcentration et l'injection, et pour finir l'analyse. Nous avons d'abord décrit les systèmes de prélèvement miniaturisé à base de puces en silicium qui existent dans la littérature et montré qu'ils permettent de simplifier les étapes de prélèvement et d'injection et de réduire les consommations électriques. Nous avons ensuite décrit les quelques exemples publiés dans la littérature de

dispositifs qui intègrent des micropréconcentrateurs pour l'analyse de l'air expiré. Nous avons également détaillé les avantages de la GC $\times$ GC pour l'analyse de l'air expiré et montré qu'une vingtaine de publications existent actuellement dans ce domaine. Nous avons finalement justifié de travailler avec un modulateur simple en décrivant le fonctionnement des différents modes de modulation et en expliquant les problématiques du laboratoire : systèmes d'analyse simples et portables, sans consommables, facilement miniaturisables et alimentés par batterie.

Ainsi, dans la partie expérimentale, nous avons commencé par caractériser un système de prélèvement et d'injection des COV, portable et fonctionnant sur batterie, basé sur un micropréconcentrateur. Nous avons ensuite étudié la variabilité de ce système et nous avons également comparé ses performances à un appareil de thermodésorption de laboratoire, travail peu décrit dans la littérature. Nos expériences ont montré que les performances du micropréconcentrateur pour la préconcentration et l'injection de mélanges simples et de COV exhalés sont proches de celles de la thermodésorption de laboratoire avec trois avantages majeurs : réduction du volume d'échantillon, simplification de l'architecture, intégration dans un dispositif portable. Finalement, l'analyse des marqueurs exhalés du tabagisme présentée dans le quatrième chapitre a démontré l'intérêt des micropréconcentrateurs dans un cas réel. Nous avons également montré que ces résultats obtenus avec des micropréconcentrateurs sont en accord avec des résultats déjà décrits dans la littérature et obtenus avec des systèmes de laboratoire. Nous avons aussi travaillé sur une nouvelle architecture d'échantillonneur d'air expiré afin de tirer pleinement profit des avantages du micropréconcentrateur : réduction des volumes d'échantillon et intégrabilité. Ces travaux préliminaires nous ont permis de comprendre les points importants pour le développement d'un échantillonneur d'air expiré. Ces travaux méritent d'être poursuivis afin d'atteindre un prélèvement d'air de fin de respiration sur une expiration unique.

Plusieurs points liés à la fabrication des micropréconcentrateurs peuvent être perfectionnés. Un procédé de fonctionnalisation collective des galettes de silicium, compatible en salle blanche, présenterait un grand intérêt pour éviter le remplissage manuel de chaque puce. De plus, le dépôt collectif de l'adsorbant pourrait peut-être résoudre la variabilité de perte de charge entre les puces. D'autre part, les connexions fluidiques sont également améliorables.

En effet, les capillaires utilisés pour ces connexions sont pour le moment collés un par un. Des méthodes collectives qui assureraient des connexions étanches présenteraient un intérêt.

Malgré ces points à améliorer, tous les résultats obtenus durant cette thèse confirment l'intérêt des micropréconcentrateurs pour l'analyse des COV exhalés, aussi bien couplés à la GC-MS de laboratoire que pour être intégré dans un futur analyseur d'air expiré portable.

Nos travaux sur la GC × GC ont débuté par la construction d'un modulateur fluidique récemment décrit dans la littérature. Nous avons ensuite montré qu'il était compatible avec une injection par thermodésorption. Nous avons montré que ce modulateur fluidique permet de moduler les COV très volatils présents dans l'air expiré. La comparaison de notre méthode bidimensionnelle à la GC-MS montre bien une augmentation de l'espace de séparation avec des rapports signal sur bruit équivalents à ceux obtenus par GC-MS, contrairement à ce qui est observé avec d'autres types de modulateurs. Finalement, à partir des résultats obtenus à l'aide de différents plans d'expérience, nous avons mis en évidence que l'amélioration de ce modulateur nécessitait un travail minutieux malgré la simplicité de son architecture. Cela s'explique par l'interdépendance des différents facteurs, comme discuté brièvement dans la conclusion du chapitre. La grande simplicité de fabrication et de fonctionnement de ce modulateur présente tout de même un intérêt malgré les points que nous venons d'évoquer. De manière générale, nous estimons que la GC × GC présente un grand intérêt pour l'analyse des COV exhalés en raison des deux dimensions de séparation différentes qui permettent de résoudre en partie la grande variabilité des structures, des volatilités et des concentrations des COV contenus dans cet échantillon.

Finalement, nous avons travaillé sur les marqueurs d'une maladie métabolique, la phénylcétonurie. Cette pathologie présente un intérêt car les marqueurs sont bien décrits dans la littérature et spécifiques. Cependant, les groupes acides carboxyliques et amines des marqueurs compliquent l'analyse directe de ces composés par GC. Nous avons commencé par travailler sur des simulants et montré que certains de ces marqueurs étaient analysables directement par GC. Nous avons ensuite effectué des analyses sur des échantillons réels d'urine et d'air expiré d'une personne atteinte de phénylcétonurie. Malgré les travaux préalables effectués pour améliorer l'analyse des marqueurs, nos conditions de prélèvement

et d'analyse ne nous ont pas permis d'observer ces composés dans l'air expiré d'une patiente. Ces expériences nous ont cependant permis de sortir nos instruments du laboratoire, d'effectuer des prélèvements en milieu hospitalier et de confronter nos outils analytiques à des échantillons réels.

Pour finir, nous citerons quelques perspectives qui nous semblent intéressantes. Lors de l'utilisation de nos nouveaux outils d'analyses, nous ne savions pas comment qualifier leur intérêt en particulier pour l'analyse des COV exhalés. Nous ne disposions pas de cas simples et standards, d'où nos recherches bibliographiques sur le tabagisme et les travaux effectués sur la phénylcétonurie. Des mélanges de molécules représentatives de l'air expiré et des procédures standards permettraient d'étalonner les nouveaux outils analytiques et de les comparer facilement. Ce genre de propositions existe dans le domaine de la métabolomique, domaine dont fait partie l'analyse des COV exhalés, et dans les sciences « omics » en général. Cependant, la fabrication de matériaux de référence certifiés comme cela existe dans d'autres domaines paraît plus compliquée pour un mélange de COV à l'état gazeux. La définition d'un cas réel standard pour effectuer des analyses simples permettrait également de mieux comparer les méthodes d'analyse et d'appréhender les limites des différentes étapes, conditions d'échantillonnage, modes d'échantillonnage, système d'analyse. Ce cas simple ne nécessiterait pas forcément d'être utile d'un point de vue médical, mais devrait être peu sensible à la variabilité environnementale ou physiologique. La création d'un consortium autour du *peppermint protocol* [322] semble aller dans ce sens. Le cas étudié consiste à administrer une gélule qui contient du menthol et certains de ses dérivés puis de suivre leur cinétique d'élimination dans l'air exhalé. Ce protocole est inoffensif, non invasif et très simple à mettre en place, ce qui est moins le cas pour notre étude concernant des fumeurs. Cette proposition, qui émane d'autres groupes de recherche plus implantés dans le domaine de l'air expiré, démontre cependant l'intérêt de suivre un événement environnemental au cours du temps pour étudier l'intérêt d'une méthode d'analyse, comme nous l'avons fait pour caractériser notre micropréconcentrateur. Un appel à participation a eu lieu en juin 2018 lors du *Breath Summit*. Au vu des plannings présentés à ce moment-là, les premiers résultats seront disponibles d'ici un an.

Plus généralement, les informations présentées dans ce manuscrit nous amènent à penser qu'un dépistage précoce et large spectre de maladies grâce à l'analyse des COV exhalés nécessite encore de nombreuses recherches. D'autres applications comme le suivi de maladies ou d'expositions nous paraissent nettement plus vraisemblables à l'heure actuelle. Des marqueurs peu spécifiques dans l'air expiré pourraient permettre le suivi simple de malades dont le diagnostic est déjà établi, comme c'est déjà le cas pour les alcanes marqueurs de stress oxydatif dans le suivi de rejet de transplantation cardiaque. Les cas de suivi d'expositions environnementales où les marqueurs recherchés sont directement les composés ou leurs métabolites semblent également plus favorables. En effet, ces deux cas de figure permettent de s'affranchir d'une partie de la variabilité physiologique et environnementale car chaque personne constitue son propre témoin. Finalement, ces cas plus simples permettraient également d'augmenter nos connaissances sur l'air expiré avant d'utiliser ce type d'échantillon pour des applications plus complexes.

Références

- [1] J.D. Fenske, S.E. Paulson, Human Breath Emissions of VOCs, *Journal of the Air & Waste Management Association*. 49 (1999) 594–598. doi:10.1080/10473289.1999.10463831.
- [2] EUR-Lex - 31999L0013 - FR, 1999. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31999L0013:FR:HTML> (accessed April 3, 2018).
- [3] L. Pauling, A.B. Robinson, R. Teranishi, P. Cary, Quantitative Analysis of Urine Vapor and Breath by Gas-Liquid Partition Chromatography, *PNAS*. 68 (1971) 2374–2376.
- [4] M. Phillips, V. Basa-Dalay, G. Bothamley, R.N. Cataneo, P.K. Lam, M.P.R. Natividad, P. Schmitt, J. Wai, Breath biomarkers of active pulmonary tuberculosis, *Tuberculosis*. 90 (2010) 145–151. doi:10.1016/j.tube.2010.01.003.
- [5] A. Smolinska, D.I. Tedjo, L. Blanchet, A. Bodelier, M.J. Pierik, A.A.M. Masclee, J. Dallinga, P.H.M. Savelkoul, D.M.A.E. Jonkers, J. Penders, F.-J. van Schooten, Volatile metabolites in breath strongly correlate with gut microbiome in CD patients, *Analytica Chimica Acta*. 1025 (2018) 1–11. doi:10.1016/j.aca.2018.03.046.
- [6] J.D. Pleil, M.A. Stiegel, J.R. Sobus, Q. Liu, M.C. Madden, Observing the human exposome as reflected in breath biomarkers: heat map data interpretation for environmental and intelligence research., *Journal of Breath Research*. 5 (2011) 37104. doi:10.1088/1752-7155/5/3/037104.
- [7] B. de L. 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) 014001. doi:10.1088/1752-7155/8/1/014001.
- [8] C. Pasteur, *Guide des analyses spécialisées*, 5th ed., Elsevier Masson, 2007. https://www.elsevier-masson.fr/guide-des-analyses-specialisees-9782842998370.html?gclid=Cj0KCQjwxtPYBRD6ARIsAKs1XJ5wddsRSMjGnjEqaltXEJG_qLV5-GHT7cyer8w1oYUyqEPjByeZoUaAmx3EALw_wcB (accessed June 4, 2018).
- [9] P. Brinkman, M.A. van de Pol, M.G. Gerritsen, L.D. Bos, T. Dekker, B.S. Smids, A. Sinha, C.J. Majoor, M.M. Sneeboer, H.H. Knobel, T.J. Vink, F.H. de Jongh, R. Lutter, P.J. Sterk, N. Fens, Exhaled breath profiles in the monitoring of loss of control and clinical recovery in asthma, *Clin. Exp. Allergy*. (2017). doi:10.1111/cea.12965.
- [10] P.E. Silkoff, M. Carlson, T. Bourke, R. Katial, E. Ögren, S.J. Szeffler, The Aerocrine exhaled nitric oxide monitoring system NIOX is cleared by the US Food and Drug Administration for monitoring therapy in asthma, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 114 (2004) 1241–1256. doi:10.1016/j.jaci.2004.08.042.
- [11] M. Caldeira, R. Perestrelo, A.S. Barros, M.J. Bilelo, A. Morête, J.S. Câmara, S.M. Rocha, Allergic asthma exhaled breath metabolome: A challenge for comprehensive two-dimensional gas chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1254 (2012) 87–97. doi:10.1016/j.chroma.2012.07.023.
- [12] M. Caldeira, A.S. Barros, M.J. Bilelo, A. Parada, J.S. Câmara, S.M. Rocha, Profiling allergic asthma volatile metabolic patterns using a headspace-solid phase

- microextraction/gas chromatography based methodology, *Journal of Chromatography A*. 1218 (2011) 3771–3780. doi:10.1016/j.chroma.2011.04.026.
- [13] A. Smolinska, E.M.M. Klaassen, J.W. Dallinga, K.D.G. van de Kant, Q. Jobsis, E.J.C. Moonen, O.C.P. van Schayck, E. Dompeling, F.J. van Schooten, Profiling of Volatile Organic Compounds in Exhaled Breath As a Strategy to Find Early Predictive Signatures of Asthma in Children, *PLoS ONE*. 9 (2014) e95668. doi:10.1371/journal.pone.0095668.
- [14] W. Ma, P. Gao, J. Fan, Y. Hashi, Z. Chen, Determination of breath gas composition of lung cancer patients using gas chromatography/mass spectrometry with monolithic material sorptive extraction, *Biomed. Chromatogr.* 29 (2015) 961–965. doi:10.1002/bmc.3385.
- [15] W. Filipiak, A. Sponring, A. Filipiak, C. Ager, J. Schubert, W. Miekisch, A. Amann, J. Troppmair, TD-GC-MS Analysis of Volatile Metabolites of Human Lung Cancer and Normal Cells In vitro, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 19 (2010) 182–195. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0162.
- [16] Y. Saalberg, M. Wolff, VOC breath biomarkers in lung cancer, *Clinica Chimica Acta*. 459 (2016) 5–9. doi:10.1016/j.cca.2016.05.013.
- [17] A. Gaida, O. Holz, C. Nell, S. Schuchardt, B. Lavae-Mokhtari, L. Kruse, U. Boas, J. Langejuergen, M. Allers, S Zimmermann, C. Vogelmeier, A.R. Koczulla, J.M. Hohlfeld, A dual center study to compare breath volatile organic compounds from smokers and non-smokers with and without COPD, *J. Breath Res.* 10 (2016) 026006. doi:10.1088/1752-7155/10/2/026006.
- [18] C.O. Phillips, Y. Syed, N.M. Parthaláin, R. Zwigelaar, T.C. Claypole, K.E. Lewis, Machine learning methods on exhaled volatile organic compounds for distinguishing COPD patients from healthy controls, *J. Breath Res.* 6 (2012) 036003. doi:10.1088/1752-7155/6/3/036003.
- [19] P. Montuschi, Chapter 19 - Measurement of Biomarkers of Oxidative Stress and Airway Inflammation in Exhaled Breath Condensate: Methodology and Potential Applications in Patients with COPD and Healthy Smokers, in: *Volatile Biomarkers*, Elsevier, Boston, 2013: pp. 360–381. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444626134000192> (accessed June 23, 2016).
- [20] C.D. Cox, J. Parker, Use of 2-aminoacetophenone production in identification of *Pseudomonas aeruginosa*., *J. Clin. Microbiol.* 9 (1979) 479–484.
- [21] A.J. Scott-Thomas, M. Syhre, P.K. Pattemore, M. Epton, R. Laing, J. Pearson, S.T. Chambers, 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung, *BMC Pulmonary Medicine*. 10 (2010) 56. doi:10.1186/1471-2466-10-56.
- [22] A. Scott-Thomas, J. Pearson, S. Chambers, Potential sources of 2-aminoacetophenone to confound the *Pseudomonas aeruginosa* breath test, including analysis of a food challenge study, *J. Breath Res.* 5 (2011) 046002. doi:10.1088/1752-7155/5/4/046002.
- [23] A.S. Sahota, R. Gowda, R.P. Arasaradnam, E. Daulton, R.S. Savage, J.R. Skinner, E. Adams, S.A. Ward, J.A. Covington, A simple breath test for tuberculosis using ion mobility: A pilot study, *Tuberculosis*. (n.d.). doi:10.1016/j.tube.2016.05.005.

- [24] A. Scott-Thomas, M. Epton, S. Chambers, Validating a breath collection and analysis system for the new tuberculosis breath test, *J. Breath Res.* 7 (2013) 037108. doi:10.1088/1752-7155/7/3/037108.
- [25] M. Phillips, R.N. Cataneo, C. Saunders, P. Hope, P. Schmitt, J. Wai, Volatile biomarkers in the breath of women with breast cancer, *J. Breath Res.* 4 (2010) 026003. doi:10.1088/1752-7155/4/2/026003.
- [26] L. Guo, C. Wang, C. Chi, X. Wang, S. Liu, W. Zhao, C. Ke, G. Xu, E. Li, Exhaled breath volatile biomarker analysis for thyroid cancer, *Translational Research*. 166 (2015) 188–195. doi:10.1016/j.trsl.2015.01.005.
- [27] Z. Wang, C. Wang, Is breath acetone a biomarker of diabetes? A historical review on breath acetone measurements, *J. Breath Res.* 7 (2013) 037109. doi:10.1088/1752-7155/7/3/037109.
- [28] H. Amal, M. Leja, K. Funka, I. Lasina, R. Skapars, A. Sivins, G. Ancans, I. Kikuste, A. Vanags, I. Tolmanis, A. Kirsners, L. Kupcinskas, H. Haick, Breath testing as potential colorectal cancer screening tool, *Int. J. Cancer*. 138 (2016) 229–236. doi:10.1002/ijc.29701.
- [29] C. Wang, C. Ke, X. Wang, C. Chi, L. Guo, S. Luo, Z. Guo, G. Xu, F. Zhang, E. Li, Noninvasive detection of colorectal cancer by analysis of exhaled breath, *Anal Bioanal Chem.* 406 (2014) 4757–4763. doi:10.1007/s00216-014-7865-x.
- [30] B. Buszewski, A. Ulanowska, T. Ligor, N. Denderz, A. Amann, Analysis of exhaled breath from smokers, passive smokers and non-smokers by solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry, *Biomed. Chromatogr.* 23 (2009) 551–556. doi:10.1002/bmc.1141.
- [31] I. Kohl, J. Herbig, J. Dunkl, A. Hansel, M. Daniaux, M. Hubalek, Chapter 6 - Smokers Breath as Seen by Proton-Transfer-Reaction Time-of-Flight Mass Spectrometry (PTR-TOF-MS), in: *Volatile Biomarkers*, Elsevier, Boston, 2013: pp. 89–116. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444626134000064> (accessed June 23, 2016).
- [32] S.M. Gordon, Identification of exposure markers in smokers' breath, *Journal of Chromatography A*. 511 (1990) 291–302. doi:10.1016/S0021-9673(01)93292-3.
- [33] K. Witt, S. Reulecke, A. Voss, Discrimination and characterization of breath from smokers and non-smokers via electronic nose and GC/MS analysis, in: *2011 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBC, 2011*: pp. 3664–3667. doi:10.1109/IEMBS.2011.6090618.
- [34] S. Ghimenti, S. Tabucchi, F.G. Bellagambi, T. Lomonaco, M. Onor, M.G. Trivella, R. Fuoco, F. Di Francesco, Determination of sevoflurane and isopropyl alcohol in exhaled breath by thermal desorption gas chromatography–mass spectrometry for exposure assessment of hospital staff, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 106 (2015) 218–223. doi:10.1016/j.jpba.2014.11.052.
- [35] M. Storer, K. Curry, M. Squire, S. Kingham, M. Epton, Breath testing and personal exposure—SIFT-MS detection of breath acetonitrile for exposure monitoring, *J. Breath Res.* 9 (2015) 036006. doi:10.1088/1752-7155/9/3/036006.

- [36] S. Erhart, A. Amann, E. Haberlandt, G. Edlinger, A. Schmid, W. Filipiak, K. Schwarz, P. Mochalski, K. Rostasy, D. Karall, S. Scholl-Bürgi, 3-Heptanone as a potential new marker for valproic acid therapy, *J. Breath Res.* 3 (2009) 016004. doi:10.1088/1752-7155/3/1/016004.
- [37] M.T. Gaugg, A. Engler, Y. Nussbaumer-Ochsner, L. Bregy, A.S. Stöberl, T. Gaisl, Tobias Bruderer, R. Zenobi, M. Kohler, P.M.-L. Sinues, Metabolic effects of inhaled salbutamol determined by exhaled breath analysis, *J. Breath Res.* 11 (2017) 046004. doi:10.1088/1752-7163/aa7caa.
- [38] P.M.-L. Sinues, M. Kohler, S. A. Brown, R. Zenobi, R. Dallmann, Gauging circadian variation in ketamine metabolism by real-time breath analysis, *Chemical Communications*. 53 (2017) 2264–2267. doi:10.1039/C6CC09061C.
- [39] K. Sawyer, J.M. Samet, A.J. Ghio, J.D. Pleil, M.C. Madden, Responses measured in the exhaled breath of human volunteers acutely exposed to ozone and diesel exhaust, *J. Breath Res.* 2 (2008) 037019. doi:10.1088/1752-7155/2/3/037019.
- [40] M. Phillips, R. Byrnes, R.N. Cataneo, A. Chaturvedi, P.D. Kaplan, Mark Libardoni, V. Mehta, M. Mundada, U. Patel, N. Ramakrishna, P.B. Schiff, X. Zhang, Detection of volatile biomarkers of therapeutic radiation in breath, *J. Breath Res.* 7 (2013) 036002. doi:10.1088/1752-7155/7/3/036002.
- [41] M. Phillips, R.N. Cataneo, A. Chaturvedi, P.D. Kaplan, M. Libardoni, M. Mundada, U. Patel, K.D. Thrall, X. Zhang, Breath Biomarkers of Whole-body Gamma Irradiation in the Göttingen Minipig, *Health Physics*. 108 (2015) 538–546. doi:10.1097/HP.0000000000000272.
- [42] L. Blanchet, A. Smolinska, A. Baranska, E. Tigchelaar, M. Swertz, A. Zhernakova, J.W. Dallinga, C. Wijmenga, F.J. van Schooten, Factors that influence the volatile organic compound content in human breath, *J. Breath Res.* 11 (2017) 016013. doi:10.1088/1752-7163/aa5cc5.
- [43] O. Lawal, W.M. Ahmed, T.M.E. Nijssen, R. Goodacre, S.J. Fowler, Exhaled breath analysis: a review of ‘breath-taking’ methods for off-line analysis, *Metabolomics*. 13 (2017) 110. doi:10.1007/s11306-017-1241-8.
- [44] M.A.G. Wallace, J.D. Pleil, Evolution of clinical and environmental health applications of exhaled breath research: Review of methods and instrumentation for gas-phase, condensate, and aerosols, *Analytica Chimica Acta*. 1024 (2018) 18–38. doi:10.1016/j.aca.2018.01.069.
- [45] C. Lourenço, C. Turner, Breath Analysis in Disease Diagnosis: Methodological Considerations and Applications, *Metabolites*. 4 (2014) 465–498. doi:10.3390/metabo4020465.
- [46] M. Xu, Z. Tang, Y. Duan, Y. Liu, GC-Based Techniques for Breath Analysis: Current Status, Challenges, and Prospects, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 46 (2016) 291–304. doi:10.1080/10408347.2015.1055550.
- [47] Z. Tang, Y. Liu, Y. Duan, Breath analysis: technical developments and challenges in the monitoring of human exposure to volatile organic compounds, *Journal of Chromatography B*. 1002 (2015) 285–299. doi:10.1016/j.jchromb.2015.08.041.

- [48] J.D. Beauchamp, J.D. Pleil, Simply breath-taking? Developing a strategy for consistent breath sampling, *J. Breath Res.* 7 (2013) 042001. doi:10.1088/1752-7155/7/4/042001.
- [49] A.S. Modak, Regulatory issues on breath tests and updates of recent advances on [13 C]-breath tests, *J. Breath Res.* 7 (2013) 037103. doi:10.1088/1752-7155/7/3/037103.
- [50] H. Lahlou, X. Vilanova, X. Correig, Gas phase micro-preconcentrators for benzene monitoring: A review, *Sensors & Actuators: B. Chemical. Complete* (2013) 198–210. doi:10.1016/j.snb.2012.10.004.
- [51] FERNANDEZ Xavier, FILIPPI Jean-Jacques, JEANVILLE Maud, *Chromatographie en phase gazeuse à deux dimensions : GC-GC et GCxGC, Techniques de l'ingénieur Chromatographie et techniques séparatives. base documentaire : TIB385DUO* (2011). <http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/chromatographie-et-techniques-separatives-42385210/chromatographie-en-phase-gazeuse-a-deux-dimensions-gc-gc-et-gcxgc-p1489/>.
- [52] J.V. Seeley, F.J. Kramp, K.S. Sharpe, S.K. Seeley, Characterization of gaseous mixtures of organic compounds with dual-secondary column comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCx2 GC), *J. Sep. Science.* 25 (2002) 53–59. doi:10.1002/1615-9314(20020101)25:1/2<53::AID-JSSC53>3.0.CO;2-V.
- [53] J.M. Sanchez, R.D. Sacks, Development of a Multibed Sorption Trap, Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography, and Time-of-Flight Mass Spectrometry System for the Analysis of Volatile Organic Compounds in Human Breath, *Anal. Chem.* 78 (2006) 3046–3054. doi:10.1021/ac060053k.
- [54] M. Libardoni, P.T. Stevens, J.H. Waite, R. Sacks, Analysis of human breath samples with a multi-bed sorption trap and comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC), *Journal of Chromatography B.* 842 (2006) 13–21. doi:10.1016/j.jchromb.2006.05.008.
- [55] M. Mieth, J.K. Schubert, T. Gröger, B. Sabel, S. Kischkel, P. Fuchs, D. Hein, R. Zimmermann, W. Miekisch, Automated Needle Trap Heart-Cut GC/MS and Needle Trap Comprehensive Two-Dimensional GC/TOF-MS for Breath Gas Analysis in the Clinical Environment, *Anal. Chem.* 82 (2010) 2541–2551. doi:10.1021/ac100061k.
- [56] M. Phillips, R.N. Cataneo, A. Chaturvedi, P.D. Kaplan, M. Libardoni, M. Mundada, U. Patel, X. Zhang, Detection of an Extended Human Volatome with Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry, *PLoS ONE.* 8 (2013) e75274. doi:10.1371/journal.pone.0075274.
- [57] M.K. Das, S.C. Bishwal, A. Das, D. Dabral, A. Varshney, V.K. Badireddy, R. Nanda, Investigation of Gender-Specific Exhaled Breath Volatome in Humans by GCxGC-TOF-MS, *Anal. Chem.* 86 (2014) 1229–1237. doi:10.1021/ac403541a.
- [58] H. Ma, X. Li, J. Chen, H. Wang, T. Cheng, K. Chen, S. Xu, Analysis of human breath samples of lung cancer patients and healthy controls with solid-phase microextraction (SPME) and flow-modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC), *Anal. Methods.* 6 (2014) 6841–6849. doi:10.1039/C4AY01220H.
- [59] A. Hengerics Szabó, P. Podolec, V. Ferenczy, R. Kubinec, J. Blaško, L. Soják, R. Górová, G. Addová, I. Ostrovský, J. Višňovský, V. Bierhanzl, R. Čabala, A. Amann, The analysis of linear and monomethylalkanes in exhaled breath samples by GC × GC-FID and GC–

- MS/MS, Journal of Chromatography B. 978–979 (2015) 62–69. doi:10.1016/j.jchromb.2014.11.026.
- [60] Breath Biopsy The complete guide VOCs as biomarkers for disease, Owlstone medical, n.d. https://www.owlstonemedical.com/media/uploads/files/Breath-Biopsy-Complete-Guide.pdf?utm_source=Content_download&utm_medium=Autoresponder_email&utm_campaign=2017_04_Breath_Biopsy_guide_download&mkt_tok=eyJpIjoiTVRreE1XUTFPRGRoTXpGaCIsInQiOiJwbTFhZWVYStvdXJR2dcLOtFSWFzQ1o3S3R1R3k2RENJQnJtOHBrZ1J5VjlmNzc2ZTIQkN1Z2d4aXZsNG5namo1YVwvZ1VzYWtYWDh1ZllwZUFzd2ZlQUkzSUhhSWc5OFZ2dUQ2NmNjTmJZxhXVFVud29kV2xhd3JETTfaWtI6In0%3D (accessed April 10, 2018).
- [61] D. Graham, D. Evans JR, L. Alpert, P. Klein, D. Evans, A. Opekun, T. Boutton, CAMPYLOBACTER PYLORI DETECTED NONINVASIVELY BY THE 13C-UREA BREATH TEST, The Lancet. 329 (1987) 1174–1177. doi:10.1016/S0140-6736(87)92145-3.
- [62] S.W. Ryter, A.M.K. Choi, Carbon monoxide in exhaled breath testing and therapeutics, Journal of Breath Research. 7 (2013) 17111. doi:10.1088/1752-7155/7/1/017111.
- [63] A.F. Gelb, P.J. Barnes, S.C. George, F.L.M. Ricciardolo, G. DiMaria, N. Zamel, Review of exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease, Journal of Breath Research. 6 (2012) 47101. doi:10.1088/1752-7155/6/4/047101.
- [64] I. Horváth, P.J. Barnes, Chapter 13 - Exhaled Nitric Oxide in Clinical Practice: Recent Advances and New Challenges, in: Volatile Biomarkers, Elsevier, Boston, 2013: pp. 231–241. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444626134000131> (accessed June 23, 2016).
- [65] Humanitarian Device Exemption (HDE), (n.d.). <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfhde/hde.cfm?id=h030004> (accessed April 9, 2018).
- [66] M. Phillips, J.P. Boehmer, R.N. Cataneo, T. Cheema, H.J. Eisen, J.T. Fallon, P.E. Fisher, A. Gass, J. Greenberg, J. Kobashigawa, D. Mancini, B. Rayburn, M.J. Zucker, Prediction of heart transplant rejection with a breath test for markers of oxidative stress, American Journal of Cardiology. 94 (2004) 1593–1594. doi:10.1016/j.amjcard.2004.08.052.
- [67] EC50 MICRO+ SMOKERLYZER, n.d. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpmn/pmn.cfm?ID=K082315>.
- [68] C. Farr, FDA approves first device, app to help quit smoking - Carrot, (2017). <https://www.cnn.com/2017/10/03/fda-approves-first-device-app-to-help-quit-smoking-carrot.html> (accessed April 10, 2018).
- [69] W. Miekisch, S. Kischkel, A. Sawacki, T. Liebau, M. Mieth, J.K. Schubert, Impact of sampling procedures on the results of breath analysis, Journal of Breath Research. 2 (2008) 026007. doi:10.1088/1752-7155/2/2/026007.
- [70] M. Phillips, J. Herrera, S. Krishnan, M. Zain, J. Greenberg, R.N. Cataneo, Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 729 (1999) 75–88. doi:10.1016/S0378-4347(99)00127-9.

- [71] Y.Y. Broza, L. Zuri, H. Haick, Combined Volatolomics for Monitoring of Human Body Chemistry, *Scientific Reports*. 4 (2014). doi:10.1038/srep04611.
- [72] A.C. Bishop, M. Libardoni, A. Choudary, B.B. Misra, K. Lange, J. Bernal, M. Nijland, C. Li, M. Olivier, P.W. Nathanielsz, L.A. Cox, Nonhuman primate breath volatile organic compounds associate with developmental programming and cardio-metabolic status, *J. Breath Res.* (2018). doi:10.1088/1752-7163/aaba84.
- [73] A. Bunkowski, S. Maddula, A.N. Davies, M. Westhoff, P. Litterst, B. Bödeker, J.I. Baumbach, One-year time series of investigations of analytes within human breath using ion mobility spectrometry, *Int. J. Ion Mobil. Spec.* 13 (2010) 141–148. doi:10.1007/s12127-010-0052-7.
- [74] I.R. White, K.A. Willis, C. Whyte, R. Cordell, R.S. Blake, A.J. Wardlaw, Satish Rao, J. Grigg, A.M. Ellis, P.S. Monks, Real-time multi-marker measurement of organic compounds in human breath: towards fingerprinting breath, *J. Breath Res.* 7 (2013) 017112. doi:10.1088/1752-7155/7/1/017112.
- [75] D. Smith, C. Turner, P. Španěl, Volatile metabolites in the exhaled breath of healthy volunteers: their levels and distributions, *J. Breath Res.* 1 (2007) 014004. doi:10.1088/1752-7155/1/1/014004.
- [76] P. Španěl, K. Dryahina, D. Smith, Acetone, ammonia and hydrogen cyanide in exhaled breath of several volunteers aged 4–83 years, *J. Breath Res.* 1 (2007) 011001. doi:10.1088/1752-7155/1/1/011001.
- [77] A.M. Diskin, P. Španěl, D. Smith, Time variation of ammonia, acetone, isoprene and ethanol in breath: a quantitative SIFT-MS study over 30 days, *Physiol. Meas.* 24 (2003) 107. doi:10.1088/0967-3334/24/1/308.
- [78] C. Turner, P. Španěl, D. Smith, A longitudinal study of ammonia, acetone and propanol in the exhaled breath of 30 subjects using selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS, *Physiol. Meas.* 27 (2006) 321. doi:10.1088/0967-3334/27/4/001.
- [79] B. Enderby, W. Lenney, M. Brady, C. Emmett, P. Španěl, D. Smith, Concentrations of some metabolites in the breath of healthy children aged 7–18 years measured using selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS), *J. Breath Res.* 3 (2009) 036001. doi:10.1088/1752-7155/3/3/036001.
- [80] P. Španěl, K. Dryahina, D. Smith, The concentration distributions of some metabolites in the exhaled breath of young adults, *J. Breath Res.* 1 (2007) 026001. doi:10.1088/1752-7155/1/2/026001.
- [81] P.M.-L. Sinues, M. Kohler, R. Zenobi, Human Breath Analysis May Support the Existence of Individual Metabolic Phenotypes, *PLOS ONE*. 8 (2013) e59909. doi:10.1371/journal.pone.0059909.
- [82] B. Thekedar, W. Szymczak, V. Höllriegl, C. Hoeschen, U. Oeh, Investigations on the variability of breath gas sampling using PTR-MS, *J. Breath Res.* 3 (2009) 027007. doi:10.1088/1752-7155/3/2/027007.
- [83] R.B.M. Aggio, B. de L. Costello, P. White, T. Khalid, N.M. Ratcliffe, Raj Persad, C.S.J. Probert, The use of a gas chromatography-sensor system combined with advanced

- statistical methods, towards the diagnosis of urological malignancies, *J. Breath Res.* 10 (2016) 017106. doi:10.1088/1752-7155/10/1/017106.
- [84] C. Turner, B. Parekh, C. Walton, P. Španěl, D. Smith, M. Evans, An exploratory comparative study of volatile compounds in exhaled breath and emitted by skin using selected ion flow tube mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 526–532. doi:10.1002/rcm.3402.
- [85] B. Moser, F. Bodrogi, G. Eibl, M. Lechner, J. Rieder, P. Lirk, Mass spectrometric profile of exhaled breath—field study by PTR-MS, *Respiratory Physiology & Neurobiology.* 145 (2005) 295–300. doi:10.1016/j.resp.2004.02.002.
- [86] C. Turner, P. Španěl, D. Smith, A longitudinal study of breath isoprene in healthy volunteers using selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS), *Physiol. Meas.* 27 (2006) 13. doi:10.1088/0967-3334/27/1/002.
- [87] S. Fischer, P. Trefz, A. Bergmann, M. Steffens, M. Ziller, W. Miekisch, J.S. Schubert, H. Köhler, P. Reinhold, Physiological variability in volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath and released from faeces due to nutrition and somatic growth in a standardized caprine animal model, *J. Breath Res.* 9 (2015) 027108. doi:10.1088/1752-7155/9/2/027108.
- [88] T.R. Mellors, M. Nasir, F.A. Franchina, A. Smolinska, L. Blanchet, J. Flynn, J.A. Tomko, M.J. O'Malley, C.A. Scanga, P.L. Lin, J. Wagner, J.E. Hill, Identification of *Mycobacterium tuberculosis* using volatile biomarkers in culture and exhaled breath, *J. Breath Res.* (2018). doi:10.1088/1752-7163/aacd18.
- [89] F.A. Franchina, T.R. Mellors, M. Aliyeva, J. Wagner, N. Daphtary, L.K.A. Lundblad, S.M. Fortune, E.J. Rubin, J.E. Hill, Towards the use of breath for detecting mycobacterial infection: a case study in a murine model, *J. Breath Res.* 12 (2018) 026008. doi:10.1088/1752-7163/aaa016.
- [90] P. Lima, C. Calil, F. Marcondes, Influence of gender and stress on the volatile sulfur compounds and stress biomarkers production, *Oral Dis.* 19 (2013) 366–373. doi:10.1111/odi.12011.
- [91] S. Dragonieri, V.N. Quaranta, P. Carratu, T. Ranieri, O. Resta, Ovarian cycle may influence the exhaled volatile organic compounds profile analyzed by an electronic nose, *J. Breath Res.* (2017). doi:10.1088/1752-7163/aa9eed.
- [92] P. Sukul, P. Trefz, J.K. Schubert, W. Miekisch, Immediate effects of breath holding maneuvers onto composition of exhaled breath, *J. Breath Res.* 8 (2014) 037102. doi:10.1088/1752-7155/8/3/037102.
- [93] A. Bikov, K. Paschalaki, R. Logan-Sinclair, I. Horváth, S.A. Kharitonov, P.J. Barnes, O.S. Usmani, P. Paredi, Standardised exhaled breath collection for the measurement of exhaled volatile organic compounds by proton transfer reaction mass spectrometry, *BMC Pulmonary Medicine.* 13 (2013) 43. doi:10.1186/1471-2466-13-43.
- [94] J. King, P. Mochalski, A. Kupferthaler, K. Unterkofler, H. Koc, W. Filipiak, S. Teschl, H. Hinterhuber, A. Amann, Dynamic profiles of volatile organic compounds in exhaled breath as determined by a coupled PTR-MS/GC-MS study, *Physiol. Meas.* 31 (2010) 1169. doi:10.1088/0967-3334/31/9/008.

- [95] C. Wang, E. Li, G. Xu, H. Wang, Y. Gong, P. Li, S. Liu, Y. He, Determination of fentanyl in human breath by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Microchemical Journal*. 91 (2009) 149–152. doi:10.1016/j.microc.2008.09.002.
- [96] H. Dong, F.J. Zhang, F.Y. Wang, Y.Y. Wang, J. Guo, G.M. Kanhar, J. Chen, J. Liu, C. Zhou, M. Yan, X. Chen, Simultaneous on-line monitoring of propofol and sevoflurane in balanced anesthesia by direct resistive heating gas chromatography, *Journal of Chromatography A*. (n.d.). doi:10.1016/j.chroma.2017.05.001.
- [97] M. Grossherr, A. Hengstenberg, T. Meier, L. Dibbelt, B.W. Igl, A. Ziegler, P. Schmucker, H. Gehring, Propofol concentration in exhaled air and arterial plasma in mechanically ventilated patients undergoing cardiac surgery, *British Journal of Anaesthesia*. 102 (2009) 608–613. doi:10.1093/bja/aep053.
- [98] S. Kamysek, P. Fuchs, H. Schwoebel, J.P. Roesner, S. Kischkel, K. Wolter, C. Loeseken, J.K. Schubert, W. Miekisch, Drug detection in breath: effects of pulmonary blood flow and cardiac output on propofol exhalation, *Anal Bioanal Chem*. 401 (2011) 2093. doi:10.1007/s00216-011-5099-8.
- [99] W. Miekisch, P. Fuchs, S. Kamysek, C. Neumann, J.K. Schubert, Assessment of propofol concentrations in human breath and blood by means of HS-SPME–GC–MS, *Clinica Chimica Acta*. 395 (2008) 32–37. doi:10.1016/j.cca.2008.04.021.
- [100] S. Ghimenti, F.D. Francesco, M. Onor, M.A. Stiegel, M.G. Trivella, C. Comite, N. Catania, R. Fuoco, J.D. Pleil, Post-operative elimination of sevoflurane anesthetic and hexafluoroisopropanol metabolite in exhaled breath: pharmacokinetic models for assessing liver function, *J. Breath Res*. 7 (2013) 036001. doi:10.1088/1752-7155/7/3/036001.
- [101] S. Fischer, A. Bergmann, M. Steffens, P. Trefz, M. Ziller, W. Miekisch, J.S. Schubert, H. Köhler, P. Reinhold, Impact of food intake on in vivo VOC concentrations in exhaled breath assessed in a caprine animal model, *J. Breath Res*. 9 (2015) 047113. doi:10.1088/1752-7155/9/4/047113.
- [102] P. Španěl, K. Dryahina, P. Vicherková, D. Smith, Increase of methanol in exhaled breath quantified by SIFT-MS following aspartame ingestion, *J. Breath Res*. 9 (2015) 047104. doi:10.1088/1752-7155/9/4/047104.
- [103] A. Baranska, E. Tigchelaar, A. Smolinska, J.W. Dallinga, E.J.C. Moonen, J.A.M. Dekens, C. Wijmenga, A. Zhernakova, F.J. van Schooten, Profile of volatile organic compounds in exhaled breath changes as a result of gluten-free diet, *J. Breath Res*. 7 (2013) 037104. doi:10.1088/1752-7155/7/3/037104.
- [104] J. Williams, C. Stönnner, J. Wicker, N. Krauter, B. Derstroff, E. Bourtsoukidis, T. Klüpfel, S. Kramer, Cinema audiences reproducibly vary the chemical composition of air during films, by broadcasting scene specific emissions on breath, *Scientific Reports*. 6 (2016). doi:10.1038/srep25464.
- [105] M.A. Turner, S. Bandelow, L. Edwards, P. Patel, H.J. Martin, I.D. Wilson, C.L.P. Thomas, The effect of a paced auditory serial addition test (PASAT) intervention on the profile of volatile organic compounds in human breath: a pilot study, *J. Breath Res*. 7 (2013) 017102. doi:10.1088/1752-7155/7/1/017102.

- [106] E. Marco, J.O. Grimalt, A rapid method for the chromatographic analysis of volatile organic compounds in exhaled breath of tobacco cigarette and electronic cigarette smokers, *Journal of Chromatography A*. 1410 (2015) 51–59. doi:10.1016/j.chroma.2015.07.094.
- [107] M. Alonso, M. Castellanos, J.M. Sanchez, Evaluation of potential breath biomarkers for active smoking: assessment of smoking habits, *Anal Bioanal Chem*. 396 (2010) 2987–2995. doi:10.1007/s00216-010-3524-z.
- [108] W. Filipiak, V. Ruzsanyi, P. Mochalski, A. Filipiak, A. Bajtarevic, C. Ager, H. Denz, W. Hilbe, H. Jamnig, M. Hackl, A. Dzien, A. Amann, Dependence of exhaled breath composition on exogenous factors, smoking habits and exposure to air pollutants, *J. Breath Res*. 6 (2012) 036008. doi:10.1088/1752-7155/6/3/036008.
- [109] S. Fustinoni, D. Consonni, L. Campo, M. Buratti, A. Colombi, A.C. Pesatori, M. Bonzini, P.A. Bertazzi, V. Foà, S. Garte, P.B. Farmer, L.S. Levy, M. Pala, F. Valerio, V. Fontana, A. Desideri, D.F. Merlo, Monitoring Low Benzene Exposure: Comparative Evaluation of Urinary Biomarkers, Influence of Cigarette Smoking, and Genetic Polymorphisms, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 14 (2005) 2237–2244. doi:10.1158/1055-9965.EPI-04-0798.
- [110] C. Jia, K.D. Ward, F. Mzayek, G. Relyea, Blood 2,5-dimethylfuran as a sensitive and specific biomarker for cigarette smoking, *Biomarkers*. 19 (2014) 457–462. doi:10.3109/1354750X.2014.935956.
- [111] M.T. Gaugg, D.G. Gomez, C. Barrios-Collado, G. Vidal-de-Miguel, Malcolm Kohler, R. Zenobi, P.M.-L. Sinues, Expanding metabolite coverage of real-time breath analysis by coupling a universal secondary electrospray ionization source and high resolution mass spectrometry—a pilot study on tobacco smokers, *J. Breath Res*. 10 (2016) 016010. doi:10.1088/1752-7155/10/1/016010.
- [112] J.D. Pleil, M.A. Stiegel, K.W. Fent, Exploratory breath analyses for assessing toxic dermal exposures of firefighters during suppression of structural burns, *J. Breath Res*. 8 (2014) 037107. doi:10.1088/1752-7155/8/3/037107.
- [113] F. Maurer, A. Wolf, T. Fink, B. Rittershofer, N. Heim, T. Volk, J.I. Baumbach, S. Kreuer, Wash-out of ambient air contaminations for breath measurements, *J. Breath Res*. 8 (2014) 027107. doi:10.1088/1752-7155/8/2/027107.
- [114] W. Filipiak, A. Filipiak, C. Ager, H. Wiesenhofer, A. Amann, Optimization of sampling parameters for collection and preconcentration of alveolar air by needle traps, *J. Breath Res*. 6 (2012) 027107. doi:10.1088/1752-7155/6/2/027107.
- [115] T. Wang, A. Pysanenko, K. Dryahina, P. Španěl, D. Smith, Analysis of breath, exhaled via the mouth and nose, and the air in the oral cavity, *J. Breath Res*. 2 (2008) 037013. doi:10.1088/1752-7155/2/3/037013.
- [116] P. Sukul, P. Oertel, S. Kamysek, P. Trefz, Oral or nasal breathing? Real-time effects of switching sampling route onto exhaled VOC concentrations, *J. Breath Res*. (2017). doi:10.1088/1752-7163/aa6368.
- [117] W. Miekisch, J. Herbig, J.K. Schubert, Data interpretation in breath biomarker research: pitfalls and directions, *Journal of Breath Research*. 6 (2012) 036007. doi:10.1088/1752-7155/6/3/036007.

- [118] H. Schwoebel, R. Schubert, M. Sklorz, S. Kischkel, R. Zimmermann, J.K. Schubert, W. Miekisch, Phase-resolved real-time breath analysis during exercise by means of smart processing of PTR-MS data, *Anal Bioanal Chem.* 401 (2011) 2079–2091. doi:10.1007/s00216-011-5173-2.
- [119] Menssana Research Inc. | Breathtaking Technology | Menssana Systems - BCA, (n.d.). http://www.menssanaresearch.com/systems_BCA_Menssana.html (accessed May 14, 2018).
- [120] ReCIVA® Breath Sampler, (n.d.). <https://www.owlstonemedical.com/products/reciva/> (accessed February 19, 2018).
- [121] S. Kang, C.L.P. Thomas, How long may a breath sample be stored for at –80 °C? A study of the stability of volatile organic compounds trapped onto a mixed Tenax:Carbograph trap adsorbent bed from exhaled breath, *J. Breath Res.* 10 (2016) 026011. doi:10.1088/1752-7155/10/2/026011.
- [122] S.W. Harshman, N. Mani, B.A. Geier, J. Kwak, P. Shepard, M. Fan, G.L. Sudberry, R.S. Mayes, D.K. Ott, J.A. Martin, C.C. Grigsby, Storage stability of exhaled breath on Tenax TA, *J. Breath Res.* 10 (2016) 046008. doi:10.1088/1752-7155/10/4/046008.
- [123] P. Salvo, C. Ferrari, R. Persia, S. Ghimenti, T. Lomonaco, F. Bellagambi, F. Di Francesco, A dual mode breath sampler for the collection of the end-tidal and dead space fractions, *Medical Engineering & Physics.* 37 (2015) 539–544. doi:10.1016/j.medengphy.2015.03.013.
- [124] A. Bikov, Z. Lázár, I. Horvath, Established methodological issues in electronic nose research: how far are we from using these instruments in clinical settings of breath analysis?, *J. Breath Res.* 9 (2015) 034001. doi:10.1088/1752-7155/9/3/034001.
- [125] Menssana Research Inc. | Breathtaking Technology | Menssana Systems - BreathLink™, (n.d.). http://www.menssanaresearch.com/systems_BreathLink_Menssana.html (accessed August 20, 2018).
- [126] M. Allsworth, D. Apthorp, M. van der Schee, R. Smith, J. Boschmans, S. Kitchen, Method for Collecting a Selective Portion of a Subject's Breath, US20170303823A1, 2017. [https://patents.google.com/patent/US20170303823A1/en?assignee=Owlstone+Medical+Ltd&oq=assignee:\(Owlstone+Medical+Ltd\)&page=1](https://patents.google.com/patent/US20170303823A1/en?assignee=Owlstone+Medical+Ltd&oq=assignee:(Owlstone+Medical+Ltd)&page=1) (accessed June 6, 2018).
- [127] M. Allsworth, D. Apthorp, M. van der Schee, R. Smith, J. Boschmans, S. Kitchen, Systems and Device for Capturing Breath Samples, US20170303822A1, 2017. [https://patents.google.com/patent/US20170303822A1/en?assignee=Owlstone+Medical+Ltd&oq=assignee:\(Owlstone+Medical+Ltd\)&page=1](https://patents.google.com/patent/US20170303822A1/en?assignee=Owlstone+Medical+Ltd&oq=assignee:(Owlstone+Medical+Ltd)&page=1) (accessed June 6, 2018).
- [128] Lung Cancer Indicator Detection - Full Text View - ClinicalTrials.gov, (n.d.). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02612532> (accessed May 14, 2018).
- [129] Breath Analysis to Diagnose Lung Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov, (n.d.). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03250390> (accessed May 14, 2018).
- [130] Breath for Better Health Study - Full Text View - ClinicalTrials.gov, (n.d.). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03210896> (accessed May 14, 2018).

- [131] I. Horváth, P.J. Barnes, S. Loukides, P.J. Sterk, M. Högman, A.-C. Olin, A. Amann, B. Antus, E. Baraldi, A. Bikov, A.W. Boots, L.D. Bos, P. Brinkman, C. Bucca, G.E. Carpagnano, M. Corradi, S. Cristescu, J.C. de Jongste, A.-T. Dinh-Xuan, E. Dompeling, N. Fens, S. Fowler, J.M. Hohlfeld, O. Holz, Q. Jöbssis, K.V.D. Kant, H.H. Knobel, K. Kostikas, L. Lehtimäki, J.O. Lundberg, P. Montuschi, A.V. Muylem, G. Pennazza, P. Reinhold, F.L.M. Ricciardolo, P. Rosias, M. Santonico, M.P. van der Schee, F.-J. van Schooten, A. Spanevello, T. Tonia, T.J. Vink, A European Respiratory Society technical standard: exhaled biomarkers in lung disease, *European Respiratory Journal*. 49 (2017) 1600965. doi:10.1183/13993003.00965-2016.
- [132] A. Krilaviciute, J.A. Heiss, M. Leja, J. Kupcinskas, H. Haick, H. Brenner, Detection of cancer through exhaled breath: a systematic review, *Oncotarget*. 6 (2015) 38643–38657. doi:10.18632/oncotarget.5938.
- [133] A. Bajtarevic, C. Ager, M. Pienz, M. Klieber, K. Schwarz, M. Ligor, T. Ligor, W. Filipiak, H. Denz, M. Fiegl, W. Hilbe, W. Weiss, P. Lukas, H. Jamnig, M. Hackl, A. Haidenberger, B. Buszewski, W. Miekisch, J. Schubert, A. Amann, Noninvasive detection of lung cancer by analysis of exhaled breath, *BMC Cancer*. 9 (2009) 348. doi:10.1186/1471-2407-9-348.
- [134] B. Buszewski, A. Ulanowska, T. Kowalkowski, K. Cieśliński, Investigation of lung cancer biomarkers by hyphenated separation techniques and chemometrics, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 50 (2011) 573–581. doi:10.1515/cclm.2011.769.
- [135] S.M. Gordon, J.P. Szidon, B.K. Krotoszynski, R.D. Gibbons, H.J. O'Neill, Volatile organic compounds in exhaled air from patients with lung cancer., *Clinical Chemistry*. 31 (1985) 1278–1282.
- [136] R. Rodríguez-Pérez, R. Cortés, A. Guamán, A. Pardo, Y. Torralba, F. Gómez, Josep Roca, J.A. Barberà, M. Cascante, S. Marco, Instrumental drift removal in GC-MS data for breath analysis: the short-term and long-term temporal validation of putative biomarkers for COPD, *J. Breath Res*. 12 (2018) 036007. doi:10.1088/1752-7163/aaa492.
- [137] M. Couto, C. Barbosa, D. Silva, A. Rudnitskaya, L. Delgado, A. Moreira, S.M. Rocha, Oxidative stress in asthmatic and non-asthmatic adolescent swimmers—A breathomics approach, *Pediatr Allergy Immunol*. 28 (2017) 452–457. doi:10.1111/pai.12729.
- [138] T. Amundsen, S. Sundstrøm, 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 Oncologica*. 53 (2014) 307–315. doi:10.3109/0284186X.2013.819996.
- [139] R. Ehmann, E. Boedeker, U. Friedrich, J. Sagert, J. Dippon, G. Friedel, T. Walles, Canine scent detection in the diagnosis of lung cancer: revisiting a puzzling phenomenon, *European Respiratory Journal*. 39 (2012) 669–676. doi:10.1183/09031936.00051711.
- [140] M. McCulloch, T. Jezierski, M. Broffman, A. Hubbard, K. Turner, T. Janecki, Diagnostic Accuracy of Canine Scent Detection in Early- and Late-Stage Lung and Breast Cancers, *Integrative Cancer Therapies*. 5 (2006) 30–39. doi:10.1177/1534735405285096.
- [141] M. Walczak, T. Jezierski, A. Górecka-Bruzda, M. Sobczyńska, J. Ensminger, Impact of individual training parameters and manner of taking breath odor samples on the reliability of canines as cancer screeners, *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*. 7 (2012) 283–294. doi:10.1016/j.jveb.2012.01.001.

- [142] H. Sonoda, S. Kohnoe, T. Yamazato, Y. Satoh, G. Morizono, K. Shikata, M. Morita, A. Watanabe, M. Morita, Y. Kakeji, F. Inoue, Y. Maehara, Colorectal cancer screening with odour material by canine scent detection, *Gut*. 60 (2011) 814–819. doi:10.1136/gut.2010.218305.
- [143] S. Dragonieri, R. Schot, B.J.A. Mertens, S. Le Cessie, S.A. Gauw, A. Spanevello, O. Resta, N.P. Willard, T.J. Vink, K.F. Rabe, E.H. Bel, P.J. Sterk, An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 120 (2007) 856–862. doi:10.1016/j.jaci.2007.05.043.
- [144] N. Fens, A.H. Zwinderman, M.P. van der Schee, S.B. de Nijs, E. Dijkers, A.C. Roldaan, D. Cheung, E.H. Bel, P.J. Sterk, Exhaled breath profiling enables discrimination of chronic obstructive pulmonary disease and asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 180 (2009) 1076–1082. doi:10.1164/rccm.200906-0939OC.
- [145] P. Montuschi, M. Santonico, C. Mondino, G. Pennazza, G. Mantini, E. Martinelli, R. Capuano, G. Ciabattini, R. Paolesse, C. Di Natale, P.J. Barnes, A. D’Amico, Diagnostic performance of an electronic nose, fractional exhaled nitric oxide, and lung function testing in asthma, *Chest*. 137 (2010) 790–796.
- [146] M.P. van der Schee, R. Palmay, J.O. Cowan, D.R. Taylor, Predicting steroid responsiveness in patients with asthma using exhaled breath profiling, *Clinical and Experimental Allergy*. 43 (2013) 1217–1225. doi:10.1111/cea.12147.
- [147] S. Dragonieri, J.T. Annema, R. Schot, M.P.C. van der Schee, A. Spanevello, P. Carratú, O. Resta, K.F. Rabe, P.J. Sterk, An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD., *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 64 (2009) 166–170. doi:10.1016/j.lungcan.2008.08.008.
- [148] A. Bikov, M. Hernadi, B.Z. Korosi, L. Kunos, G. Zsamboki, Z. Sutto, A.D. Tarnoki, D.L. Tarnoki, G. Losonczy, I. Horvath, Expiratory flow rate, breath hold and anatomic dead space influence electronic nose ability to detect lung cancer, *BMC Pulmonary Medicine*. 14 (2014) 202.
- [149] R.F. Machado, D. Laskowski, O. Deffenderfer, T. Burch, S. Zheng, P.J. Mazzone, T. Mekhail, C. Jennings, J.K. Stoller, J. Pyle, J. Duncan, R.A. Dweik, S.C. Erzurum, Detection of lung cancer by sensor array analyses of exhaled breath., *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 171 (2005) 1286–1291. doi:10.1164/rccm.200409-1184OC.
- [150] A.J. Hubers, P. Brinkman, R.J. Boksem, R.J. Rhodius, B.I. Witte, A.H. Zwinderman, D.A.M. Heideman, S. Duin, R. Koning, R.D.M. Steenbergen, P.J.F. Snijders, E.F. Smit, P.J. Sterk, E. Thunnissen, Combined sputum hypermethylation and eNose analysis for lung cancer diagnosis, *J. Clin. Pathol*. 67 (2014) 707–711. doi:10.1136/jclinpath-2014-202414.
- [151] 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., Paris 6, 2017. <http://www.theses.fr/2017PA066206> (accessed May 14, 2018).
- [152] M. Metsälä, Optical techniques for breath analysis: from single to multi-species detection, *J. Breath Res*. 12 (2018) 027104. doi:10.1088/1752-7163/aa8a31.

- [153] A.T. Güntner, N.A. Sievi, S.J. Theodore, T. Gulich, M. Kohler, S.E. Pratsinis, Noninvasive Body Fat Burn Monitoring from Exhaled Acetone with Si-doped WO₃-sensing Nanoparticles, *Anal. Chem.* 89 (2017) 10578–10584. doi:10.1021/acs.analchem.7b02843.
- [154] M. Righettoni, A. Tricoli, S. Gass, A. Schmid, A. Amann, S.E. Pratsinis, Breath acetone monitoring by portable Si:WO₃ gas sensors, *Analytica Chimica Acta.* 738 (2012) 69–75. doi:10.1016/j.aca.2012.06.002.
- [155] K. Owen, A. Farooq, A calibration-free ammonia breath sensor using a quantum cascade laser with WMS 2f/1f, *Appl. Phys. B.* 116 (2014) 371–383. doi:10.1007/s00340-013-5701-1.
- [156] C. Berchtold, L. Meier, R. Steinhoff, R. Zenobi, A new strategy based on real-time secondary electrospray ionization and high-resolution mass spectrometry to discriminate endogenous and exogenous compounds in exhaled breath, *Metabolomics.* 10 (2014) 291–301. doi:10.1007/s11306-013-0568-z.
- [157] D. García-Gómez, L. Bregy, C. Barrios-Collado, G. Vidal-de-Miguel, R. Zenobi, Real-Time High-Resolution Tandem Mass Spectrometry Identifies Furan Derivatives in Exhaled Breath, *Anal. Chem.* 87 (2015) 6919–6924. doi:10.1021/acs.analchem.5b01509.
- [158] D. García-Gómez, L. Bregy, Y. Nussbaumer-Ochsner, T. Gaisl, M. Kohler, R. Zenobi, Detection and Quantification of Benzothiazoles in Exhaled Breath and Exhaled Breath Condensate by Real-Time Secondary Electrospray Ionization–High-Resolution Mass Spectrometry and Ultra-High Performance Liquid Chromatography, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 12519–12524. doi:10.1021/acs.est.5b03809.
- [159] Y. Wang, J. Jiang, L. Hua, K. Hou, Y. Xie, P. Chen, W. Liu, Q. Li, S. Wang, H. Li, High-Pressure Photon Ionization Source for TOFMS and Its Application for Online Breath Analysis, *Anal. Chem.* 88 (2016) 9047–9055. doi:10.1021/acs.analchem.6b01707.
- [160] M.T. Gaugg, T. Bruderer, N. Nowak, L. Eiffert, P. Martinez-Lozano Sinues, M. Kohler, R. Zenobi, Mass-Spectrometric Detection of Omega-Oxidation Products of Aliphatic Fatty Acids in Exhaled Breath, *Anal. Chem.* 89 (2017) 10329–10334. doi:10.1021/acs.analchem.7b02092.
- [161] J. Taucher, A. Hansel, A. Jordan, R. Fall, J.H. Futrell, W. Lindinger, Detection of isoprene in expired air from human subjects using proton-transfer-reaction mass spectrometry., *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM.* 11 (1997) 1230–1234. doi:10.1002/(SICI)1097-0231(199707)11:11<1230::AID-RCM3>3.0.CO;2-Z.
- [162] P. Španěl, D. Smith, Progress in SIFT-MS: Breath analysis and other applications, *Mass Spectrometry Reviews.* 30 (2011) 236–267. doi:10.1002/mas.20303.
- [163] A.M. Casas-Ferreira, M. del Nogal-Sánchez, J.L. Pérez-Pavón, B. Moreno-Cordero, Non-separative mass spectrometry methods for non-invasive medical diagnostics based on volatile organic compounds: A review, *Analytica Chimica Acta.* (2018). doi:10.1016/j.aca.2018.07.005.
- [164] J. Kleeblatt, J.K. Schubert, R. Zimmermann, Detection of Gaseous Compounds by Needle Trap Sampling and Direct Thermal-Desorption Photoionization Mass Spectrometry: Concept and Demonstrative Application to Breath Gas Analysis, *Anal. Chem.* 87 (2015) 1773–1781. doi:10.1021/ac5039829.

- [165] E. Vul, C. Harris, P. Winkielman, H. Pashler, Puzzlingly High Correlations in fMRI Studies of Emotion, Personality, and Social Cognition, *Perspectives on Psychological Science*. 4 (2009) 274–290. doi:10.1111/j.1745-6924.2009.01125.x.
- [166] J.D. Pleil, QQ-plots for assessing distributions of biomarker measurements and generating defensible summary statistics, *J. Breath Res.* 10 (2016) 035001. doi:10.1088/1752-7155/10/3/035001.
- [167] J.D. Pleil, Imputing defensible values for left-censored ‘below level of quantitation’ (LoQ) biomarker measurements, *J. Breath Res.* 10 (2016) 045001. doi:10.1088/1752-7155/10/4/045001.
- [168] W. Miekisch, J.K. Schubert, G.F.. Noeldge-Schomburg, Diagnostic potential of breath analysis—focus on volatile organic compounds, *Clinica Chimica Acta*. 347 (2004) 25–39. doi:10.1016/j.cccn.2004.04.023.
- [169] T.H. Risby, S.S. Sehnert, Clinical application of breath biomarkers of oxidative stress status, *Free Radical Biology and Medicine*. 27 (1999) 1182–1192. doi:10.1016/S0891-5849(99)00212-9.
- [170] R. de Vries, P. Brinkman, M.P. van der Schee, N. Fens, E. Dijkers, S.K. Bootsma, F.H.C. de Jongh, P.J. Sterk, Integration of electronic nose technology with spirometry: validation of a new approach for exhaled breath analysis, *J. Breath Res.* 9 (2015) 046001. doi:10.1088/1752-7155/9/4/046001.
- [171] K.A. Cope, M.T. Watson, W.M. Foster, S.S. Sehnert, T.H. Risby, Effects of ventilation on the collection of exhaled breath in humans, *Journal of Applied Physiology*. 96 (2004) 1371–1379. doi:10.1152/jappphysiol.01034.2003.
- [172] J.D. Pleil, M.A. Stiegel, T.H. Risby, Clinical breath analysis: discriminating between human endogenous compounds and exogenous (environmental) chemical confounders, *J. Breath Res.* 7 (2013) 017107. doi:10.1088/1752-7155/7/1/017107.
- [173] M. Kistler, W. Szymczak, M. Fedrigo, J. Fiamoncini, V. Höllriegl, C. Hoeschen, M. Klingenspor, M.H. de Angelis, J. Rozman, Effects of diet-matrix on volatile organic compounds in breath in diet-induced obese mice, *J. Breath Res.* 8 (2014) 016004. doi:10.1088/1752-7155/8/1/016004.
- [174] J.K. Schubert, W. Miekisch, T. Birken, K. Geiger, G.F.E. Nöldge-Schomburg, Impact of inspired substance concentrations on the results of breath analysis in mechanically ventilated patients, *Biomarkers*. 10 (2005) 138–152. doi:10.1080/13547500500050259.
- [175] T.H. Risby, S.F. Solga, Current status of clinical breath analysis, *Appl. Phys. B*. 85 (2006) 421–426. doi:10.1007/s00340-006-2280-4.
- [176] T. Ligor, M. Ligor, A. Amann, C. Ager, M. Bachler, A. Dzien, B. Buszewski, The analysis of healthy volunteers’ exhaled breath by the use of solid-phase microextraction and GC-MS, *J. Breath Res.* 2 (2008) 046006. doi:10.1088/1752-7155/2/4/046006.
- [177] P. Španěl, K. Dryahina, D. Smith, A quantitative study of the influence of inhaled compounds on their concentrations in exhaled breath, *J. Breath Res.* 7 (2013) 017106. doi:10.1088/1752-7155/7/1/017106.
- [178] K. Unterkofler, J. King, P. Mochalski, M. Jandacka, H. Koc, S. Teschl, Anton Amann, G. Teschl, Modeling-based determination of physiological parameters of systemic VOCs by

- breath gas analysis: a pilot study, *J. Breath Res.* 9 (2015) 036002. doi:10.1088/1752-7155/9/3/036002.
- [179] C. Ager, K. Unterkofler, P. Mochalski, S. Teschl, G. Teschl, C.A. Mayhew, Julian King, Modeling-based determination of physiological parameters of systemic VOCs by breath gas analysis, part 2, *J. Breath Res.* 12 (2018) 036011. doi:10.1088/1752-7163/aab2b6.
- [180] L.E. Farhi, Elimination of inert gas by the lung, *Respiration Physiology.* 3 (1967) 1–11. doi:10.1016/0034-5687(67)90018-7.
- [181] J.D. Pleil, M.A. Stiegel, Evolution of Environmental Exposure Science: Using Breath-Borne Biomarkers for “Discovery” of the Human Exposome, *Anal. Chem.* 85 (2013) 9984–9990. doi:10.1021/ac402306f.
- [182] M. Alonso, J.M. Sanchez, Analytical challenges in breath analysis and its application to exposure monitoring, *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 44 (2013) 78–89. doi:10.1016/j.trac.2012.11.011.
- [183] S. Kischkel, W. Miekisch, A. Sawacki, E.M. Straker, P. Trefz, A. Amann, J.K. Schubert, Breath biomarkers for lung cancer detection and assessment of smoking related effects — confounding variables, influence of normalization and statistical algorithms, *Clinica Chimica Acta.* 411 (2010) 1637–1644. doi:10.1016/j.cca.2010.06.005.
- [184] W. Filipiak, A. Filipiak, A. Sponring, T. Schmid, B. Zelger, C. Ager, Ewa Klodzinska, H. Denz, A. Pizzini, P. Lucciarini, H. Jamnig, J. Troppmair, A. Amann, Comparative analyses of volatile organic compounds (VOCs) from patients, tumors and transformed cell lines for the validation of lung cancer-derived breath markers, *J. Breath Res.* 8 (2014) 027111. doi:10.1088/1752-7155/8/2/027111.
- [185] P. Fuchs, C. Loeseken, J.K. Schubert, W. Miekisch, Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer, *International Journal of Cancer.* 126 (2009) NA—NA. doi:10.1002/ijc.24970.
- [186] E.M. Gaspar, A.F. Lucena, J. Duro da Costa, H. Chaves das Neves, Organic metabolites in exhaled human breath—A multivariate approach for identification of biomarkers in lung disorders, *Journal of Chromatography A.* 1216 (2009) 2749–2756. doi:10.1016/j.chroma.2008.10.125.
- [187] T. Ligor, Ł. Pater, B. Buszewski, Application of an artificial neural network model for selection of potential lung cancer biomarkers, *J. Breath Res.* 9 (2015) 027106. doi:10.1088/1752-7155/9/2/027106.
- [188] H.J. O’Neill, S.M. Gordon, M.H. O’Neill, R.D. Gibbons, J.P. Szidon, A computerized classification technique for screening for the presence of breath biomarkers in lung cancer., *Clinical Chemistry.* 34 (1988) 1613–1618.
- [189] G. Peng, M. Hakim, Y.Y. Broza, S. Billan, R. Abdah-Bortnyak, A. Kuten, U. Tisch, H. Haick, Detection of lung, breast, colorectal, and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors., *British Journal of Cancer.* 103 (2010) 542–551. doi:10.1038/sj.bjc.6605810.
- [190] M. Phillips, R.N. Cataneo, A.R. Cummin, A.J. Gagliardi, K. Gleeson, J. Greenberg, R.A. Maxfield, W.N. Rom, Detection of lung cancer with volatile markers in the breath, *Chest Journal.* 123 (2003) 2115–2123.

- [191] J. Rudnicka, T. Kowalkowski, T. Ligor, B. Buszewski, Determination of volatile organic compounds as biomarkers of lung cancer by SPME–GC–TOF/MS and chemometrics, *Journal of Chromatography B*. 879 (2011) 3360–3366. doi:10.1016/j.jchromb.2011.09.001.
- [192] K. Schallschmidt, R. Becker, C. Jung, W. Bremser, T. Walles, Jens Neudecker, G. Leschber, S. Frese, I. Nehls, Comparison of volatile organic compounds from lung cancer patients and healthy controls—challenges and limitations of an observational study, *J. Breath Res.* 10 (2016) 046007. doi:10.1088/1752-7155/10/4/046007.
- [193] J. Zhou, Z.-A. Huang, U. Kumar, D.D.Y. Chen, Review of recent developments in determining volatile organic compounds in exhaled breath as biomarkers for lung cancer diagnosis, *Analytica Chimica Acta*. 996 (2017) 1–9. doi:10.1016/j.aca.2017.09.021.
- [194] L.W., E.P., T.D.H., R.P., R.Z., Exposures to Benzene and Other Volatile Compounds from Active and Passive Smoking, *Archives of Environmental Health: An International Journal*. 42 (1987) 272–279. doi:10.1080/00039896.1987.9935820.
- [195] News, (n.d.). <https://www.owlstonemedical.com/about/news/> (accessed May 14, 2018).
- [196] C.O. Olopade, M. Zakkar, W.I. Swedler, I. Rubinstein, Exhaled Pentane Levels in Acute Asthma, *CHEST*. 111 (1997) 862–865. doi:10.1378/chest.111.4.862.
- [197] P. Paredi, S.A. Kharitonov, P.J. Barnes, Elevation of Exhaled Ethane Concentration in Asthma, *Am J Respir Crit Care Med*. 162 (2000) 1450–1454. doi:10.1164/ajrccm.162.4.2003064.
- [198] P. Montuschi, M. Corradi, G. Ciabattini, J. Nightingale, S.A. Kharitonov, P.J. Barnes, Increased 8-Isoprostane, a Marker of Oxidative Stress, in Exhaled Condensate of Asthma Patients, *Am J Respir Crit Care Med*. 160 (1999) 216–220. doi:10.1164/ajrccm.160.1.9809140.
- [199] C.M.H.H.T. Robroeks, J.J.B.N. van Berkel, J.W. Dallinga, Q. Jöbsis, L.J.I. Zimmermann, H.J.E. Hendriks, M.F.M. Wouters, C.P.M. van der Grinten, K.D.G. van de Kant, F.-J. van Schooten, E. Dompeling, Metabolomics of Volatile Organic Compounds in Cystic Fibrosis Patients and Controls, *Pediatric Research*. 68 (2010) 75–80. doi:10.1203/PDR.0b013e3181df4ea0.
- [200] M. Barker, M. Hengst, J. Schmid, H.-J. Buers, B. Mittermaier, D. Klemp, R. Koppmann, Volatile organic compounds in the exhaled breath of young patients with cystic fibrosis, *European Respiratory Journal*. 27 (2006) 929–936. doi:10.1183/09031936.06.00085105.
- [201] B.J. Novak, D.R. Blake, S. Meinardi, F.S. Rowland, A. Pontello, D.M. Cooper, P.R. Galassetti, Exhaled methyl nitrate as a noninvasive marker of hyperglycemia in type 1 diabetes, *PNAS*. 104 (2007) 15613–15618. doi:10.1073/pnas.0706533104.
- [202] P.R. Galassetti, B. Novak, D. Nemet, C. Rose-Gottron, D.M. Cooper, S. Meinardi, R. Newcomb, F. Zaldivar, D.R. Blake, Breath ethanol and acetone as indicators of serum glucose levels: an initial report, *Diabetes Technol. Ther.* 7 (2005) 115–123. doi:10.1089/dia.2005.7.115.
- [203] J. Lee, J. Ngo, D. Blake, S. Meinardi, A.M. Pontello, R. Newcomb, P.R. Galassetti, Improved predictive models for plasma glucose estimation from multi-linear regression

- analysis of exhaled volatile organic compounds, *J. Appl. Physiol.* 107 (2009) 155–160. doi:10.1152/jappphysiol.91657.2008.
- [204] M. Phillips, R.N. Cataneo, T. Cheema, J. Greenberg, Increased breath biomarkers of oxidative stress in diabetes mellitus, *Clin. Chim. Acta.* 344 (2004) 189–194. doi:10.1016/j.cccn.2004.02.025.
- [205] M.A. Pelli, G. Trovarelli, E. Capodicasa, G.E. De Medio, G. Bassotti, Breath alkanes determination in ulcerative colitis and Crohn's disease, *Dis. Colon Rectum.* 42 (1999) 71–76.
- [206] M. Phillips, J.P. Boehmer, R.N. Cataneo, T. Cheema, H.J. Eisen, J.T. Fallon, P.E. Fisher, A. Gass, J. Greenberg, J. Kobashigawa, D. Mancini, B. Rayburn, M.J. Zucker, Heart allograft rejection: detection with breath alkanes in low levels (the HARDBALL study), *The Journal of Heart and Lung Transplantation.* 23 (2004) 701–708. doi:10.1016/j.healun.2003.07.017.
- [207] S. Humad, E. Zarling, M. Clapper, J.L. Skosey, Breath pentane excretion as a marker of disease activity in rheumatoid arthritis, *Free Radic. Res. Commun.* 5 (1988) 101–106.
- [208] M. Phillips, M. Sabas, J. Greenberg, Increased pentane and carbon disulfide in the breath of patients with schizophrenia, *J. Clin. Pathol.* 46 (1993) 861–864.
- [209] B.K. Puri, B.M. Ross, I.H. Treasaden, Increased levels of ethane, a non-invasive, quantitative, direct marker of n-3 lipid peroxidation, in the breath of patients with schizophrenia, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 32 (2008) 858–862. doi:10.1016/j.pnpbp.2008.01.001.
- [210] C. Vendeuvre, R. Ruiz-Guerrero, F. Bertoncini, L. Duval, D. Thiébaud, M.-C. Hennion, Characterisation of middle-distillates by comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC): A powerful alternative for performing various standard analysis of middle-distillates, *Journal of Chromatography A.* 1086 (2005) 21–28. doi:10.1016/j.chroma.2005.05.106.
- [211] B. Gruber, S. Keller, T. Groeger, G. Matuschek, W. Szymczak, R. Zimmermann, Breath gas monitoring during a glucose challenge by a combined PTR-QMS/GC×GC-TOFMS approach for the verification of potential volatile biomarkers, *J. Breath Res.* 10 (2016) 036003. doi:10.1088/1752-7155/10/3/036003.
- [212] B. Gruber, T. Groeger, D. Harrison, R. Zimmermann, Vacuum ultraviolet absorption spectroscopy in combination with comprehensive two-dimensional gas chromatography for the monitoring of volatile organic compounds in breath gas: A feasibility study, *Journal of Chromatography A.* 1464 (2016) 141–146. doi:10.1016/j.chroma.2016.08.024.
- [213] A. Amann, B. de L. Costello, W. Miekisch, J. Schubert, B. Buszewski, Joachim 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) 034001. doi:10.1088/1752-7155/8/3/034001.
- [214] J.V. Hinshaw, Thermal Desorption Sampling, (n.d.). <http://www.chromatographyonline.com/thermal-desorption-sampling> (accessed July 10, 2018).

- [215] D.R. Reyes, D. Iossifidis, P.-A. Auroux, A. Manz, Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2623–2636.
- [216] Á. Ríos, M. Zougagh, M. Avila, Miniaturization through lab-on-a-chip: Utopia or reality for routine laboratories? A review, *Analytica Chimica Acta.* 740 (2012) 1–11. doi:10.1016/j.aca.2012.06.024.
- [217] S.E. Thompson, S. Parthasarathy, Moore's law: the future of Si microelectronics, *Materials Today.* 9 (2006) 20–25. doi:10.1016/S1369-7021(06)71539-5.
- [218] J. Tranchant, *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*, Masson & Cie, 1968.
- [219] E. Lussac, R. Barattin, P. Cardinael, V. Agasse, Review on Micro-Gas Analyzer Systems: Feasibility, Separations and Applications, *Critical Reviews in Analytical Chemistry.* 46 (2016) 455–468. doi:10.1080/10408347.2016.1150153.
- [220] S.C. Terry, J.H. Jerman, J.B. Angell, A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer, *IEEE Transactions on Electron Devices.* 26 (1979) 1880–1886. doi:10.1109/T-ED.1979.19791.
- [221] K. Nachev, T. Bourouina, F. Marty, K. Danaie, B. Bourlon, E. Donzier, Microvalves for Natural-Gas Analysis With Poly Ether Ether Ketone Membranes, *Journal of Microelectromechanical Systems.* 19 (2010) 973–981. doi:10.1109/JMEMS.2010.2055547.
- [222] J. Vial, D. Thiébaud, F. Marty, P. Guibal, R. Haudebourg, K. Nachev, K. Danaie, B. Bourlon, Silica sputtering as a novel collective stationary phase deposition for microelectromechanical system gas chromatography column: Feasibility and first separations, *Journal of Chromatography A.* 1218 (2011) 3262–3266. doi:10.1016/j.chroma.2010.12.035.
- [223] F. Ricoul, D. Lefebvre, A. Bellemin-Comte, N. David, B. Bourlon, V. Jousseau, C. Marcoux, E. Ollier, M. Petitjean, P. Puget, Novel stationary phase for silicon gas chromatography microcolumns, in: *IEEE SENSORS 2014 Proceedings*, 2014: pp. 206–208. doi:10.1109/ICSENS.2014.6984969.
- [224] R. Haudebourg, J. Vial, D. Thiebaut, K. Danaie, J. Breviere, P. Sassi, I. Azzouz, B. Bourlon, Temperature-Programmed Sputtered Micromachined Gas Chromatography Columns: An Approach to Fast Separations in Oilfield Applications, (2012). doi:10.1021/ac3022136.
- [225] R. Haudebourg, Z. Matouk, E. Zoghlami, I. Azzouz, K. Danaie, P. Sassi, D. Thiebaut, J. Vial, Sputtered alumina as a novel stationary phase for micro machined gas chromatography columns, *Anal Bioanal Chem.* 406 (2014) 1245–1247. doi:10.1007/s00216-013-7289-z.
- [226] I. Azzouz, J. Vial, D. Thiébaud, R. Haudebourg, K. Danaie, P. Sassi, J. Breviere, Review of stationary phases for microelectromechanical systems in gas chromatography: feasibility and separations, *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 406 (2014) 981–994. doi:10.1007/s00216-013-7168-7.
- [227] C.-Y. Kuo, P.-S. Chen, H.-T. Chen, C.-J. Lu, W.-C. Tian, Development of micromachined preconcentrators and gas chromatographic separation columns by an electroless gold

- plating technology, *J. Micromech. Microeng.* 27 (2017) 035012. doi:10.1088/1361-6439/aa5aa3.
- [228] B. Bourlon, B.A.P. Ho, F. Ricoul, T. Chappuis, A.B. Comte, O. Constantin, B. Icard, Revisiting gas sampling and analysis with microtechnology: Feasability of low cost handheld gas chromatographs, in: 2016 IEEE SENSORS, 2016: pp. 1–3. doi:10.1109/ICSENS.2016.7808672.
- [229] S.-I. Ohira, K. Toda, Micro gas analyzers for environmental and medical applications, *Analytica Chimica Acta.* 619 (2008) 143–156. doi:10.1016/j.aca.2008.05.010.
- [230] S. Zampolli, I. Elmi, F. Mancarella, P. Betti, E. Dalcanale, G.C. Cardinali, M. Severi, Real-time monitoring of sub-ppb concentrations of aromatic volatiles with a MEMS-enabled miniaturized gas-chromatograph, *Sensors and Actuators B: Chemical.* 141 (2009) 322–328. doi:10.1016/j.snb.2009.06.021.
- [231] N. Kakita, H. Miyashita, S. Kishida, S.-S. Lee, J.-O. Lee, MEMS based microstructure array design and its quantitative analysis of micropreconcentrator for cancer biomarker diagnosis, in: 2013 IEEE SENSORS, 2013: pp. 1–4. doi:10.1109/ICSENS.2013.6688334.
- [232] J. Sun, D. Cui, F. Guan, L. Zhang, X. Chen, H. Li, Detection biomarkers of lung cancer using mini-GC-PID system integrated with micro GC column and micro pre-concentrator, *Nanoscale Res Lett.* 9 (2014) 1–7. doi:10.1186/1556-276X-9-576.
- [233] T.-H. Tzeng, C.-Y. Kuo, S.-Y. Wang, P.-K. Huang, P.-H. Kuo, Y.-M. Huang, W.-C. Hsieh, S.-A. Yu, Y.J. Tseng, W.-C. Tian, S.-C. Lee, S.-S. Lu, 21.5 A portable micro gas chromatography system for volatile compounds detection with 15ppb of sensitivity, in: Solid-State Circuits Conference - (ISSCC), 2015 IEEE International, 2015: pp. 1–3. doi:10.1109/ISSCC.2015.7063089.
- [234] A. Garg, M. Akbar, E. Vejerano, S. Narayanan, L. Nazhandali, L.C. Marr, M. Agah, Zebra GC: A mini gas chromatography system for trace-level determination of hazardous air pollutants, *Sensors and Actuators B: Chemical.* 212 (2015) 145–154. doi:10.1016/j.snb.2014.12.136.
- [235] Torion T-9 Portable GC/MS-NTSST090500, PerkinElmer. (n.d.). <http://www.perkinelmer.com/fr/product/torion-t-9-portable-gc-ms-instrument-ntsst090500> (accessed March 27, 2018).
- [236] F. Haghighi, Z. Talebpour, A. Sanati-Nezhad, Through the years with on-a-chip gas chromatography: a review, *Lab Chip.* 15 (2015) 2559–2575. doi:10.1039/C5LC00283D.
- [237] S.K. Kim, H. Chang, E.T. Zellers, Prototype micro gas chromatograph for breath biomarkers of respiratory disease, in: Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference, 2009. TRANSDUCERS 2009. International, 2009: pp. 128–131. doi:10.1109/SENSOR.2009.5285546.
- [238] R.P. Manginell, G.C. FRYE-MASON, R. KOTTENSTETTE, P.R. Lewis, C.C. WONG, Microfabricated planar preconcentrator, Sandia National Labs., Albuquerque, NM (US); Sandia National Labs., Livermore, CA (US), 2000.
- [239] G.C. Frye-Mason, R.J. Kottenstette, E.J. Heller, C.M. Matzke, S.A. Casalnuovo, P.R. Lewis, R.P. Manginell, W.K. Schubert, V.M. Hietala, R.J. Shul, Integrated Chemical Analysis

- Systems for Gas Phase CW Agent Detection, in: *Micro Total Analysis Systems '98*, Springer, Dordrecht, 1998: pp. 477–481. doi:10.1007/978-94-011-5286-0_113.
- [240] G. Frye-Mason, R. Kottenstette, P. Lewis, E. Heller, R. Manginell, D. Adkins, G. Dulleck, D. Martinez, D. Sasaki, C. Mowry, C. Matzke, L. Anderson, Hand-Held Miniature Chemical Analysis System (μ Chemlab) for Detection of Trace Concentrations of Gas Phase Analytes, in: *Micro Total Analysis Systems 2000*, Springer, Dordrecht, 2000: pp. 229–232. doi:10.1007/978-94-017-2264-3_53.
- [241] G.C. Frye-Mason, R.P. Manginell, E.J. Heller, C.M. Matzke, S.A. Casalnuovo, V.M. Hietala, R.J. Kottenstette, P.R. Lewis, C.C. Wong, Microfabricated gas phase chemical analysis systems, in: *Microprocesses and Nanotechnology Conference, 1999. Digest of Papers. Microprocesses and Nanotechnology '99. 1999 International*, 1999: pp. 60–61. doi:10.1109/IMNC.1999.797476.
- [242] S.A. Casalnuovo, G.C. Frye-Mason, R.J. Kottenstette, E.J. Heller, C.M. Matzke, P.R. Lewis, R.P. Mangineli, S.L. Hietala, W.K. Schubert, V.M. Hietala, D.Y. Sasaki, J.L. Reno, Gas phase chemical detection with an integrated chemical analysis system, in: *Proceedings of the 1999 Joint Meeting of the European Frequency and Time Forum and the IEEE International Frequency Control Symposium (Cat. No.99CH36313)*, 1999: pp. 991–996 vol.2. doi:10.1109/FREQ.1999.841472.
- [243] W.-C. Tian, S.W. Pang, C.-J. Lu, E.T. Zellers, Microfabricated preconcentrator-focuser for a microscale gas chromatograph, *Journal of Microelectromechanical Systems*. 12 (2003) 264–272. doi:10.1109/JMEMS.2003.811748.
- [244] A.B.A. Dow, A. Sklorz, W. Lang, A microfluidic preconcentrator for enhanced monitoring of ethylene gas, *Sensors and Actuators A: Physical*. 167 (2011) 226–230. doi:10.1016/j.sna.2011.01.019.
- [245] M.M. McCartney, Y. Zrodnikov, A.G. Fung, M.K. LeVasseur, J.M. Pedersen, K.O. Zamuruyev, A.A. Aksenov, N.J. Kenyon, C.E. Davis, An Easy to Manufacture Micro Gas Preconcentrator for Chemical Sensing Applications, *ACS Sens.* 2 (2017) 1167–1174. doi:10.1021/acssensors.7b00289.
- [246] B. Bourlon, F. Ricoul, S. Beghi, A. Bellemin-Comte, N. David, T. Bordy, B. Icard, A. Salette, M. Petitjean, R. Barattin, V. Gouttenoire, P. Puget, Silicon based micro-preconcentrators for portable gas analysis systems, in: *San Antonio, Texas, USA, 2014*. http://www.rsc.org/images/loc/2014/PDFs/Papers/790_1051.pdf (accessed October 25, 2017).
- [247] C. Pijolat, M. Camara, J. Courbat, J.-P. Viricelle, D. Briand, N.F. de Rooij, Application of carbon nano-powders for a gas micro-preconcentrator, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 127 (2007) 179–185. doi:10.1016/j.snb.2007.07.029.
- [248] B. Alfeeli, M. Agah, Micro preconcentrator with embedded 3D pillars for breath analysis applications, in: *2008 IEEE Sensors*, 2008: pp. 736–739. doi:10.1109/ICSENS.2008.4716547.
- [249] B. Alfeeli, M. Agah, Selective preconcentration by temperature manipulation of cascaded micro preconcentrators, in: *Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference, 2009. TRANSDUCERS 2009. International*, 2009: pp. 1662–1665. doi:10.1109/SENSOR.2009.5285750.

- [250] B. Alfeeli, M. Agah, MEMS-Based Selective Preconcentration of Trace Level Breath Analytes, *IEEE Sensors Journal*. 9 (2009) 1068–1075. doi:10.1109/JSEN.2009.2025822.
- [251] B. Alfeeli, M. Agah, Micro preconcentrator for handheld diagnostics of cancer biomarkers in breath, in: 2010 IEEE Sensors, 2010: pp. 2490–2493. doi:10.1109/ICSENS.2010.5690098.
- [252] B. Alfeeli, H. Vereb, A. Dietrich, M. Agah, Low pressure drop micro preconcentrators with cobweb Tenax-TA film for analysis of human breath, in: 2011 IEEE 24th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), 2011: pp. 916–919. doi:10.1109/MEMSYS.2011.5734575.
- [253] B. Alfeeli, M. Agah, Toward Handheld Diagnostics of Cancer Biomarkers in Breath: Micro Preconcentration of Trace Levels of Volatiles in Human Breath, *IEEE Sensors Journal*. 11 (2011) 2756–2762. doi:10.1109/JSEN.2011.2160390.
- [254] M. Akbar, M. Agah, A golden micro-trap for anesthetic depth monitoring using human breath samples, in: 2012 IEEE 25th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), 2012: pp. 906–909. doi:10.1109/MEMSYS.2012.6170332.
- [255] M. Akbar, M. Agah, A Microfabricated Propofol Trap for Breath-Based Anesthesia Depth Monitoring, *Journal of Microelectromechanical Systems*. 22 (2013) 443–451. doi:10.1109/JMEMS.2012.2227949.
- [256] M. Li, S. Biswas, M.H. Nantz, R.M. Higashi, X.-A. Fu, A microfabricated preconcentration device for breath analysis, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 180 (2013) 130–136. doi:10.1016/j.snb.2012.07.034.
- [257] M. Camara, P. Breuil, C. Pijolat, J.P. Viricelle, N.F. de Rooij, D. Briand, Tubular gas preconcentrators based on inkjet printed micro-hotplates on foil, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 236 (2016) 1111–1117. doi:10.1016/j.snb.2016.06.121.
- [258] E.H.M. Camara, P. Breuil, D. Briand, N.F. de Rooij, C. Pijolat, A micro gas preconcentrator with improved performance for pollution monitoring and explosives detection, *Analytica Chimica Acta*. 688 (2011) 175–182. doi:10.1016/j.aca.2010.12.039.
- [259] E.H.M. Camara, P. Breuil, D. Briand, L. Guillot, C. Pijolat, N.F. de Rooij, Micro gas preconcentrator in porous silicon filled with a carbon absorbent, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 148 (2010) 610–619. doi:10.1016/j.snb.2010.05.054.
- [260] W.-C. Tian, T.H. Wu, C.-J. Lu, W.R. Chen, H.J. Sheen, A novel micropreconcentrator employing a laminar flow patterned heater for micro gas chromatography, *J. Micromech. Microeng.* 22 (2012) 065014. doi:10.1088/0960-1317/22/6/065014.
- [261] W.-C. Tian, H.K.L. Chan, C.-J. Lu, S.W. Pang, E.T. Zellers, Multiple-stage microfabricated preconcentrator-focuser for micro gas chromatography system, *Journal of Microelectromechanical Systems*. 14 (2005) 498–507. doi:10.1109/JMEMS.2005.844842.
- [262] T.E. Morey, M.M. Booth, R.A. Prather, S.J. Nixon, J. Boissoneault, R.J. Melker, B.A. Goldberger, H. Wohltjen, D.M. Dennis, Measurement of Ethanol in Gaseous Breath Using a Miniature Gas Chromatograph, *J Anal Toxicol.* 35 (2011) 134–142. doi:10.1093/anatox/35.3.134.
- [263] G. Gregis, J.-B. Sanchez, I. Bezverkhyy, W. Guy, F. Berger, V. Fierro, J.-P. Bellat, A. Celzard, Detection and quantification of lung cancer biomarkers by a micro-analytical

- device using a single metal oxide-based gas sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 255 (2018) 391–400. doi:10.1016/j.snb.2017.08.056.
- [264] D. Gaddes, J. Westland, F.L. Dorman, S. Tadigadapa, Improved micromachined column design and fluidic interconnects for programmed high-temperature gas chromatography separations, *Journal of Chromatography A*. 1349 (2014) 96–104. doi:10.1016/j.chroma.2014.04.087.
- [265] A. Ghosh, J.E. Johnson, J.G. Nuss, B.A. Stark, A.R. Hawkins, L.T. Tolley, B.D. Iverson, H.D. Tolley, M.L. Lee, Extending the upper temperature range of gas chromatography with all-silicon microchip columns using a heater/clamp assembly, *Journal of Chromatography A*. 1517 (2017) 134–141. doi:10.1016/j.chroma.2017.08.036.
- [266] A. Ghosh, C.R. Vilorio, A.R. Hawkins, M.L. Lee, Microchip gas chromatography columns, interfacing and performance, *Talanta*. 188 (2018) 463–492. doi:10.1016/j.talanta.2018.04.088.
- [267] EZGC Method Translator and Flow Calculator for Gas Chromatography (GC) / Restek.com, (n.d.). <http://www.restek.com/ezgc-mtfc> (accessed June 26, 2018).
- [268] J.G. Klenø, P. Wolkoff, P.A. Clausen, C.K. Wilkins, T. Pedersen, Degradation of the Adsorbent Tenax TA by Nitrogen Oxides, Ozone, Hydrogen Peroxide, OH Radical, and Limonene Oxidation Products, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 4121–4126. doi:10.1021/es025680f.
- [269] Tenax® TA Breakthrough Volume Data, (n.d.). <http://www.sisweb.com/index/referenc/tenaxta.htm> (accessed June 28, 2018).
- [270] C.-J. Lu, E.T. Zellers, A Dual-Adsorbent Preconcentrator for a Portable Indoor-VOC Microsensor System, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3449–3457. doi:10.1021/ac001524k.
- [271] S.E. Prebihalo, K.L. Berrier, C.E. Freye, H.D. Bahaghighat, N.R. Moore, D.K. Pinkerton, R.E. Synovec, Multidimensional Gas Chromatography: Advances in Instrumentation, Chemometrics, and Applications, *Anal. Chem.* 90 (2018) 505–532. doi:10.1021/acs.analchem.7b04226.
- [272] F.A. Franchina, M. Maimone, P.Q. Tranchida, L. Mondello, Flow modulation comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry using ≈ 4 mL min^{−1} gas flows, *Journal of Chromatography A*. 1441 (2016) 134–139. doi:10.1016/j.chroma.2016.02.041.
- [273] Z. Liu, J.B. Phillips, Comprehensive two-dimensional gas chromatography using an on-column thermal modulator interface, *Journal of Chromatographic Science*. 29 (1991) 227–231.
- [274] J. Dallüge, J. Beens, U.A.T. Brinkman, Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool, *Journal of Chromatography A*. 1000 (2003) 69–108. doi:10.1016/S0021-9673(03)00242-5.
- [275] B.J. Pollo, G.L. Alexandrino, F. Augusto, L.W. Hantao, The impact of comprehensive two-dimensional gas chromatography on oil & gas analysis: Recent advances and applications in petroleum industry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 105 (2018) 202–217. doi:10.1016/j.trac.2018.05.007.

- [276] R. Shellie, P. Marriott, P. Morrison, Comprehensive two-dimensional gas chromatography with flame ionization and time-of-flight mass spectrometry detection: qualitative and quantitative analysis of West Australian sandalwood oil, *J Chromatogr Sci.* 42 (2004) 417–422.
- [277] X. Xu, L.L.P. Van Stee, J. Williams, J. Beens, M. Adahchour, R.J.J. Vreuls, U.A.T. Brinkman, J. Lelieveld, Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) measurements of volatile organic compounds in the atmosphere, *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions.* 3 (2003) 1139–1181.
- [278] M. Adahchour, L.L.P. van Stee, J. Beens, R.J.J. Vreuls, M.A. Batenburg, U.A.T. Brinkman, Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection for the trace analysis of flavour compounds in food, *Journal of Chromatography A.* 1019 (2003) 157–172. doi:10.1016/S0021-9673(03)01131-2.
- [279] R. Pesesse, P.-H. Stefanuto, Fl. Schleich, R. Louis, J.-F. Focant, Exhaled Air Analysis for Early Detection of Lung Cancer, (2014). <https://orbi.uliege.be/handle/2268/165255> (accessed July 5, 2018).
- [280] N. Di Giovanni, M.-A. Meuwis, E. Louis, J.-F. Focant, A new comprehensive GC×GC-HRTOFMS approach in metabolomics, (2018). <https://orbi.uliege.be/handle/2268/225812> (accessed July 5, 2018).
- [281] D. Zanella, P.-H. Stefanuto, L. Dubois, R. Pesesse, F. Schleich, R. Louis, J.-F. Focant, ASTHMA PHENOTYPING USING BREATH- GC×GC-HRTOFMS, (2018). <https://orbi.uliege.be/handle/2268/223794> (accessed July 5, 2018).
- [282] R. Pesesse, P.-H. Stefanuto, Fl. Schleich, M.-A. Meuwis, E. Louis, R. Louis, J.-F. Focant, Investigation of the possible effect of sampling on human exhaled breath sample integrity, (2016). <https://orbi.uliege.be/handle/2268/198004> (accessed July 5, 2018).
- [283] R. Pesesse, P.-H. Stefanuto, Fl. Schleich, R. Louis, J.-F. Focant, GC×GC-TOFMS for reliable detection of candidate biomarkers in breath analyses, (2015). <https://orbi.uliege.be/handle/2268/193012> (accessed July 5, 2018).
- [284] R. Pesesse, P.-H. Stefanuto, Fl. Schleich, R. Louis, J.-F. Focant, Screening for Putative Biomarkers of Lung Cancer in Exhaled Air, (2015). <https://orbi.uliege.be/handle/2268/193011> (accessed July 5, 2018).
- [285] R. Pesesse, P.-H. Stefanuto, Fl. Schleich, M.-A. Meuwis, E. Louis, R. Louis, J.-F. Focant, Characterization of human exhaled breath for non-invasive detection of diseases by GC×GC-TOFMS, (2016). <https://orbi.uliege.be/handle/2268/194208> (accessed July 5, 2018).
- [286] P.-H. Stefanuto, R. Pesesse, V. Bertrand, M.-C. Depauw-Gillet, J.-F. Focant, Exploring the volatome of different cancer cell lines, *European Respiratory Journal.* 46 (2015) PA3975. doi:10.1183/13993003.congress-2015.PA3975.
- [287] T.R. Mellors, L. Blanchet, J.L. Flynn, J. Tomko, M. O'Malley, C.A. Scanga, P.L. Lin, J.E. Hill, A new method to evaluate macaque health using exhaled breath: A case study of *M. tuberculosis* in a BSL-3 setting, *Journal of Applied Physiology.* 122 (2017) 695–701. doi:10.1152/jappphysiol.00888.2016.

- [288] M. Beccaria, T.R. Mellors, J.S. Petion, C.A. Rees, M. Nasir, H.K. Systrom, J.W. Sairistil, M.-A. Jean-Juste, V. Rivera, K. Lavoile, P. Severe, J.W. Pape, P.F. Wright, J.E. Hill, Preliminary investigation of human exhaled breath for tuberculosis diagnosis by multidimensional gas chromatography – Time of flight mass spectrometry and machine learning, *Journal of Chromatography B*. 1074–1075 (2018) 46–50. doi:10.1016/j.jchromb.2018.01.004.
- [289] 42nd ISCC and 15th GCxGC Symposium, (n.d.). http://iscc42.chromaleont.it/4DAction/web_home_item/10 (accessed July 23, 2018).
- [290] Breath Summit 2018, (n.d.). <http://mintonline.org/breathsummit2018/programme.asp> (accessed July 23, 2018).
- [291] P.Q. Tranchida, G. Purcaro, P. Dugo, L. Mondello, G. Purcaro, Modulators for comprehensive two-dimensional gas chromatography, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 30 (2011) 1437–1461. doi:10.1016/j.trac.2011.06.010.
- [292] V. Cuzuel, A. Sizun, G. Cognon, I. Rivals, F. Heulard, D. Thiébaud, J. Vial, Human odor and forensics. Optimization of a comprehensive two-dimensional gas chromatography method based on orthogonality: How not to choose between criteria, *Journal of Chromatography A*. 1536 (2018) 58–66. doi:10.1016/j.chroma.2017.08.060.
- [293] P.Q. Tranchida, Comprehensive two-dimensional gas chromatography: A perspective on processes of modulation, *Journal of Chromatography A*. 1536 (2018) 2–5. doi:10.1016/j.chroma.2017.04.039.
- [294] H.D. Bahaghighat, C.E. Freye, R.E. Synovec, Recent advances in modulator technology for comprehensive two dimensional gas chromatography, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. (2018). doi:10.1016/j.trac.2018.04.016.
- [295] C.A. Bruckner, B.J. Prazen, R.E. Synovec, Comprehensive Two-Dimensional High-Speed Gas Chromatography with Chemometric Analysis, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2796–2804. doi:10.1021/ac980164m.
- [296] R.E. Mohler, B.J. Prazen, R.E. Synovec, Total-transfer, valve-based comprehensive two-dimensional gas chromatography, *Analytica Chimica Acta*. 555 (2006) 68–74. doi:10.1016/j.aca.2005.08.072.
- [297] A.E. Sinha, B.J. Prazen, C.G. Fraga, R.E. Synovec, Valve-based comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection: instrumentation and figures-of-merit, *Journal of Chromatography A*. 1019 (2003) 79–87. doi:10.1016/j.chroma.2003.08.047.
- [298] J.V. Seeley, N.J. Micyus, S.V. Bandurski, S.K. Seeley, J.D. McCurry, Microfluidic Deans Switch for Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography, *Anal. Chem.* 79 (2007) 1840–1847. doi:10.1021/ac061881g.
- [299] C. Duhamel, P. Cardinael, V. Peulon-Agasse, R. Firor, L. Pascaud, G. Semard-Jousset, P. Giusti, V. Livadaris, Comparison of cryogenic and differential flow (forward and reverse fill/flush) modulators and applications to the analysis of heavy petroleum cuts by high-temperature comprehensive gas chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1387 (2015) 95–103. doi:10.1016/j.chroma.2015.01.095.

- [300] J. Krupčík, R. Gorovenko, I. Špánik, P. Sandra, D.W. Armstrong, Flow-modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography with simultaneous flame ionization and quadrupole mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A*. 1280 (2013) 104–111. doi:10.1016/j.chroma.2013.01.015.
- [301] P.Q. Tranchida, F.A. Franchina, P. Dugo, L. Mondello, Use of greatly-reduced gas flows in flow-modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. 1359 (2014) 271–276. doi:10.1016/j.chroma.2014.07.054.
- [302] P.Q. Tranchida, M. Maimone, F.A. Franchina, T.R. Bjerk, C.A. Zini, G. Purcaro, L. Mondello, Four-stage (low-)flow modulation comprehensive gas chromatography–quadrupole mass spectrometry for the determination of recently-highlighted cosmetic allergens, *Journal of Chromatography A*. 1439 (2016) 144–151. doi:10.1016/j.chroma.2015.12.002.
- [303] F.A. Franchina, M. Maimone, D. Sciarrone, G. Purcaro, P.Q. Tranchida, L. Mondello, Evaluation of a novel helium ionization detector within the context of (low-)flow modulation comprehensive two-dimensional gas chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1402 (2015) 102–109. doi:10.1016/j.chroma.2015.05.013.
- [304] Benzeneacetic acid, (n.d.). <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C103822&Mask=200#Mass-Spec> (accessed August 20, 2018).
- [305] J. Beauchamp, J. Herbig, R. Gutmann, A. Hansel, On the use of Tedlar® bags for breath-gas sampling and analysis, *J. Breath Res.* 2 (2008) 046001. doi:10.1088/1752-7155/2/4/046001.
- [306] M.M.L. Steeghs, S.M. Cristescu, F.J.M. Harren, The suitability of Tedlar bags for breath sampling in medical diagnostic research, *Physiol. Meas.* 28 (2007) 73. doi:10.1088/0967-3334/28/1/007.
- [307] S. Friedman, A.S. Cheifetz, F.A. Farraye, P.A. Banks, F.L. Makrauer, R. Burakoff, B. Farmer, L.N. Torgersen, K.E. Wahl, Factors that affect adherence to surveillance colonoscopy in patients with inflammatory bowel disease., *Inflammatory Bowel Diseases*. 19 (2013) 534–539. doi:10.1097/MIB.0b013e3182802a3c.
- [308] J.J.B.N. Van Berkel, J.W. Dallinga, G.M. Möller, R.W.L. Godschalk, E. Moonen, E.F.M. Wouters, F.J. Van Schooten, Development of accurate classification method based on the analysis of volatile organic compounds from human exhaled air, *Journal of Chromatography B*. 861 (2008) 101–107. doi:10.1016/j.jchromb.2007.11.008.
- [309] I. Kushch, K. Schwarz, L. Schwentner, B. Baumann, A. Dzien, A. Schmid, Karl Unterkofler, G. Gastl, P. Španěl, D. Smith, A. Amann, Compounds enhanced in a mass spectrometric profile of smokers' exhaled breath versus non-smokers as determined in a pilot study using PTR-MS, *J. Breath Res.* 2 (2008) 026002. doi:10.1088/1752-7155/2/2/026002.
- [310] L. Perbellini, A. Princivale, M. Cerpelloni, F. Pasini, F. Brugnone, Comparison of breath, blood and urine concentrations in the biomonitoring of environmental exposure to 1,3-butadiene, 2,5-dimethylfuran, and benzene, *Int Arch Occup Environ Health*. 76 (2003) 461–466. doi:10.1007/s00420-003-0436-7.

- [311] D.L. Ashley, M.A. Bonin, B. Hamar, M. McGeehin, Using the blood concentration of 2,5-dimethylfuran as a marker for smoking, *Int. Arch Occup Environ Health*. 68 (1996) 183–187. doi:10.1007/BF00381629.
- [312] Recherche des données d'espèce par le nom chimique, (n.d.). <https://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser/> (accessed July 20, 2018).
- [313] Benzene, (n.d.). <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C71432&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec> (accessed July 20, 2018).
- [314] Furan, 2,5-dimethyl-, (n.d.). <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C625865&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec> (accessed July 20, 2018).
- [315] Toluene, (n.d.). <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C108883&Mask=200#Mass-Spec> (accessed July 20, 2018).
- [316] G. MacLeod, J.M. Ames, Comparative assessment of the artefact background on thermal desorption of tenax GC and tenax TA, *Journal of Chromatography A*. 355 (1986) 393–398. doi:10.1016/S0021-9673(01)97343-1.
- [317] J.H. Lee, S.A. Batterman, C. Jia, S. Chernyak, Ozone Artifacts and Carbonyl Measurements Using Tenax GR, Tenax TA, Carbopack B, and Carbopack X Adsorbents, *Journal of the Air & Waste Management Association*. 56 (2006) 1503–1517. doi:10.1080/10473289.2006.10464560.
- [318] X.-L. Cao, C.N. Hewitt, Study of the Degradation by Ozone of Adsorbents and of Hydrocarbons Adsorbed during the Passive Sampling of Air, *Environ. Sci. Technol*. 28 (1994) 757–762. doi:10.1021/es00054a003.
- [319] O. Zoller, F. Sager, H. Reinhard, Furan in food: Headspace method and product survey, *Food Additives & Contaminants*. 24 (2007) 91–107. doi:10.1080/02652030701447389.
- [320] W.-K. Jo, K.-W. Pack, Utilization of Breath Analysis for Exposure Estimates of Benzene Associated with Active Smoking, *Environmental Research*. 83 (2000) 180–187. doi:10.1006/enrs.2000.4059.
- [321] M. Ceillier, Développement d'un système de prélèvement d'air expiré, CEA LETI, Grenoble, 2017.
- [322] Highlights of IABR Breath Summit 2018, (n.d.). <https://www.owlstonemedical.com/about/blog/2018/jun/28/highlights-breath-summit-2018/> (accessed September 6, 2018).

Annexes

Détails des tests anova pour le μ PC

Benzene

day 1	day 2	day 3	day 4
11215487	11765777	15652341	12132488
12474368	10887788	13958386	12937738
12537576	9504801	12662615	12751113

Anova :Single Factor

Summary

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
day 1	3	36227431	12075810.33	5.56116E+11
day 2	3	32158366	10719455.33	1.29926E+12
day 3	3	42273342	14091114	2.24783E+12
day 4	3	37821339	12607113	1.77659E+11

ANOVA

<i>Source of variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>Mean of square</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>Critical F value</i>
Between Groups	1.74878E+13	3	5.82926E+12	5.446810831	0.024638891	4.066180551
Within Goups	8.56172E+12	8	1.07021E+12			

Total	2.60495E+13	11
-------	-------------	----

sr	1034511.702		CVr	8.36%	
sj	1259502.714		CVd	10.18%	

Toluene

day 1	day 2	day 3	day 4
13627371	13876572	17232500	14479890
14647583	12378456	15853426	14743162
14911944	10819009	14424102	15302088

Anova :Single Factor

Summary

S

Groups	Count	Sum	Average	Groups
day 1	3	43186898	14395632.7	4.6014E+11
day 2	3	37074037	12358012.3	2.3375E+12
day 3	3	47510028	15836676	1.972E+12
day 4	3	44525140	14841713.3	1.7629E+11

ANOVA

Source of variation	SS	df	Mean of square	F	P-value	Critical F value
Between Groups	1.9265E+13	3	6.4218E+12	5.19365853	0.02780694	4.06618055
Within Goups	9.8918E+12	8	1.2365E+12			

Total 2.9157E+13 11

sr	1111968.91		CVr	7.74%
sj	1314705.71		CVd	9.16%

Annexes

	day 1	day 2	day 3	day 4
ethylbenzene	13913937	13124301	18443148	15481499
	15035553	12734004	16815362	15668422
	15179715	12156010	15443025	15624210

Anova :Single Factor

Summary

Groups	Count	Sum	Average	Groups
day 1	3	44129205	14709735	4.8017E+11
day 2	3	38014315	12671438.33	2.3733E+11
day 3	3	50701535	16900511.67	2.2556E+12
day 4	3	46774131	15591377	9543556399

ANOVA

Source of variation	SS	df	Mean of square	F	P-value	Critical F value
Between Groups	2.8392E+13	3	9.4641E+12	12.6921338	0.00207499	4.06618055
Within Goups	5.9653E+12	8	7.45666E+11			

Total 3.4358E+13 11

sr	863519.707		CVr	5.77%
sj	1704741.42		CVd	11.39%

O xylene	day 1	day 2	day 3	day 4
	12161077	10167113	13853711	12767675
	13021072	9552805	12284470	12749188
	12981612	9442924	11441470	13402812

Anova :Single Factor

Summary

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Groups</i>
day 1	3	38163761	12721253.7	2.3574E+11
day 2	3	29162842	9720947.33	1.5232E+11
day 3	3	37579651	12526550.3	1.4987E+12
day 4	3	38919675	12973225	1.3849E+11

ANOVA

<i>Source of variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>Mean of square</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>Critical F value</i>
Between Groups	2.0814E+13	3	6.9379E+12	13.7028952	0.001616055	4.066180551
Within Goups	4.0505E+12	8	5.0631E+11			

Total	2.4864E+13	11				
-------	------------	----	--	--	--	--

sr	711552.355
sj	1464190.52

CVr	5.94%
CVd	12.22%

Détails répétition TD

TD

Peak areas
×10⁷

	1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3	4.1	4.2	4.3	Mean	RSD %
Benzene	1.24	1.26	1.17	1.17	1.09	1.07	1.27	1.17	1.28	1.36	1.27	1.20	1.21	6.75
Toluene	1.25	1.27	1.19	1.16	1.09	1.08	1.29	1.19	1.30	1.37	1.28	1.22	1.22	7.13
Ethylbenzene	1.28	1.31	1.32	1.21	1.19	1.21	1.35	1.32	1.47	1.53	1.46	1.40	1.34	8.16
Xylene	1.07	1.07	1.04	1.01	0.977	0.975	1.13	1.07	1.20	1.21	1.20	1.13	1.09	7.80

Utilisation de Primosamp pour l'analyse de la qualité de l'air

Lors du développement du μ PC et du système Primosamp, d'autres types d'échantillons ont été analysés pour tester l'instrument et illustrer les différentes applications possibles. Une des applications visées du système Primosamp est le prélèvement de polluants de l'air sur site. Pour illustrer ces applications, nous avons analysé l'air ambiant dans une chambre dont la peinture et le papier peint avaient été refaits un mois auparavant. Le chromatogramme obtenu est montré dans la figure 4.44. Les conditions analytiques sont différentes des expériences précédentes et sont détaillées dans la légende.

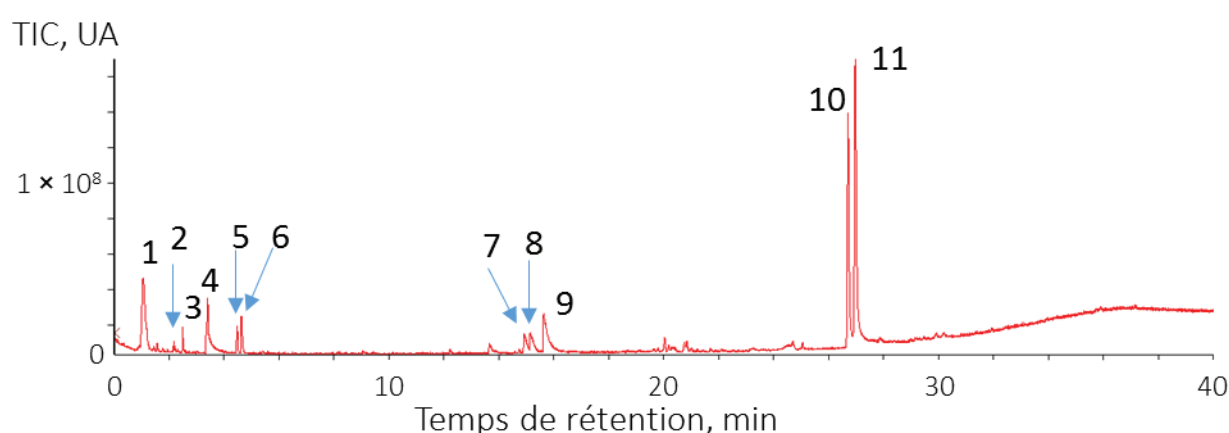


Figure 4.44. Chromatogramme de l'air ambiant d'une chambre 1 mois après des travaux de peinture et de papier peint. Conditions analytiques : colonne 5 ms, 30 m, 0,25 mm DI, 0,25 μ m de phase, 96 kPa d'hélium, 50 °C pendant 1 min, 3 °C/min jusqu'à 150 °C

Le chromatogramme comporte un peu plus d'une dizaine de pics dont plusieurs sont identifiés et présentés dans le tableau 4.6. Une recherche sur internet et dans la littérature a permis d'attribuer la provenance de ces molécules. Certains pics correspondent à des solvants standards comme l'heptane le n-propyl acétate ou l'octane. Le toluène est aussi un solvant utilisé pour les peintures et les vernis. Les attributions des pics 7 8 et 9 ne sont pas forcément exactes, mais ces trois pics correspondent à des isomères d'un solvant, le dowlanol.

Tableau 4.6. Exemple de quelques molécules identifiées dans le chromatogramme présenté figure 4.44

Pic	Tr, min	Identification	CAS	Commentaires
1	1,06	Methyl isocyanide	593-75-9	Plutôt volume mort mélange de plusieurs molécules?
2	2,17	Heptane	142-82-5	Solvant
3	2,49	n-Propyl acetate	109-60-4	Solvant
4	3,40	Toluène	108-88-3	Solvant
5	4,48	Octane	111-65-9	Essence, solvant
6	4,63	Hexanal	66-25-1	
7	14,90	Dipropylene glycol monomethyl ether	34590-94-8	Solvant, dowanol
8	15,13	Dipropylene glycol monomethyl ether	34590-94-8	Solvant, isomère de position du précédent dowanol
9	15,63	2- Propanol, 1 -(2-methoxypropoxy)-	13429-07-7	Solvant, isomère de position du précédent dowanol
10	26,70	?		Solvant dérivé du dipropylène glycol
11	26,97	?		Solvant dérivé du dipropylène glycol

Résumé

L'air expiré présente un intérêt pour des applications médicales comme le dépistage, le suivi de pathologies ou d'expositions. En effet, cet échantillon contient des marqueurs volatils endogènes ou exogènes et son prélèvement est non invasif. Même si le prélèvement est simple, la complexité et la variabilité de l'air expiré expliquent le peu de tests autorisés par les autorités sanitaires.

Cette thèse s'est intéressée à deux outils analytiques pour l'analyse de l'air expiré : une puce de préconcentration et la chromatographie en phase gazeuse intégralement bidimensionnelle. Ces deux techniques, peu explorées jusqu'à présents dans ce domaine, peuvent présenter un intérêt en simplifiant le prélèvement et en permettant une analyse plus exhaustive des marqueurs.

Le travail effectué sur la puce de préconcentration a montré que les micropréconcentrateurs fabriqués au laboratoire prélèvent et injectent des mélanges de gaz modèles et des échantillons d'air expiré avec des variabilités proches des systèmes de laboratoires. De plus, nos travaux ont montré que ces micropréconcentrateurs présentent deux avantages majeurs en réduisant les volumes d'échantillon nécessaires et en s'intégrant dans des systèmes simples, portables et fonctionnant sur batterie. Afin d'illustrer leur intérêt sur un cas réel simple, nous avons utilisé ces micropréconcentrateurs pour étudier trois marqueurs du tabagisme dans l'air expiré de trois fumeurs et de trois non-fumeurs et suivre les cinétiques de ces composés dans l'air expiré d'une personne. Finalement, nous avons effectué un travail préliminaire d'intégration dans des échantillonneurs dédiés afin d'exploiter les avantages des micropréconcentrateurs pour le prélèvement de l'air expiré et tenter d'obtenir un prélèvement sur une expiration unique.

Nous avons ensuite choisi et reproduit une architecture de modulateur fluide simple, pertinente pour la miniaturisation, basée sur un Dean's switch. Nous avons montré que ce modulateur décrit en 2016 était compatible avec une injection par thermodesorption et comparé ses performances à la GC simple pour l'analyse d'un même échantillon d'air expiré. Ceci a montré que cette architecture présente un intérêt en modulant des composés exhalés très volatils ce qui permet de nombreuses levées de coélution. Finalement, nous avons montré, grâce à des plans d'expériences, que l'amélioration des performances de ce modulateur nécessitait un contrôle minutieux des paramètres.

Enfin, nous avons confronté nos outils à des échantillons d'une malade atteinte d'une maladie rare, la phénylcétonurie. Des échantillons d'espace de tête d'urine et d'air expiré de la patiente ont été prélevés. Les résultats, incomplets à ce stade, sont discutés dans le manuscrit.

Mots Clés

Air expiré
COV
Microtechnologies
Chromatographie multidimensionnelle

Abstract

Breath is of interest for medical applications such as screening, monitoring pathologies or exposures. Indeed, this sample contains endogenous or exogenous volatile markers and its sampling is non-invasive. Although the sampling is simple, the complexity and variability of breath explain the few tests authorized by the health authorities.

This thesis focused on two analytical tools for the analysis of breath: a preconcentration chip and two-dimensional gas chromatography. These two techniques, little explored so far in this area, may be of interest by simplifying sampling and allowing a more comprehensive analysis of markers.

Work on the preconcentration chip has shown that micropreconcentrators manufactured in the laboratory sample and inject model gas mixtures and expired air samples with variability close to laboratory systems. In addition, our work has shown that these micropreconcentrators have two major advantages in reducing the necessary sample volumes and integrating into simple, portable and battery-powered systems. In order to illustrate their interest in a simple real-world case, we used these micropreconcentrators to study three smoking markers in the exhaled breath of three smokers and three non-smokers, and to track the kinetics of these compounds in a person's breath. Finally, we performed preliminary integration work in dedicated samplers in order to exploit the benefits of micropreconcentrators for the collection of breath and attempt to obtain a single expiratory sampling.

We then chose and reproduced a simple fluidic modulator architecture, relevant for miniaturization, based on a Dean's switch. We showed that this modulator described in 2016 was compatible with a thermodesorption injection and compared its performance to GC for the analysis of the same breath sample. This has shown that this architecture is of interest in modulating very volatile exhaled compounds which allows many coelution lifts. Finally, we showed, thanks to experimental designs, that the improvement of the performances of this modulator required a meticulous control of the parameters.

Finally, we confronted our tools with samples of a patient suffering from a rare disease, phenylketonuria. Samples of urine head space and exhaled air from the patient were taken. The results, incomplete at this stage, are discussed in the manuscript.

Key words

Breath
VOCs
Microtechnologies
Multidimensional chromatography