

N° de thèse :

THÈSE

Présentée à la Faculté de Pharmacie de Dijon

Pour l'obtention du Diplôme d'État
De Docteur en Pharmacie

Soutenue publiquement le 21 septembre 2018

Par **BATHELIER MSAYIF Hanane**

Née le 23/06/1984 à Khouribga (Maroc)

NOUVELLES FORMES DE DEPISTAGE ET DE DIAGNOSTIC PAR ANALYSE DE L'AIR EXPIRÉ

Détection non invasive de cancers

JURY :	Mr HEYDEL Jean-Marie	(Président)
	Mr HEYDEL Jean-Marie	(Directeur)
	Mr SCHMITT Antonin	(Membre invité)
	Mme SIKNER Clair	(Membre invité)



Université de Bourgogne
UFR des Sciences de Santé
Circonscription Pharmacie



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à la disposition de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur.

Ceci implique une obligation de citation et de référencement dans la rédaction de vos travaux.

D'autre part, toutes contrefaçons, plagiat, reproductions illicites encourt une poursuite pénale.

N° de thèse :

THÈSE

Présentée à la Faculté de Pharmacie de Dijon

Pour l'obtention du Diplôme d'État
De Docteur en Pharmacie

Soutenue publiquement le 21 septembre 2018

Par **BATHELIER MSAYIF Hanane**

Née le 23/06/1984 à Khouribga (Maroc)

NOUVELLES FORMES DE DEPISTAGE ET DE DIAGNOSTIC PAR ANALYSE DE L'AIR EXPIRÉ

Détection non invasive de cancers

JURY : Mr HEYDEL Jean-Marie (Président)
Mr HEYDEL Jean-Marie (Directeur)
Mr SCHMITT Antonin (Membre invité)
Mme SIKNER Clair (Membre invité)

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs

ARTUR Yves
CHAMBIN Odile
GROS Claude
HEYDEL Jean-Marie
LACAILLE-DUBOIS Marie-Aleth
LESNIEWSKA Eric
MARIE Christine
OFFER Anne-Claire
TESSIER Anne
VERGELY-VANDRIESSE Catherine

Biochimie générale et clinique
Pharmacotechnie
Chimie organique
Biochimie, biologie moléculaire
Pharmacognosie
Biophysique
Physiologie
Pharmacognosie
Physiologie
Physiopathologie, génétique

PU-PH

KOHLI Evelyne
GIRODON François

Immunologie, Virologie
Hématologie

Professeurs Emérites

ROCHETTE Luc
BELON Jean-Paul

Physiologie
Pharmacologie

Maîtres de Conférences

ANDRES Cyrille
ASSIFAOUÏ Ali
BASSET Christelle
BERARD Véronique
BETELLI Laetitia
BOUYER Florence
BOUYER Frédéric
CACHIA Claire
COLLIN Bertrand
DESBOIS Nicolas
FAURE Philippe
GUELDRY Serge
GUERRIAUD Matthieu
LEMAITRE Jean-Paul
NEIERS Fabrice
ROCHELET Murielle
SEGUY Nathalie
SEIGNEURIC Renaud
VIENNEY Fabienne
WENDREMAIRE Maëva

Pharmacotechnie
Pharmacotechnie
Immunologie, hématologie
Pharmacotechnie
Chimie analytique
Pharmacologie
Chimie physique, Chimie générale
Biomathématiques
Pharmaco-imagerie, radiopharmacie
Chimie organique
Biochimie générale et clinique
Biologie cellulaire
Droit pharmaceutique
Bactériologie
Biochimie, biologie moléculaire, enzymologie
Chimie analytique
Mycologie médicale, botanique
Biophysique
Biophysique
Toxicologie

MCU-PH

BOULIN Mathieu
FAGNONI Philippe
LIRUSSI Frédéric
SAUTOUR Marc
SCHMITT Antonin

Pharmacie clinique
Pharmacie clinique
Toxicologie, toxicovigilance
Biodiversité végétale et fongique
Pharmacologie, Pharmacie clinique

PRCE

ROUXEL Virginie

Anglais

AHU

CRANSAC Amélie

Pharmacie Clinique

PAST Officine

MACE Florent
MORVAN Laetitia



Université de Bourgogne
UFR des Sciences de Santé
Circonscription Pharmacie



NOTE

L'UFR des Sciences de Santé - Circonscription Pharmacie de Dijon déclare que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent tout naturellement à mon Directeur et Président du jury, le Professeur HEYDEL Jean-Marie. Vous me faites le grand honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse. Je tiens à vous remercier de m'avoir fait confiance en me proposant ce sujet si captivant, ainsi que pour votre disponibilité et votre pédagogie qui m'ont permis de m'approprier rapidement mon sujet de thèse. Vous avez toujours répondu présent à mes demandes et interrogations, et cela, dans la joie et la bonne humeur. Votre curiosité et votre passion pour la recherche sont très contagieuses et m'ont motivée tout au long de l'élaboration de ma thèse. Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez appris et en particulier, des bases expérimentales en biochimie. Un grand merci pour m'avoir suivie tout au long de cette thèse, pour vos précieux conseils, vos encouragements rassurants en particulier avant la soutenance, et ce malgré un emploi du temps déjà bien rempli. Je vous exprime toute ma gratitude et mon profond respect.

A Mme SIKNER, membre invité. Je vous adresse mes remerciements les plus chaleureux pour, tout d'abord, avoir accepté, sans aucune hésitation, d'être membre de mon jury et pour votre indéfectible soutien, votre écoute et vos précieux conseils. Je ne vous ai pas choisi par hasard, pour ainsi dire vous avez toujours fait partie de la composition de mon jury et ce depuis le début de mes études de pharmacie. En effet, vous êtes la personne qui m'a donné envie de faire ce métier. Il y a 10 ans vous aviez endossé le rôle de maître d'apprentissage au cours de mes études de préparatrice en pharmacie avec exemplarité, et vous m'avez tout enseigné sur ce sujet, au point d'éveiller en moi un profond désir d'aller plus loin et d'approfondir mes connaissances. Je vous en suis éminemment reconnaissante. Bien au-delà des connaissances, j'ai partagé ces deux années d'apprentissage au côté d'une femme extraordinaire, digne de confiance, et ô combien agréable. Merci aussi pour votre calme et votre zénitude à toute épreuve qui m'ont permis de vivre sereinement mes années d'apprentis. Ces conditions m'ont donné la force de croire en moi et de poursuivre mes études en pharmacie.

A Mr SCHMITT Antonin, merci d'avoir accepté de faire partie des membres de mon jury, d'avoir pris le temps de lire avec soin ce manuscrit et de juger ce travail. Pour votre présence et votre aimable contribution à ce stade ultime de mon cursus universitaire, je vous remercie sincèrement d'avoir accepté ma demande et j'espère que vous aurez apprécié la lecture de mon travail.

A mes parents, pour leur amour, leur soutien, leur encouragement pour la poursuite de mes études, même dans les moments difficiles de mon parcours. Pour leur soutien matérielles et les valeurs humaines qu'ils m'ont transmises. Ils m'ont aidée à surmonter les moments difficiles et ont toujours fêté à mes côtés, les moments de réussite dans la joie.

A ma grande sœur, Nisrine, pour simplement être à mes côtés depuis 33 ans. J'ai toujours pu compter sur elle et elle a assuré son rôle de grande sœur à merveille. Elle a toujours été pour moi un modèle de courage et de persévérance.

A mon petit frère, pour ta zénitude à toute épreuve et ton humour. Tu as toujours éveillé en moi ma joie de vivre.

A mon beau-père, Jean-François, et mes belle-sœur, Reine-Fleur et Juliette Bathelier. Vous m'avez toujours soutenue et encouragée et je vous remercie pour tout ce que vous m'apportez depuis tant d'années.

A ma belle-maman, Catherine pour ton soutien, et pour l'intérêt que tu as porté à la relecture sans relâche de mon sujet pendant ces derniers mois, et pour ton aide dans la préparation de ma soutenance. Tes qualités de rédactrice remarquables ont contribué à l'avancement de mon travail. Tu as toujours cru en moi et je t'en suis reconnaissante à jamais. A ton tour de passer ta thèse ! :)

À mon mari Rodolphe, avec qui je partage ma vie depuis 15 ans, grâce à qui je ne serais jamais arrivée à ce résultat. Tu m'as donné la force de croire en moi et de pouvoir faire ces études, m'as soutenue sans relâche toutes ces années dans les meilleures conditions morales et matérielles. Que ce soit pendant les périodes de concours, de révisions, d'examens, où la joie et la bonne humeur n'étaient pas au beau fixe, ta présence m'a permis de traverser ces épreuves avec davantage de sérénité. Merci d'avoir toujours su m'épaulée et me guidée dans mes décisions et mes choix, et d'avoir supportés tous ces moments de stress pendant mes (longues...) études. Sans toi, l'obtention de ce diplôme de docteur en pharmacie n'aurait pas été envisageable. Et enfin, merci de m'avoir offert le plus beau cadeau, d'être maman.

A mes bébés d'amour, Driss et Rayan, ils m'ont donné, de leur énergie, de leur tendresse et surtout de leur amour pour que j'accomplisse avec sérénité (et beaucoup d'organisation), mes études. Ils sont mes moteurs. Je les aime tant.

Je suis très reconnaissante envers Aurélie Couraleau et Leila Ait-Takka, mes deux chères collègues, pour avoir suivi régulièrement l'avancement de mes travaux ; les discussions ont toujours été très enrichissantes et leurs conseils précieux. Vous m'avez apporté vos compétences, vos disponibilités et vos qualités humaines.

Enfin, je n'oublie pas mes amis pharmaciens : Manon, Emma, Maelle, Clair, Fanny, Sarah, Fadoua, Damien, Kornelia, Constance, Jean-Marie, Alexis, Alecia, Marjolaine, avec qui j'ai passés de bons moments pendant mes années de faculté. Merci d'avoir toujours été là pour moi. Grâce à vous, je garderai un superbe souvenir de ces études.



Université de Bourgogne
UFR des Sciences de Santé
Circonscription Pharmacie



SERMENT

En présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples, je jure :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

NOUVELLES FORMES DE DEPISTAGE ET DE DIAGNOSTIC PAR ANALYSE DE L'AIR EXPIRÉ

INTRODUCTION	22
I. DEPISTAGE ET DIAGNOSTIC EN CANCEROLOGIE : ETAT DES LIEUX ET RECOMMANDATIONS.....	26
1.1. METHODES DE DEPISTAGE UTILISEES EN CANCEROLOGIE.....	29
1.1.1 Types de dépistage.....	29
1.1.1.1. Dépistage systématique dit « de masse ».....	29
1.1.1.2. Dépistage sélectif ou ciblé	30
1.1.1.3. Dépistage organisé ou communautaire	30
1.1.1.4. Dépistage opportuniste.....	30
1.1.1.5. Dépistage multiple.....	30
1.1.2. Evaluation d'un programme de dépistage	30
1.1.2.1. Les indicateurs de performance	30
a) Indicateurs d'impact	30
b) Indicateurs de qualité	31
c) Indicateurs précoces d'efficacité.....	31
1.1.2.2. Impact du résultat d'un test de dépistage.....	31
1.1.3. Les programmes de dépistage organisés disponibles en France.....	32
1.1.3.1. Dépistage du cancer du sein.....	32
a) Population cible	32
b) Déroulement de l'examen.....	33
c) Efficacité du dépistage du cancer du sein	33
d) Modalité de réalisation	34
1.1.3.2. Dépistage du cancer colorectal.....	34
a) Population cible	35
b) Déroulement de l'examen.....	35
c) Efficacité du dépistage	35
d) Modalité de réalisation	36
1.1.3.3. Dépistage du cancer du col de l'utérus.....	36

a)	Population cible	37
b)	Déroulement de l'examen.....	37
c)	Efficacité du dépistage	37
d)	Modalité de réalisation	38
1.1.3.4.	Dépistage du cancer de la prostate.....	38
a)	Population cible	38
b)	Déroulement de l'examen.....	39
c)	Efficacité du dépistage	39
d)	Modalité de réalisation	39
1.1.4.	<i>Avantages et inconvénients des tests de dépistage en vigueur en France.....</i>	<i>40</i>
1.2.	METHODES DE DIAGNOSTIC UTILISEES EN CANCEROLOGIE	41
1.2.1.	<i>L'analyse de sang</i>	<i>41</i>
1.2.2.	<i>Imagerie médicale.....</i>	<i>42</i>
1.2.2.1.	L'échographie	42
1.2.2.2.	La radiographie	43
1.2.2.3.	L'IRM.....	44
1.2.2.4.	Le scanner	44
1.2.2.5.	CT-scan.....	45
1.2.2.6.	Le PET-scan.....	45
1.2.2.7.	La scintigraphie.....	45
1.2.2.8.	L'endoscopie.....	46
a)	La coloscopie.....	46
b)	Laparoscopie.....	46
1.2.3.	<i>La biopsie</i>	<i>47</i>
a)	Contres indications de la biopsie	48
b)	Complications de la biopsie.....	48
1.2.4.	<i>Avantages / Inconvénients des différentes techniques diagnostic</i>	<i>49</i>
1.3.	METHODES NON CONVENTIONNELLES : INNOVATIONS DANS LE DEPISTAGE ET LE DIAGNOSTIC EN CANCEROLOGIE.....	50
1.3.1.	<i>Exploration génomique</i>	<i>50</i>
1.3.1.1.	Génome constitutionnel.....	51

1.3.1.2. Génome tumoral.....	51
1.3.2. <i>La théranostique</i>	52
1.3.3. <i>Technique du ganglion sentinelle (GS)</i>	53
1.3.4. <i>Les biomarqueurs en cancérologie</i>	55
1.3.4.1. Définition d'un biomarqueur	55
1.3.4.2. Les différents types de biomarqueurs.....	56
1.3.4.3. Biomarqueurs et traitements	57
1.3.4.4. Validation d'un biomarqueur	58
1.3.4.5. Biomarqueurs sérologiques ou concept de la « biopsie liquide »	59
a) Autoanticorps.....	59
b) Les cellules tumorales circulantes (CTC)	60
c) ADN tumoral circulant	60
d) Les microARN circulants	61
1.3.4.6. Biomarqueurs respiratoires ou concept de la « biopsie respiratoire ».....	62
II. ANALYSE ET EXPLOITATION DE L'AIR EXPIRÉ.....	65
2.1. GENERALITES : DEFINITION ET COMPOSITION DE « L'HALEINE »	65
2.1.1. <i>Définition</i>	65
2.1.2. <i>Composition de l'air expiré</i>	66
2.1.2.1. Principaux composés.....	66
2.1.2.2. Autres composés présents dans l'haleine.....	66
2.1.3. <i>Facteurs influençant la composition des COV</i>	67
2.1.3.1. <i>Facteurs endogènes</i>	68
a) Effets de l'âge et du sexe sur le profil des composés organiques volatils expirés	68
b) Effets de la présence de comorbidités	68
c) Effet de l'effort physique sur le profil de COV	68
2.1.3.2. <i>Facteurs exogènes</i>	69
a) Aliments et boissons	70
b) Composés apparentés au tabac.....	70
c) Polluants environnementaux	71
d) Médicaments	71
2.1.4. <i>Les approches « omiques » en lien avec l'analyse de la respiration</i>	72

2.1.4.1.	Notion de métabolome.....	73
2.1.4.2.	Notion de volatilome.....	75
a)	Définition	75
b)	Volatilome humain	76
i.	Composés organiques volatils dans le souffle.....	79
ii.	Composés organiques volatils dans le sang	79
iii.	Composés organiques volatils provenant des sécrétions cutanées.....	80
iv.	Composés organiques volatils de la salive	81
v.	Composés organiques dans les urines	82
vi.	Composés organiques dans les fèces	82
vii.	Composés volatils présent dans le lait maternel	84
c)	Volatilome environnemental	85
2.2.	ASPECT BIOCHIMIQUES ET PROPRIETES DES COMPOSES ORGANIQUES VOLATILS	86
2.2.1.	<i>Définition</i>	86
2.2.1.1.	Critères chimiques.....	86
2.2.1.2.	Critères physiques.....	87
2.2.2.	<i>Propriétés</i>	88
2.2.3.	<i>Mécanismes de formation</i>	89
2.2.3.1.	COV d'origine exogène.....	89
2.2.3.2.	COV d'origine endogène.....	91
2.3.	ASPECT METHODOLOGIQUE DE L'ANALYSE DE L'AIR EXPIRE	99
2.3.1.	<i>Prélèvements</i>	100
2.3.1.1.	Souffle d'expiration mixte.....	102
2.3.1.2.	Souffle d'expiration tardive.....	103
2.3.1.3.	Souffle de fin d'expiration.....	104
2.3.1.4.	Variabilités	105
a)	Air extérieur	105
b)	Reproductibilité.....	106
c)	Tabac.....	106
d)	Eau/ humidité.....	106
2.3.2.	<i>Echantillonnage de l'air expiré</i>	108

2.3.2.1.	Les différents types de collecteurs	108
2.3.2.2.	Fréquence d'utilisation par type de collecteur.....	110
2.3.2.3.	Qualité attendu d'un collecteur	110
2.3.2.4.	Aperçu sur les sacs en polymère	111
2.3.2.5.	Aperçu sur le BCA (Breath collecting appared) :	111
2.3.2.6.	Aperçu sur le Bio-COV TM	112
2.3.2.7	Alternative à l'échantillonnage : l'analyse en temps réel.....	113
2.3.3.	<i>Préconcentration</i>	114
2.3.3.1.	Choix de l'adsorbant.....	114
a)	Polarité	115
b)	Nombre de couches.....	115
2.3.3.2.	Tubes de désorption thermique (TD).....	115
a)	Avantages	116
b)	Inconvénients	117
2.3.3.3.	La micro extraction en phase solide (SPME)	117
a)	Avantages	118
b)	Inconvénients	118
2.3.3.4.	Les pièges à aiguilles (NTD)	119
2.3.3.5.	Cryo focalisation directe.....	119
2.4.	ASPECT ANALYTIQUE DE L'ANALYSE DE L'AIR EXPIRE : IDENTIFICATION, DETECTION, ET PROFILAGE DES BIOMARQUEURS RESPIRATOIRES.....	120
2.4.1.	<i>Méthodes conventionnelles d'analyse des COV</i>	121
2.4.1.1.	Méthode de séparation : Chromatographie en phase gazeuse	121
a)	La chromatographie simple	123
b)	La chromatographie multicentrique	124
2.4.1.2.	Méthodes de détection	124
a)	Détecteur universel	124
i.	Détecteur à ionisation de flamme FID.....	124
b)	Détecteurs spécifiques.....	125
i.	Détecteur à capture d'électrons (ECD)	125
ii.	Détecteur thermo-ionique (NPD).....	125

iii.	Détecteur à photo-ionisation (PID)	125
2.4.1.3.	Méthodes d'identification et de dosage.....	126
a)	Spectrométrie de masse.....	126
b)	Les différentes techniques couplées à la spectrométrie de masse	127
i.	GC-MS spectrométrie de masse par chromatographie en phase gazeuse	127
ii.	SIFT / MS.....	127
iii.	PTR / MS	127
iv.	PTR-TFMS.....	128
v.	IMMS	128
vi.	VPM-MS	128
vii.	SESI-MS.....	129
2.4.2.	<i>Méthodes non conventionnelles de l'analyse des COV, basées sur l'odorologie</i>	131
2.4.2.1.	Généralités	131
a)	Physiologie de l'olfaction	131
b)	Odeur et mémoire	132
2.4.2.2.	Utilisation des capacités olfactives des animaux et des insectes	133
a)	Les chiens	134
i.	Particularités	134
ii.	Détection de cancers par les chiens.....	136
	Cancer de la vessie.....	136
	Cancer du sein.....	136
	Cancer du poumon	137
	Cancer de la prostate.....	137
	Cancer du col de l'utérus.....	138
	Cancer de la thyroïde.....	138
iii.	Procédé de dressage.....	139
iv.	Avantages.....	141
	Le coût	141
	La rapidité.....	141
	L'innocuité et la non invasivité	141
	Alternative lorsque les outils actuels ne sont pas adaptés.....	141

v.	Limites	142
	Compatibilité selon la race	142
	Résultats aléatoires.....	142
	Temps de dressage et durée d'activité.....	142
b)	Les insectes.....	143
i.	Le PER des insectes ou reflexe de Pavlov	143
ii.	Avantages de l'utilisation des insectes en odorologie	143
c)	Abeilles.....	144
i.	Particularités	145
ii.	Danse des abeilles	145
iii.	Avantages.....	145
iv.	Projet Inscentinel®	146
v.	Protocole d'entraînement	146
vi.	Dispositifs utilisés	147
d)	Les rats (rat Pouched Giant Southern ou rat géant Africain)	150
i.	Particularités	150
ii.	Projet APOPO	150
iii.	Protocole d'entraînement (proposé par Weetjens et al. dans le projet APOPO (181)).....	151
iv.	Avantages.....	152
v.	Inconvénients.....	153
2.4.2.3.	Utilisation d'outils technologiques de détection de formes gazeuses et de COV	154
a)	Les nez électroniques (eNoses).....	155
i.	Les capteurs	156
ii.	Avantages des nez électroniques.....	159
	Coût	159
	Praticité	159
	Rapidité	159
iii.	Limites	159
iv.	Types de nez électroniques	160
	Le Na-Nose.....	160
	Le BreathLink.....	161

Applications smartphones.....	161
Ethylotests	162
Le B-test	163
Test du « KAIST »	163
Le Sniffphone.....	163
Test Adamant.....	165
Test Alpha MOS.....	166
Test Aryballe	166
Le MasSpec Pen®	167
Le Reciva® Breath Sampler.....	169
iKnife	170

III. ASPECT CLINIQUE DE L'ANALYSE DE LA RESPIRATION ET APPLICATION DES TESTS D'HALEINE 172

3.1. COV IDENTIFIES COMME BIOMARQUEURS DE CANCERS	172
3.1.1. <i>Cancer du poumon</i>	175
3.1.2. <i>Cancer de l'œsophage</i>	177
3.1.3. <i>Cancer des ovaires</i>	178
3.1.4. <i>Cancer du sein</i>	179
3.1.5. <i>Cancer de la prostate</i>	180
3.1.6. <i>Cancer de la vessie</i>	181
3.1.7. <i>Cancer colorectal</i>	182
3.1.8. <i>Mélanome</i>	184
3.2. ANALYSE DE LA RESPIRATION EN PRATIQUE CLINIQUE	186
3.2.1. <i>Les tests d'haleine</i>	186
3.2.1.1. Tests disponibles à l'étranger.....	186
3.2.1.2. Tests disponibles en France	187
a) Capnographie.....	187
b) Mesure du NO expiré pour le suivi du contrôle de l'asthme.....	189
c) Test respiratoire à l'urée-13C pour le diagnostic de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i>	190
d) Tests d'haleine d'hydrogène pour la prolifération bactérienne de l'intestin grêle.....	192
e) Test de Diagnostic de vidange gastrique retardée (GEBT)	194

f) Intoxication éthylique aiguë	195
3.2.2. La recherche dans le diagnostic respiratoire.....	196
3.2.2.1. Regard sur les groupes de recherche les plus actifs dans le diagnostic respiratoire	196
a) Menssana Research	196
b) Owlstone medical.....	197
c) Breath diagnostic	199
d) Fossil Ion Tech	200
e) Breathtec Biomedical	201
f) SYFT Technologies.....	201
g) Groupe de recherche LNBD	202
h) IABR	205
i) Groupe de recherche du projet KDOG	206
3.3. LIMITES OBSERVEES DANS LES METHODOLOGIES.....	209
3.3.1. Hétérogénéité des méthodes	209
3.3.2. Contaminants.....	212
3.3.2.1. COV d'origine alimentaire	212
3.3.2.2. COV liés au tabagisme	213
3.3.2.3. COV environnementaux.....	213
3.3.2.4. Correction des biais liés aux contaminants	214
a) Méthode « hors ligne »	215
b) Soustraction et détermination d'un gradient alvéolaire	215
i. Notion de gradient positif et négatif	216
3.4. DISCUSSION.....	217
3.4.1. Manque d'harmonisation et des standardisations des méthodes	217
3.4.2. Accessibilité des appareils de mesure.....	218
3.4.3. Enjeux éthiques	218
3.4.4. Manque de connaissance des COV respiratoires	219
3.4.5. Rôle des acteurs de santé.....	220
IV. CONCLUSION	223
ANNEXES	225

<i>COV et Maladies infectieuses</i>	226
Tuberculose	229
Autres infections	230
<i>COV et Maladies métaboliques</i>	231
Diabète	231
Maladies hépatiques	231
Insuffisance rénale	232
Les Halitoses ou « mauvaise haleine » caractérisant une pathologie	232
<i>Autres maladies détectables via l'haleine</i>	233
La sclérose en plaques	233
Parkinson	234
Alzheimer	235
Asthme	236
La fibrose kystique	237
Le rejet de l'allogreffe cardiaque	238
Le syndrome du côlon irritable	240
BIBLIOGRAPHIE	242

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Table des Figures

<i>Figure 1 : Illustration scène Antoine Lavoisier dans son laboratoire (2).....</i>	<i>22</i>
<i>Figure 2 : Répartition selon le sexe de la mortalité par cancer, en France 2014 (OMS)</i>	<i>27</i>
<i>Figure 3 : Principe de la théranostique. Nanoparticule combinant imagerie et thérapie (38).....</i>	<i>52</i>
<i>Figure 4 : Arbre décisionnel selon l'histologie du ganglion sentinelle (42)</i>	<i>54</i>
<i>Figure 5 : Diagramme TMUGS (grille de Hayes) (48).....</i>	<i>58</i>
<i>Figure 6 : les approches « omiques » au service de l'analyse du souffle (83)</i>	<i>72</i>
<i>Figure 7A : Sources du volatilome dans l'organisme humain</i>	<i>76</i>
<i>Figure 7B : Sources du volatilome dans l'organisme humain : nombres relatifs de composés classés par famille chimique.....</i>	<i>76</i>
<i>Figure 8 : Cascade du stress oxydatif aboutissant à la production de COV excrétés dans l'haleine ...</i>	<i>91</i>
<i>Figure 9 : Base hypothétique du test de l'haleine pour le cancer du poumon</i>	<i>93</i>
<i>Figure 10. Mécanisme de formation de l'acétone</i>	<i>95</i>
<i>Figure 11. Produits générés dans l'oxydation des acides gras polyinsaturés (36).....</i>	<i>96</i>
<i>Figure 12 : Schéma de la physiologie respiratoire (124).....</i>	<i>100</i>
<i>Figure 13. Cycle expiratoire (125).....</i>	<i>101</i>
<i>Figure 14. Représentation visuelle schématique représentant une seule phase respiratoire expirée par capnographie (125).</i>	<i>102</i>
<i>Figure 15. Comparaison des concentrations des substances volatiles respiratoires (83).</i>	<i>105</i>
<i>Figure 16 : Fréquence d'utilisation de procédé de collecte. répartition en pourcentage des types de récipients de collecte de l'air expiré (130)</i>	<i>110</i>
<i>Figure 17 : Schéma d'une chromatographie en phase gazeuse</i>	<i>122</i>
<i>Figure 18 : Couplage de plusieurs détecteurs pour analyse chromatographique (108).</i>	<i>125</i>
<i>Figure 19 : principe de la spectrométrie de masse (108).....</i>	<i>126</i>
<i>Figure 20 : Temps d'entraînement nécessaire pour la détection du cancer du col de l'utérus dans les sécrétions vaginales dans l'étude de Guerrero-Flores et al.</i>	<i>138</i>
<i>Figure 21 : Illustration d'une chaîne complète d'un système de détection chimique (détection de molécules en phase gazeuse ou liquide)(186).</i>	<i>155</i>
<i>Figure 22 : les différentes parties du capteur et leurs rôles.....</i>	<i>156</i>
<i>Figure 23 : Principes d'utilisation du Sniffphone® (195)</i>	<i>165</i>
<i>Figure 24 : Représentation schématique du système MasSpec et des étapes opérationnelles (196).....</i>	<i>167</i>
<i>Figure 25 : Système de location, d'envoi des cartouches et d'analyse via le Reciva® (197)</i>	<i>169</i>
<i>Figure 26 : Procédé du Iknife® (199).</i>	<i>170</i>
<i>Figure 27 : chromatogramme obtenu après GC-TOF de l'air exhalé d'un patient atteint de cancer du poumon (205).....</i>	<i>176</i>
<i>Figure 28 : Graphique représentant la concentration en sarcosine en fonction de différents tissus ..</i>	<i>181</i>
<i>Figure 29 : Courbe de capnographie et ses différentes phases (220)</i>	<i>188</i>

<i>Figure 30 : Réaction de fermentation du lactose dans les intestins de sujets atteint de malabsorption du lactose</i>	<i>192</i>
<i>Figure 31 : Schématisation de la malabsorption des hydrates de carbonés (230).....</i>	<i>193</i>
<i>Figure 32 : Principe du test respiratoire pour le diagnostic de la gastroparésie.....</i>	<i>194</i>
<i>Figure 33 : Echantillonneur RECIVA</i>	<i>198</i>
<i>Figure 34 Kit de collecte de biopsie du souffle</i>	<i>198</i>
<i>Figure 35 : SUPER SESI marquage CE et sortie commerciale du premier modèle en 2017</i>	<i>200</i>
<i>Figure 36 : Dispositif BreathTec.....</i>	<i>201</i>
<i>Figure 37 : Appareil « Voice200ultra »</i>	<i>202</i>
<i>Figure 38 : Principe du groupe de recherche LNBD</i>	<i>203</i>
<i>Figure 39 Schéma illustrant l'hétérogénéité des méthodes d'analyse de l'air expiré (130).</i>	<i>210</i>
<i>Figure 40 : COV émis par six espèces de bactéries pathogènes (5).....</i>	<i>228</i>
<i>Figure 41 : Différences de concentration de COV entre malades de SEP et témoins.....</i>	<i>233</i>
<i>Figure 42 : Proportion des COV exhalés par population malade de MA et témoins.....</i>	<i>235</i>
<i>Figure 43 Résultats avec biopsie versus test respiratoire</i>	<i>239</i>

Table des tableaux

Tableau 1 : Principaux cancers, classés en fonction du nombre de décès dans le monde.....	26
Tableau 2 : Principales différences entre test de dépistage et test diagnostique.....	28
Tableau 3 : Comparaison des deux types de tests de dépistage du cancer colorectal (21).....	34
Tableau 4 : Avantages et inconvénients tests de dépistages organisés.....	40
Tableau 5 : Exemples de radiographies selon les zones investiguées.....	43
Tableau 6 : Avantages et inconvénients des techniques de diagnostic en cancérologie	49
Tableau 7 : Dose de rayons X reçue par type d'examen (32)	49
Tableau 8 : Grille de SIMON (49).....	59
Tableau 9 : Différentes techniques de détection d'ADN circulant par PCR (7)	61
Tableau 10 : Concentration ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) d'une sélection de COV dans l'air ambiant, et l'air expiré, chez deux groupes de sujet : fumeur et non-fumeur. Nd = non détecté.....	85
Tableau 11. Classification des COV selon leur température d'ébullition.....	87
Tableau 12 Propriétés de quelques COV. Source : fiches toxicologiques de l'INERIS et de l'INRS....	88
Tableau 13 : Origine des COV et leurs liens avec un type cancer	98
Tableau 14 : Collecteurs d'haleine en vigueur dans la recherche de l'analyse respiratoire.....	109
Tableau 15 Combinaisons courantes de revêtements SPME.....	118
Tableau 16 : comparaison des caractéristiques des techniques de recherche de souffle disponible	129
Tableau 17 : Sensibilité des méthodes d'analyse disponibles pour les tests d'haleine (61)	130
Tableau 18 Caractéristiques des études clés de détection des odeurs par des chiens ou des nez électroniques (157).....	133
Tableau 19 : Méthodes d'entrainements et marquages utilisés dans des études sur la détection de cancer par le chien.(164).....	140
Tableau 20 :Comparaison des performances de différents types de capteurs de gaz (185).....	158
Tableau 21 : Paramètres d'influence sur les critères de performances des capteurs de gaz à oxyde métallique (183).....	160
Tableau 22. Composés organiques volatils reconnus comme biomarqueurs de cancer.....	174
Tableau 23 Composés organiques volatils caractéristiques du cancer de l'œsophage	178
Tableau 24 Liste des 21 COV détectés dans les échantillons de mélanome en quantité anormalement élevé en comparaison aux tissus sains (Abaffy 2010)	185
Tableau 25 : Exemples de tests respiratoires approuvés par la FDA (58).....	187
Tableau 26 : Associations entre variations de NO expiré et caractéristiques de l'asthme.....	189
Tableau 27 : Tests respiratoires à l'urée marquée au C^{13} ayant une AMM en France (226).....	191
Tableau 28 Exemples de projets du LNBD (256).....	204
Tableau 29 : Exemples de quelques études traduisant l'hétérogénéité des méthodes.....	211
Tableau 30 : Performances de quelques études du sens olfactif de l'homme, de l'animal et du nez électronique, pour la détection de maladies	227

Table des photos

<i>Photo 1 : Kit de dépistage immunologique du CCR (22)</i>	35
<i>Photo 2 : Tube BCA</i>	112
<i>Photo 3 : Appareil BCA (77)</i>	112
<i>Photo 4 : Antenne vue microscopique</i>	143
<i>Photo 5 : Etapes d'intégration des abeilles pour lier une odeur à une récompense</i>	147
<i>Photo 6 : Dispositif de verre à deux enceintes utilisé pour la détection d'odeur par les abeilles</i>	148
<i>Photo 7 : Autre type de dispositif en verre à deux enceintes</i>	148
<i>Photo 8 : Autre type de dispositif à deux enceintes</i>	148
<i>Photo 9 : Dispositif de détection d'odeur par les abeilles, adapté pour les aisselles</i>	149
<i>Photo 11 : Cage de détection des échantillons de tuberculeuse par des rats entraînés</i>	152
<i>Photo 12 : Capteur de mesure à l'oxyde d'azote/dioxyde</i>	158
<i>Photo 13 : Dispositif B-Test®</i>	163
<i>Photo 14 : Le SniffPhone : petit module enfichable pour smartphone (124)</i>	164
<i>Photo 15 : Collecteur Reciva® (195)</i>	169
<i>Photo 16 : Les deux malinois formés pour le projet KDOG</i>	207

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
AGCC :	Acide Gras à Chaîne Courte
AGPI / PUFA :	Acides Gras Polyinsaturés / Polyunsaturated Fatty Acids
ARN/MiARN :	Acide Ribonucléique / Acide Ribonucléique Messenger
CCR :	Cancer Colorectal
CINV :	Composés Inorganiques Non Volatils
CONV :	Composés Organiques Non Volatils
COV / VOC :	Composés Organiques Volatils / Volatils Organics Compound
CSV:	Composés Sulfurés Volatils
CT-SCAN :	Computed Tomography Scan
DMS:	Sulfure de Diméthyle
EGFR :	Epidermal Growth Factor Receptor
FCU / FCV :	Frotti Cervico-Utérin / Frottis Cervico-Vaginal
FDA :	Food Drug Administration
FENO :	Fraction Expirée d'oxyde d'azote
GC :	Chromatographie en Phase Gazeuse
HAS :	Haute Autorité de Santé
IMS/IM-MS :	Spectrométrie de Séparation de Masse à Mobilité Ionique
IRM :	Imagerie par Résonance Magnétique
LOD :	Limite de Détection
MCOV :	Composés Organiques Volatils Microbiens
MEMS :	Microsystèmes Electromécaniques
NO :	Oxyde d'azote
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PER :	Proboscis Extension Reflex / Réflexe / réflexe d'extension du proboscis
PET-SCAN :	Positron Emission Tomography / Tomographie à Emission de Positons
PPB/PPT :	Partie par Milliard (1:10 ⁹) / Partie par Billion (1:10 ¹²)
PSA :	Antigène Prostatique Spécifique
PTR-MS :	Spectrométrie de Masse à Réaction de Transfert de Protons
ROS :	Reactive Oxygen Species / Espèces Réactives à l'Oxygène
SIFT-MS :	Spectrométrie de Masse à Tube d'écoulement à Ions Sélectionnés
SPME :	Microextraction En Phase Solide
TDM :	Tomodensitométrie

Introduction

L'analyse de la respiration est un domaine de recherche récent dont les racines remontent à l'Antiquité. Pendant des siècles, comme ce fût le cas pour reconnaître la gangrène gazeuse sur le champ de bataille de la guerre 14-18 (1), notre sens de l'odorat a été utilisé comme outil de diagnostic dans la pratique de la médecine.

Antoine Lavoisier, chimiste français du XVIIIe siècle, fut le pionnier dans l'analyse du souffle et démontra qu'il contenait du dioxyde de carbone (2) (Figure 1). Wilhelm Petters, quant à lui découvrit l'acétone dans l'haleine dès 1857 (3).

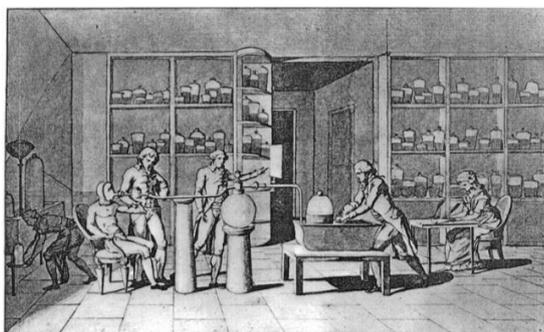


Figure 1 : Illustration scène Antoine Lavoisier dans son laboratoire (2)

Les odeurs émanant de la respiration ont ainsi été explorées à la recherche de corrélations entre maladies et odeurs de fluides biologiques. Classiquement, les explorations d'odeurs portaient sur celles provenant des urines : par exemple, une odeur douce et fruitée, attribuée aujourd'hui à l'acétone, était associée à un diabète sucré (4), ajoutons celles provenant de l'haleine, dont l'odeur semblable à celle de poisson guidait vers une maladie du foie ou bien une odeur semblable à une urine, qui orientait vers une maladie rénale (5).

L'ère moderne des tests d'haleine a commencé en 1971, date à laquelle le lauréat du prix Nobel Linus Pauling a respiré à travers un tube très froid pour "geler", et donc isoler, les composés organiques volatils (COV) (1). Par la suite, il a analysé ces composés congelés par chromatographie en phase gazeuse constatant ainsi que la respiration humaine normale contenait de nombreux COV différents à de très faibles concentrations.

Tout particulièrement en oncologie, la détection précoce de pathologie, est un facteur clé pour accroître les taux de survie des patients affectés.

Les maladies cancéreuses entraînent chaque année plusieurs millions de décès dans le monde. On sait aujourd'hui que plus tôt un cancer est dépisté, plus les chances de guérison augmentent. La chimiothérapie a d'autant plus de chances d'être efficace si elle est appliquée précocement.

Aujourd'hui, de nombreuses méthodes différentes sont utilisées pour le diagnostic de tumeur. Les plus répandues sont : la tomographie par ordinateur (scanner), l'imagerie nucléaire par résonance magnétique (IRM), la tomographie par émission de positons (PET-Scan), la mammographie et la tomodensitométrie par émission de photons uniques. Cependant, elles sont coûteuses et ne sont pas sans danger pour les patients (6).

Depuis la fin du XXe siècle, des progrès considérables ont été réalisés dans le domaine du traitement médical des cancers. Les années 2000 ont connu le développement d'environ 800 agents anticancéreux (cytotoxiques, inhibiteur de tyrosine kinase, anticorps monoclonaux, etc.), soit une croissance de 143% en un peu plus de dix ans (7). Cela a été possible grâce aux avancées de la biologie moléculaire et de la génétique qui ont permis l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Pour le diagnostic et la détection précoce du cancer, l'analyse des biomarqueurs émis par le souffle expiré, est prometteuse en tant qu'outil non invasif.

Ont été abordées dans plusieurs études, les capacités olfactives des animaux pour le repérage de maladie humaine via la libération de biomarqueurs volatils particuliers, toutes suggèrent une précision similaire, voire supérieur aux méthodes classiques.

Les empreintes olfactives des différents types de cancer, sont aujourd'hui sur le point d'être caractérisées, et pourraient conduire au développement de moyens de dépistage portables, faciles à utiliser, capables de détecter les cancers des poumons, des seins, colorectaux, de la prostate, etc., et ce, par un seul test de souffle. Ces méthodes une fois généralisés, et accessibles, pourraient avoir un impact significatif sur la mortalité par cancer.

Elles pourraient également aider à distinguer le cancer primaire des métastases, contrôler rapidement et régulièrement la réponse au traitement administré. Ce suivi de routine périodique

ouvrirait la porte à la réussite thérapeutique, ainsi qu'à la détection d'une récurrence précoce (8).

On observe un intérêt de plus en plus soutenu pour l'analyse de ce type de biomarqueurs retrouvés dans la respiration sous forme de composés organiques volatils en raison, notamment, de la possibilité de prendre des mesures répétées avec peu de désagrément ou d'inconfort pour la personne dépistée.

L'intérêt est également accru pour le diagnostic d'autres pathologies, comme certaines maladies infectieuses ; en effet, il a été montré que certains micro-organismes génèrent de grandes quantités de composés volatils diversifiés et qu'il est possible de les distinguer par leur empreinte olfactive. Ces composés organiques volatils microbiens (MCOV) sont issus du métabolisme propre des micro-organismes.

Le but de cette thèse est de mettre en évidence les progrès technologiques dans le domaine de l'analyse de l'haleine, ainsi que l'implication des capacités olfactives surprenantes des animaux, dans le dépistage et le diagnostic médical.

Pour ce faire, ce document de synthèse va se diviser en trois parties

La première partie est consacrée à un rapide tour d'horizon bibliographique sur les différentes méthodes de dépistage et de diagnostics médicaux, utilisés en routine, en mettant l'accent sur leurs points forts et leurs points faibles. Des pistes vers de nouvelles générations de dépistage et/ou diagnostic seront présentées.

Dans un deuxième temps, nous entrerons au cœur de cette problématique en nous intéressant à l'haleine, à ces caractéristiques et son exploitation dans le domaine du diagnostic médical.

Ensuite, nous argumenterons autour de différents biomarqueurs candidats pour des cancer à travers des exemples d'études, ainsi que des mises en application de tests d'haleine approuvés et de leur potentiel en tant qu'outils de diagnostic au sein de la médecine moderne. Cette troisième partie permettra également de nous projeter dans un futur proche, où l'haleine pourra être exploitée dans le diagnostic médical de routine.

Enfin, au-delà d'une conclusion, nous mettrons en avant les limites auxquelles sont confrontées la recherche de l'analyse respiratoire, les points d'améliorations à envisager pour une application en routine médicale. Se mêleront à cette réflexion les atouts du pharmacien pour endosser un rôle dans les programmes de dépistage organisés, grâce à ces outils révolutionnaires.

PARTIE I

DEPISTAGE ET DIAGNOSTIC EN CANCEROLOGIE

ETAT DES LIEUX ET RECOMMANDATIONS PERSPECTIVES D'INNOVATIONS

I. DEPISTAGE ET DIAGNOSTIC EN CANCEROLOGIE : ETAT DES LIEUX ET RECOMMANDATIONS

D'après les dernières statistiques de l'organisation mondiale de la santé (OMS) de 2015, le nombre de décès à la suite de cancers s'élevait à 8,8 millions de décès, ce qui en fait l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde.

Environ 14 millions de nouveaux cas de cancers dans le monde ont été recensés en 2015, et ce nombre devrait augmenter de 70% environ au cours des deux prochaines décennies (9).

A l'échelle mondiale, le cancer du poumon est parmi les plus graves dans le monde, comme en témoigne son incidence et sa mortalité ; c'est également le cas d'autres cancers, comme celui de l'estomac, du foie, du côlon et du cancer du sein, responsables de nombreux décès chaque année (Tableau 1).

Tableau 1 : Principaux cancers, classés en fonction du nombre de décès dans le monde Source OMS.

<i>Les principaux types de cancer</i>	<i>Nombre de décès</i>
<i>CANCER DU POUMON</i>	1 690 000
<i>CANCER DU FOIE</i>	788 000
<i>CANCER COLORECTAL</i>	774 000
<i>CANCER DE L'ESTOMAC</i>	754 000
<i>CANCER DU SEIN</i>	571 000

Environ un tiers des décès par cancer sont dus à 5 principaux facteurs de risque comportementaux et alimentaires (10) (11) :

- Un indice élevé de masse corporelle
- Une faible consommation de fruits et légumes
- Le manque d'exercice physique
- Le tabagisme
- La consommation d'alcool

Dans certains cas, la cause du cancer est héréditaire.

Les profils d'incidence et de mortalité du cancer diffèrent fortement d'un pays à l'autre ; on observe dans les pays les moins développés plus de 50% de l'incidence du cancer et générant 60% des décès (9).

En France, suivant les données de 2014 de l'OMS (12), le nombre de décès des suites d'un cancer a atteint 554 000 personnes. Avec un profil assez distinct entre les deux sexes, comme le montre la Figure 2, extraite d'un rapport de l'OMS, en 2014.

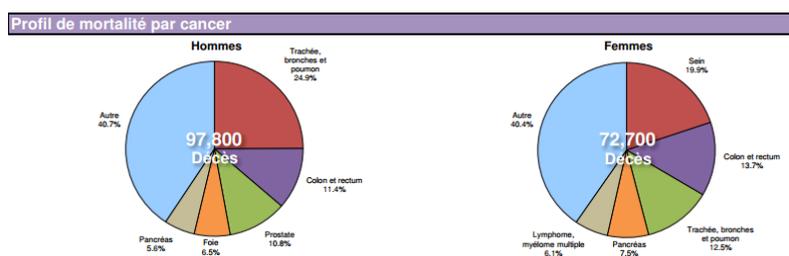


Figure 2 : Répartition selon le sexe de la mortalité par cancer, en France 2014 (OMS)

Dans la pratique clinique, diverses techniques de diagnostic et de stadification sont traditionnellement utilisées et diffèrent selon le type de cancer.

Ces techniques comprennent :

- Des tests sanguins,
- Des outils d'imagerie médicales, notamment les techniques de radiographie, mammographies, tomodensitométrie (TDM), d'imagerie par résonance magnétique (IRM), échographie, coloscopie, etc.

Il est bien entendu nécessaire de combiner plusieurs de ces techniques pour établir la présence, l'emplacement et la taille d'une masse anormale, ensuite la détermination finale du cancer est en règle générale posée après analyse d'une biopsie prélevée sur le tissu suspecté.

Néanmoins, une biopsie n'est confortable pour le patient ni exempte de complications.

En outre, il est possible de manquer de petites lésions, car les zones malades peuvent être parcellaires. Dans certains cas, comme dans les stades inférieurs de l'atrophie de la muqueuse gastrique (13), il existe de grandes variations inter-observateurs dans l'identification des lésions pré-malignes. Dans d'autres cas, comme dans la biopsie pulmonaire ou hépatique, il existe un risque de morbidité et même de mortalité suite à un processus de biopsie, principalement dû à des saignements (14).

Actuellement, on estime que 30 à 50% des cancers pourraient être prévenus. La prévention comprend la réduction des facteurs de risque et l'application des stratégies préventives existantes fondées sur des bases factuelles.

On peut aussi réduire l'incidence des cancers par le dépistage précoce et la prise en charge des patients. En effet, avec une détection précoce et un traitement adéquat, les chances de guérison sont étendues pour de nombreux cancers.

Le Plan Cancer 2014-2019 encourage un juste équilibre entre l'accessibilité à l'innovation sur le plan territorial et la sécurité des patients (15).

C'est ainsi que le dépistage vise à repérer les sujets asymptomatiques présentant des anomalies évocatrices d'un cancer particulier ou d'un stade précancéreux et à les adresser rapidement à une structure compétente pour un diagnostic de certitude et un traitement approprié (Tableau 2).

Les outils utilisés pour le dépistage sont parfois différents des examens diagnostiques car ils doivent pouvoir être utilisés sans risque sur de larges populations à un coût unitaire faible.

Tableau 2 : Principales différences entre test de dépistage et test diagnostique. HAS guide du dépistage (16)

Test de dépistage	Examen diagnostique
Etape préalable au diagnostic	Etape donnant une certitude diagnostique
Appliqué aux sujets asymptomatiques	Appliqué aux sujets présentant des troubles spécifiques
Pratiqué sur un groupe d'individus à haut risque	Essentiellement individuel
Ne constitue pas une aide à la décision thérapeutique	Débouche sur une décision thérapeutique

Les programmes de dépistage peuvent être efficaces pour certains types de cancers, en utilisant et en appliquant correctement des tests appropriés et en assurant la qualité des interventions.

En général, un programme préventif constitue une intervention de santé publique bien plus complexe qu'un diagnostic précoce (16).

1.1. METHODES DE DEPISTAGE UTILISEES EN CANCEROLOGIE

Un programme de dépistage s'adresse par définition à des individus asymptomatiques ou apparemment en bonne santé. Il convient donc de toujours vérifier par une évaluation que les avantages du programme l'emportent sur les inconvénients.

Les termes attribués à ses modalités n'ont pas toujours eu la même signification dans la littérature. La source officielle la plus récente retrouvée est celle de l'OMS publiée en 1970.

Selon l'OMS, le dépistage consiste à « identifier de manière présomptive, à l'aide de tests appliqués de façon systématique et standardisée, les sujets atteints d'une maladie ou d'une anomalie passée jusque-là inaperçue ».

Les tests adaptés doivent permettre de faire le partage entre les personnes apparemment en bonne santé mais qui sont probablement atteintes d'une maladie ou d'une anomalie donnée et celles qui en sont probablement exemptes.

La sous-population avec une probabilité plus élevée d'être atteinte, une fois identifiée, fera l'objet d'investigations à visée diagnostique, puis d'une intervention.

On entend par le mot « intervention » un traitement, une mesure préventive, ou une information jugée importante pour la personne malade.

1.1.1 Types de dépistage

Il existe différents types de dépistage (16) :

1.1.1.1. *Dépistage systématique dit « de masse »*

La population recrutée est non sélectionnée. Dans le cas particulier du critère d'âge, le dépistage est considéré comme généralisé à l'ensemble de la tranche d'âge considérée.

1.1.1.2. Dépistage sélectif ou ciblé

La population recrutée est sélectionnée sur des critères préalablement définis (facteurs de risque mis en évidence par des études contrôlées).

1.1.1.3. Dépistage organisé ou communautaire

Le contrôle est proposé dans le cadre de campagnes de dépistage et il s'appuie sur la participation volontaire des sujets.

1.1.1.4. Dépistage opportuniste

La population est recrutée pour le dépistage lors d'un recours aux soins : hospitalisation, visite médicale, centre de santé ou de dépistage, médecine du travail.

1.1.1.5. Dépistage multiple

Il consiste en la recherche simultanée de plusieurs affections par l'utilisation simultanée de plusieurs tests de dépistage.

1.1.2. Evaluation d'un programme de dépistage

1.1.2.1. Les indicateurs de performance

Des indicateurs précoces permettent d'évaluer le programme de dépistage en termes d'impact, de qualité et d'efficacité (16).

a) Indicateurs d'impact

Ils correspondent au taux de participation au programme de dépistage et au taux de fidélisation.

b) Indicateurs de qualité

Ils correspondent au taux de rappel, au taux de biopsies, à la valeur prédictive positive de l'indication de biopsie.

Ils permettent d'analyser les pratiques et de vérifier que les examens complémentaires sont effectués à bon escient, tout en évitant autant que possible d'effectuer des examens inutiles et angoissants pour les patients.

c) Indicateurs précoces d'efficacité

Ils correspondent au taux de cancers, au pourcentage de cancers in situ parmi les cancers identifiés, au pourcentage de cancers de bon pronostic parmi les cancers invasifs reconnus.

Ils ont pour objectifs de s'assurer que le diagnostic des cancers dépistés est suffisamment précoce pour espérer une réduction de la mortalité associée à ce cancer.

1.1.2.2. Impact du résultat d'un test de dépistage

Le dépistage d'une maladie a des retombées favorables chez les sujets correctement identifiés comme positifs ou négatifs.

Pour les vrais positifs, les avantages peuvent être une meilleure efficacité de l'intervention (traitement ou mesure préventive) instaurée plus précocement, de meilleures chances de survie des patients, ou une amélioration de la qualité de vie des patients par réduction des traitements, et une économie de ressources générée par une réduction du coût total de la prise en charge de la maladie (traitements initiaux moins radicaux et diminution de la morbi-mortalité).

Pour les vrais négatifs, les avantages peuvent être un sentiment de tranquillité éprouvé par les patients et un éventuel allègement des mesures de surveillance.

1.1.3. Les programmes de dépistage organisés disponibles en France

Le diagnostic précoce des cancers permet d'optimiser la prise en charge.

Trois programmes officiels de dépistage organisé existent en France : celui du cancer du sein, du cancer colorectal et du col de l'utérus.

Pour d'autres cancers, des outils de dépistage ont été développés mais ne permettent pas la mise en place de programmes de dépistage de masse en raison de leurs rapport bénéfices/risques ou gain/coût sur le plan de la santé publique. C'est par exemple le cas du cancer de la prostate.

1.1.3.1. *Dépistage du cancer du sein*

a) Population cible

Dans le cadre du programme de dépistage organisé du cancer du sein, une mammographie de dépistage est proposée aux :

- Femmes de 50 à 69 ans,
- Sans symptôme apparent, ni anomalie au niveau des seins,
- Ni facteur de risque de cancer du sein,
- Femmes ayant une hyperdensité mammaire
- Femmes sous traitement hormonal substitutif

Le dépistage systématique est limité à cette classe d'âge, car il a montré son efficacité en termes d'augmentation des chances de guérison grâce à un traitement plus précoce.

Néanmoins, avant 50 ans et après 69 ans, il est conseillé aux femmes de discuter avec leur médecin des avantages et inconvénients d'un dépistage, en tenant compte de leurs risques individuels.

Les femmes à risque élevé, à cause de leurs antécédents personnel ou familiaux, ou très élevé, dues à des prédispositions génétiques, doivent bénéficier d'un suivi personnalisé et ne sont pas éligibles à ce type de programme organisé.

b) Déroulement de l'examen

La mammographie : il s'agit d'une radiographie des seins réalisée à l'aide d'un appareil radiologique à rayons X, spécialement développé à cet effet.

Lors de cet examen, la patiente, torse nu, est debout face à l'appareil à rayons X. Chaque sein est successivement comprimé entre deux plaques pour bien étaler le sein. La sensation de compression du sein peut être désagréable, voire même parfois douloureuse, mais cette compression est nécessaire pour obtenir une qualité d'image optimale. Un ou plusieurs clichés de chaque sein sont réalisés.

c) Efficacité du dépistage du cancer du sein

Le test présente une sensibilité et une spécificité élevée.

Selon l'enquête EDIFICE, la fidélisation au programme de dépistage du cancer du sein (c'est-à-dire au moins une participation par femme éligible) est élevée. Seules les femmes âgées de 65 à 74 ans sont moins nombreuses à suivre ces recommandations (17).

Cependant, malgré sa gratuité, le taux de participation en France reste moyen, avec 53,2% des femmes de la population cible (18) (2,5 millions) ayant participé au dépistage organisé en 2012 ce taux reste en deçà des recommandations fixées à 70 %..

Les cancers identifiés sont majoritairement de petite taille (53 %) ou des carcinomes in situ (17 %).

Les études ayant évalué l'impact des programmes de dépistage organisé contre le cancer du sein rapportent un pourcentage de réduction de la mortalité liée au cancer du sein variant entre 3 % et 35 % selon les pays (19). Le surdiagnostic (lésion identifiée mais qui a un potentiel évolutif faible comme les cancers in situ) est estimé à 6,5% du total des cancers diagnostiqués.

Les cancers manqués (faux négatifs) dont le taux est réduit grâce à la procédure de seconde lecture des clichés mammographiques est estimés à 1,5%. Les cancers radio-induits seraient responsables de 1 à 5 décès pour 100 000 femmes ayant une mammographie tous les deux ans à partir de 50 ans avec une irradiation standard [2 à 5 mGy] (20).

En cas d'anomalies dans le sein, des examens complémentaires seront réalisés : cliché d'un détail ou agrandissement, échographie, IRM, scanner, ponction, biopsie ...

d) Modalité de réalisation

Cet examen gratuit est proposé tous les deux ans.

La mammographie de dépistage permet une détection précoce des cancers du sein, avant l'apparition des premiers symptômes. La mammographie de dépistage est prise en charge à 100 % par l'Assurance maladie, sans avance de frais, mais il existe un reste à charge, financé par les organismes complémentaires ou la patiente, pour les actes complémentaires éventuels (échographie, ponction, biopsie).

Après examen virtuel et palpation, le médecin pourra diagnostiquer une anomalie. Dans ce cas, une mammographie s'avérera nécessaire. Ainsi, la nature de l'anomalie sera précisée : tumeurs (bénignes ou malignes), kystes ou autres anomalies de la glande mammaire.

1.1.3.2. *Dépistage du cancer colorectal*

Le dépistage du cancer colorectal (CCR) est souhaitable en raison de son bon pronostic lorsqu'il est détecté tôt et ses chances de guérison dans 9 cas sur 10. Le programme national de dépistage organisé du cancer colorectal a longtemps reposé sur un test de recherche de sang dans les selles, le dispositif Hemoccult®.

Depuis 2015, un nouveau test immunologique, plus simple et encore plus performant que le précédent est disponible (Tableau 3). Il est aujourd'hui recommandé pour le dépistage organisé du cancer colorectal.

Tableau 3 : Comparaison des deux types de tests de dépistage du cancer colorectal (21).

Point de comparaison	Test au Guaiac Hemoccult®	Test immunologique
Prélèvement	6 prélèvement de selles	1 seul prélèvement
Simplicité	Plus de manipulations de selles	Technique de prélèvement plus simple et ergonomique
Performances	Faible sensibilité	Bonne sensibilité, détection des cancers et des lésions précancéreuses (polypes, adénomes)
Fiabilité	Faible fiabilité	La lecture automatisée garantit une meilleure fiabilité
Coût / Rentabilité	Faible rentabilité	Bonne rentabilité

Ces résultats expliquent la substitution du test au Guaiac (Hémocult®) en faveur du test immunologique dans l'organisation du dépistage du cancer colorectal.

L'utilisation d'un test immunologique à lecture automatisée a permis de donner un nouvel essor à la généralisation du dépistage du cancer colorectal en France (22).

a) Population cible

Le dépistage organisé du cancer colorectal propose aux hommes et aux femmes de 50 à 74 ans, à risque moyen, de réaliser tous les deux ans un test de recherche de sang dans les selles.

b) Déroulement de l'examen

Le test immunologique peut se faire au domicile du sujet, sa réalisation est rapide et indolore. Ce test vise à déceler la présence de sang humain dans les selles, due à d'infimes saignements provoqués par certains polypes ou cancers, difficiles voire impossibles à détecter à l'œil nu.

Ce test consiste à prélever un échantillon de selles et à l'envoyer au laboratoire de biologie médicale dont l'adresse est indiquée sur l'enveloppe T fournie avec le kit de test (Photo 1) (23).

Un mode d'emploi détaillé et illustré sont remis avec le test, ainsi qu'une vidéo explicative. En fonction du résultat le test sera suivi ou non d'une coloscopie.

Photo 1 : Kit de dépistage immunologique du CCR (22)



c) Efficacité du dépistage

Il a été démontré qu'un dépistage régulier permettait de réduire de 15 % la mortalité par cancer colorectal (5).

La simplicité d'utilisation devrait permettre d'augmenter la participation de la population-cible au dépistage organisé du cancer colorectal en France de 10 à 15 points.

Le taux de participation est de 33,5 % sur la période 2016/2017 (24). Cette participation reste en deçà des recommandations européennes (45 %) et des objectifs du Plan Cancer 2009-2013 (60 %).

Après la mise en place en 2015, du nouveau test immunologique de recherche de sang dans les selles, de nouvelles données ont été recueillies par l'enquête EDIFICE. Le suivi des recommandations montre une hausse significative du taux de participation (64%), avec une tendance identique chez les femmes et les hommes (17).

Une évaluation épidémiologique réalisée du 14 avril au 31 décembre 2015, montre que le programme a permis de détecter près de 4 300 cancers et 17 000 adénomes avancés (lésions précancéreuses).

Ainsi les cancers sont également dépistés plus précocement. Parmi les cancers invasifs, 46,5 % ont été dépistés à un stade 1 par le nouveau test vs 38 % avec le test au Gaiac (24) .

Si le résultat de ce test est positif (4,5 % des cas), une prescription de coloscopie sera ordonnée, bien que celle-ci ne révélera pas de lésion cancéreuse dans plus de 90 % des cas. On estime que le test immunologique génèrera un nombre de coloscopies environ deux fois plus important que l'ancien test.

d) Modalité de réalisation

À chaque campagne, 4 courriers successifs sont envoyés : les 2 premiers invitent les personnes à se rendre chez leur médecin généraliste pour un dépistage du cancer colorectal. Ils sont suivis d'un test à domicile. Le dernier envoi fait l'objet d'une simple relance.

Le kit est remis gratuitement par le médecin traitant à son patient et l'analyse du test est automatiquement prise en charge à 100 % par l'Assurance Maladie (25).

1.1.3.3. Dépistage du cancer du col de l'utérus

Le frottis de dépistage, encore appelé frottis Cervico-Utérin (FCU) ou Frottis Cervico-Vaginal (FCV) est, avec la vaccination contre le papillomavirus, le meilleur moyen de lutter contre le cancer du col de l'utérus (26).

Il permet de mettre en évidence d'éventuelles lésions pré-cancéreuses et de les traiter avant qu'elles ne se transforment en cancer.

Le Plan cancer 2014- 2019, prévoit de déployer un dispositif national de dépistage avec pour objectif de réduire l'incidence et le nombre de décès par cancer du col de l'utérus de 30 % sur 10 ans (15).

a) Population cible

Pour toutes les femmes âgées de 25 à 65 ans (ou de 20 à 65 ans dans les départements d'outre-mer), sauf indication contraire du médecin.

b) Déroulement de l'examen

Examen cytologique généralement pratiqué par un gynécologue ou sage-femme le plus souvent, mais aussi parfois un médecin généraliste.

Le frottis consiste pour le médecin à prélever des cellules au niveau de l'orifice du col de l'utérus à l'aide d'une petite brosse douce, puis à déposer ces cellules dans un milieu de transport afin de les confier au laboratoire d'analyse.

c) Efficacité du dépistage

Le but du frottis est de repérer d'éventuelles cellules anormales au niveau du col de l'utérus, souvent avant même qu'elles ne deviennent cancéreuses. Plus une anomalie est détectée tôt, mieux elle se soigne.

Sa sensibilité n'est pas parfaite. En effet, il est possible d'avoir des anomalies présentes sur le col qui ne soient pas détectées par le frottis (faux négatifs), c'est pourquoi il est important de le répéter régulièrement.

En France, les bénéfices du dépistage ont été significatifs ces dernières années. En 30 ans, nous sommes passés de 7 000 à 3 000 cas annuels, ramenant l'incidence de 18 pour 100 000 à moins de 10 pour 100 000, avec une diminution régulière des cas par an (26).

Les programmes de dépistage du cancer du col de l'utérus ont réduit l'incidence et la mortalité du cancer du col de l'utérus.

En 2014, la quasi-totalité des femmes interrogées (99%) dans l'enquête EDIFICE, âgées de 40 à 74 ans, ont déjà réalisé dans leur vie un frottis vaginal pour le dépistage du cancer du col de l'utérus et 81% d'entre elles déclarent suivre massivement les recommandations (un frottis tous les trois ans) (17).

d) Modalité de réalisation

Recommandation : un premier frottis à l'âge de 25 ans, puis deux frottis à un an d'intervalle. Si les résultats sont normaux, un frottis tous les trois ans suffit.

Prises en charge dans les conditions habituelles de remboursement : l'analyse du frottis de dépistage du cancer du col de l'utérus et les consultations chez votre médecin ou votre sage-femme.

1.1.3.4. Dépistage du cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez les hommes.

Il se déclare en générale entre 50 et 70 ans.

En France, il n'y a pas de programme de dépistage systématique du cancer de la prostate, recommandé officiellement par les autorités de santé chez les hommes sans symptôme.

a) Population cible

La maladie ne donnant pas de symptômes au début, il est recommandé de se faire dépister régulièrement à partir de 50 ans (27). Toutefois, s'ils le souhaitent, certains peuvent demander à bénéficier d'un dépistage du cancer de la prostate. Le médecin généraliste est également habilité à prescrire cet examen s'il le juge nécessaire.

b) Déroulement de l'examen

Deux examens de dépistage sont possibles :

- Le toucher rectal : il permet au médecin de vérifier le volume, la consistance et la texture de la surface de la prostate. Auscultation inconfortable mais indolore.
- Le dosage du PSA (antigène prostatique spécifique) par prise de sang : il permet de mesurer le taux de PSA dans le sang. Il s'agit d'une protéine produite par la prostate, habituellement présente en faible quantité dans le sang.

c) Efficacité du dépistage

Le bénéfice du dépistage du cancer de la prostate par dosage du PSA n'est pas clairement démontré. En effet, les deux tests de dépistage disponibles (dosage du PSA et toucher rectal) manquent de fiabilité : 1), un toucher rectal normal n'exclut pas un cancer car cet examen ne permet de détecter que des tumeurs palpables ; 2), un taux de PSA élevé ne signifie pas toujours qu'il y a un cancer, car d'autres maladies (hypertrophie bénigne de la prostate ou adénome de la prostate, prostatite, infection urinaire ou cystite aiguë) peuvent aussi être à l'origine d'une augmentation du taux de PSA dans le sang. En présence d'un taux de PSA augmenté, une biopsie complémentaire est généralement prescrite pour vérifier la présence d'un cancer, néanmoins absent dans 70 % des cas d'augmentation de PSA. En présence d'un taux de PSA diminué, une absence de cancer est constatée dans 90% des cas, toutefois, dans les 10% des cas restant, un cancer est bien présent malgré un faible taux de PSA.

De surcroît, il existe un réel problème de surdiagnostic et de surtraitement, face à un cancer détecté mais dont l'agressivité ne peut être déterminée ; en effet, près de la moitié des cancers de la prostate dépistés vont rester « latents », c'est-à-dire ne se révéleront pas ou évolueront très lentement (souvent sur plus de 15 ans), ces derniers ne nécessitent pas de traitement, ni d'opération.

d) Modalité de réalisation

Pour éviter de provoquer une augmentation du taux de PSA, le dosage de PSA doit être réalisé à distance d'un rapport sexuel, d'un toucher rectal, ou d'une activité physique.

1.1.4. Avantages et inconvénients des tests de dépistage en vigueur en France

Tableau 4 : Avantages et inconvénients des tests de dépistages organisés

Programme de dépistage	Avantages	Inconvénients
Outils de dépistage		
<u>Dépistage cancer du sein</u> Mammographie	Sensibilité / spécificité Gratuit	Risque de cancer radio-induit par les mammographies à répétition Inconfort / douleur
<u>Dépistage cancer colorectal</u> Test immunologique	Rapide, indolore, simple Bonne sensibilité, spécificité Simple, se fait au domicile	Temps d'attente résultats laboratoire Coloscopie de confirmation
<u>Dépistage cancer col de l'utérus</u> Frottis cervico utérin	Détection de cellules anormales avant pré-cancérisation Bénéfices en santé publique depuis 30 ans	Inconfort Consultation nécessaire Temps d'analyse cytologique laboratoire Technicité nécessitant bonne formation du praticien
<u>Dépistage du cancer de la prostate</u> Dosage PSA	Résultats rapides Fiabilité de 90% si taux faible	Prise de sang Seuil valeur anormal incertain (pas de consensus) Risque de Surdiagnostic / Surtraitement Taux en hausse à cause d'autres facteurs (pathologie, activités, ...)

1.2. METHODES DE DIAGNOSTIC UTILISEES EN CANCEROLOGIE

Selon le type de cancer, diverses techniques de diagnostic et de stadification sont appliquées en médecine clinique.

Tout diagnostic de cancer commence par un examen clinique attentif, le plus souvent suivi d'un bilan sanguin et d'un ou plusieurs examens par imagerie médicale.

Un seul ou plusieurs symptômes ne permettent jamais de conclure avec certitude à la présence ou non d'un cancer.

Aussi, des examens médicaux sont indispensables pour déterminer avec précision la nature, l'étendue et la gravité du problème.

Afin de pouvoir initier un traitement du cancer individuel, un diagnostic extrêmement précis de la tumeur cancéreuse est une condition essentielle.

1.2.1.L'analyse de sang

La prise de sang fournit des informations générales sur l'état de santé mais donne peu d'indications sur la nature et le degré d'évolution d'un cancer.

Néanmoins, en oncologie, l'analyse du sang peut avoir des utilités en termes de :

- Orientation au diagnostic de certains cancers : la présence de certains cancers peut être révélée par la libération dans le sang de marqueurs tumoraux spécifiques.
D'autre part, la prise de sang est sans conteste indispensable dans les cancers sanguins (leucémies et lymphomes), dans lesquels l'analyse du sang révélera la présence d'un nombre anormalement élevé de globules blancs, mais également une baisse des globules rouges et des plaquettes, en cas de leucémie.
- Suivi de la progression d'un cancer déclaré, notamment en évaluant la réponse de l'organisme aux traitements par une baisse des marqueurs tumoraux.
- Surveillance des effets secondaires des traitements : anémie, carences, infections, saignements, etc.

Des recherches sont en cours pour faire d'une simple prise de sang un outil permettant de dépister des cancers de l'ovaire, du foie, de l'estomac, du pancréas, de l'œsophage, du colon et du rectum, du poumon ou du sein, qui sont les plus fréquents (test CancerSEEK)(28).

De ces études est né le concept de « biopsie liquide », que nous verrons plus en détail en fin de chapitre.

1.2.2. Imagerie médicale

L'imagerie médicale est aujourd'hui un des principaux outils de diagnostic des cancers.

Elle permet d'obtenir des images des organes internes, plus ou moins précises selon la technique employée, et de visualiser ainsi les éventuelles tumeurs présentes.

Ces images apportent des informations sur la localisation, la taille et le stade évolutif des lésions tumorales. Au-delà de leur valeur diagnostique, elles sont très utiles dans la mise en place d'une stratégie thérapeutique.

1.2.2.1. L'échographie

Cet examen repose sur l'utilisation d'ultrasons (ondes sonores à haute fréquence). Elle permet d'examiner la plupart des organes de l'abdomen (foie, pancréas, vésicule biliaire, reins, ovaires, utérus...). Pour obtenir de meilleures images, il est parfois nécessaire d'introduire la sonde d'échographie dans une cavité de l'organisme (vagin, rectum ou œsophage) afin de la rapprocher de l'organe à étudier.

Dans le cadre du diagnostic des cancers, cet examen permet :

- Différencier un kyste rempli de liquide d'une tumeur solide
- Rechercher des anomalies dans les os ou les poumons
- Guider une ponction à l'aiguille ou une biopsie
- Déterminer le stade de la tumeur
- Evaluation de la propagation d'un cancer (métastases)

- Localiser une tumeur en observant la circulation du sang dans les vaisseaux (échographie Doppler), car la circulation sanguine n'est pas la même dans une tumeur que dans du tissu normal.

Cependant, l'échographie ne permet pas toujours de faire la différence entre une tumeur cancéreuse (maligne) et une tumeur non cancéreuse (bénigne) (29).

1.2.2.2. *La radiographie*

La radiographie est une technique classique d'imagerie médicale qui utilise des rayons X découverts à la fin du XIXème siècle par le physicien allemand Wilhelm Conrad Röntgen. Il est possible de radiographier toutes les parties du corps. Pour obtenir des images plus détaillées, un CT-scan (cf. chap. e) ou une IRM peuvent être nécessaires.

Cet examen sert principalement à examiner le thorax, l'abdomen et les seins (mammographie). Cette méthode d'imagerie se fonde sur l'utilisation de rayons X. Dans certains cas, l'examen est réalisé après une injection de produits dits « de contraste », afin d'obtenir des images précises de l'organe à étudier. Il existe plusieurs types de radiographies (Tableau 5).

La radiographie peut aider les médecins à :

- Evaluer la taille d'une tumeur
- Etablir la propagation de la tumeur
- Comparer la tumeur avant, pendant et après le traitement
- Dépister un cancer

Néanmoins, une radiographie ne permet pas de faire la différence entre une tumeur cancéreuse (maligne) et une tumeur non cancéreuse (bénigne).

Tableau 5 : Exemples de radiographies selon les zones investiguées

TYPE DE RADIOGRAPHIE	REGIONS INVESTIGUEES
MAMMOGRAPHIE	Seins
RADIOGRAPHIE OSSEUSE	Os
RADIOGRAPHIE PULMONAIRE	Thorax, poumons, cœur et os adjacents à la zone

1.2.2.3. L'IRM

L'imagerie par Résonance Magnétique est une technique encore plus sophistiquée, très utile à l'examen des organes mous et riches en eau comme le cerveau. Elle se base sur l'utilisation de champs magnétiques qui vont agir sur les molécules d'hydrogène présentes dans les tissus. Elle conduit à l'obtention d'images tridimensionnelles très précises des organes étudiés (30).

L'IRM permet de caractériser la tumeur détectée et de contrôler l'efficacité de certains traitements.

Il donne également une visibilité de la circulation des vaisseaux sanguin grâce à la l'injection d'un produit de contraste.

Cet examen est le plus adapté pour détecter les tumeurs, une infection ou une hémorragie(31).

1.2.2.4. Le scanner

Egalement appelé TDM pour tomодensitométrie, il s'agit d'un appareil qui utilise aussi des rayons X. Il permet toutefois l'obtention d'images beaucoup plus fines que la radiographie.

Par ailleurs, la méthode conduit non pas à l'obtention d'une seule image plane mais à celle d'une série de clichés correspondant à autant de coupes de l'organe étudié (tranches horizontales de 1 à 6 millimètres d'épaisseur).

Le scanner permet ainsi de reconstituer une image en trois dimensions relativement précises de l'organe et des anomalies qu'il comporte.

Là encore, l'injection de produit de contraste peut précéder l'examen.

Dans le cadre diagnostique des cancers, un scanner permet :

- La localisation d'une tumeur dans un organe, et si présence, aide à mieux la caractériser.
- Le contrôle de l'efficacité de certains traitements
- La surveillance de l'évolution d'une anomalie
- Le guidage des prélèvements percutanés (biopsies, ponctions)

Un scanner vient souvent en complément d'autres examens radiologiques, lorsque dans certains cas la recherche d'anomalies est moins bien repérable avec d'autres techniques d'imagerie médicale.

1.2.2.5. CT-scan

Un CT-scanner (CT pour Computer Tomography, tomodensitométrie) fournit des images très détaillées des organes, avec une précision de l'ordre du millimètre.

L'appareil se présente comme un énorme anneau, dans l'ouverture duquel glisse le patient, allongé sur une table mobile.

À chaque déplacement de la table vers l'intérieur de l'appareil, ce dernier prend une série de clichés.

Un CT-scan peut être réalisé avec ou sans produit de contraste.

Dans le premier cas, le produit de contraste doit être administré avant et / ou pendant l'examen, le plus souvent via perfusion.

1.2.2.6. Le PET-scan

Egalement appelé tomographie d'émission par positons, il s'agit d'une technique d'imagerie dynamique qui permet de visualiser le fonctionnement des organes. Son principe associe l'injection d'une molécule radioactive qui va « marquer » les cellules actives de l'organisme, notamment les cellules cancéreuses, et l'utilisation d'un scanner.

1.2.2.7. La scintigraphie

La scintigraphie est une autre méthode qui permet de visualiser l'activité des cellules de certains organes ou un tissu (cœur, thyroïde, poumons, os), à l'aide d'un produit faiblement radioactif. Le produit est injecté dans l'organisme via une veine et va se fixer dans l'organe ou le tissu à examiner. Le type de produit diffère en fonction de l'organe.

Ce traceur est ensuite détecté à l'aide d'une caméra spéciale (gamma-caméra) qui permet de reconstituer une image dynamique de l'organe et d'être ensuite examiner, en général après quelques heures, une fois la répartition de ce produit effectué.

Exemples pratiques :

- La scintigraphie de la glande thyroïde utilise de l'iode radioactif car cette glande a la particularité de capter activement l'iode. Cet examen fournit des informations sur l'activité fonctionnelle, l'étendue et le nombre des éventuelles anomalies.

- La scintigraphie du squelette utilise du calcium radioactif. Ce dernier se fixe sur les os et permet par exemple de mettre en évidence les éventuelles métastases osseuses.

1.2.2.8. *L'endoscopie*

Cette autre technique d'imagerie médicale permet la visualisation de l'intérieur des conduits ou des cavités de l'organisme.

Elle est fondée sur l'utilisation d'un tube optique muni d'un système d'éclairage, couplé à une caméra miniaturisée et le plus souvent, à des pinces qui permettent de réaliser des prélèvements en vue d'analyse (biopsie). Ce système, nommée endoscope peut être introduit dans l'organisme par les voies naturelles ou par une petite incision pratiquée en regard de l'organe à examiner.

L'endoscopie est nommée différemment selon l'organe étudié : pour le côlon on parle de coloscopie, pour celle de la vessie on parle de cystoscopie, dans le cas de l'exploration des voies digestives supérieures on parle de fibroscopie, etc. ...

a) La coloscopie

Elle est effectuée par un gastroentérologue assisté d'un médecin anesthésiste, constitue l'examen de référence pour visualiser l'intérieur de l'intestin. Il permet aussi de déceler et retirer d'éventuels polypes avant qu'ils n'évoluent en cancer.

Le risque de complications liées à la coloscopie existe mais il est rare. Outre les risques liés à toute anesthésie, celui de complications est de l'ordre de 1 à 4,5 pour 1 000 coloscopies réalisées, avec un risque plus important à partir de 70 ans. Le risque de décès est estimé entre 1 pour 18 000 coloscopies et 1 pour 10 000 coloscopies. Il est accru après 75 ans.

b) Laparoscopie

Il s'agit d'un examen au cours duquel le médecin examine l'intérieur de la cavité abdominale à l'aide d'un laparoscope, un tube long et fin équipé d'une caméra à son extrémité.

La laparoscopie permet de dépister les causes de différents symptômes au niveau de la cavité abdominale (laparoscopie exploratoire ou diagnostique) et, si possible, d'intervenir immédiatement (laparoscopie thérapeutique ou opératoire), ou encore de décider de la nécessité de procéder ultérieurement à une autre intervention.

1.2.3. La biopsie

Bien qu'une seule ou une combinaison des techniques présentées ci-dessus puissent montrer, dans une mesure limitée, la présence, l'emplacement et la taille d'une masse anormale, la détermination finale du cancer est faite par une biopsie prélevée sur le tissu spécifique.

Une biopsie n'est néanmoins ni pratique pour le patient ni exempte de complications.

Ce type d'analyse microscopique requiert le prélèvement d'un fragment de tissu suspect. Ce prélèvement peut s'effectuer de diverses manières :

- Par frottis (col de l'utérus par exemple)
- Lors d'une endoscopie (système digestif, bronches ou vessie) : prélèvements recueillis à l'aide de forceps placés en bout de l'endoscope.
- Par ponction (sein ou prostate)
- Par prélèvement chirurgical sous anesthésie locale ou générale (biopsie)

Les cellules isolées obtenues par ponction ou par frottis ne constituent généralement pas une base suffisante pour un diagnostic précis.

Une biopsie est donc également nécessaire, afin de prélever un fragment de tissu suspect.

Cet examen est presque toujours incontournable pour poser avec certitude un diagnostic de cancer : c'est le seul moyen de savoir si une anomalie, observée lors de l'examen clinique ou des examens complémentaires d'imagerie médicale, est bénigne ou maligne et le cas échéant, de connaître le type de cancer auquel on est confronté.

Dans cette approche, le pathologiste examine le tissu prélevé au microscope afin de déterminer la forme et/ou la concentration des cellules qui, à leur tour, pourraient donner des indications sur la ou les sous-type(s) et/ou des mutations génétiques de la maladie.

Ces informations sont essentielles au choix de la stratégie thérapeutique à mettre en place.

Malgré son grand intérêt diagnostique c'est un examen invasif qui n'est pas sans risque.

a) Contres indications de la biopsie

- Facteurs de risques infectieux
- Facteurs de risques hémorragiques : troubles de la coagulation sanguine ou malformation vasculaires

b) Complications de la biopsie

- Risque de dégénérescence maligne : transformation d'une lésion bénigne chronique en cancer.
- Risque de compromettre la continuité de la tumeur : modifications de forme ou de volume
- Risque d'aggravation d'un processus malin évolutif.
- Risque de dissémination des cellules cancéreuses,
- Risque hémorragique grave à la suite de l'effraction vasculaire

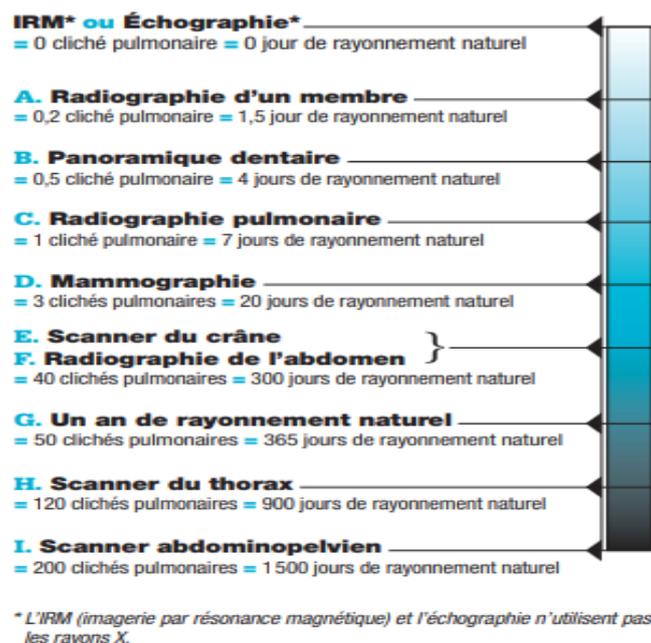
1.2.4. Avantages / Inconvénients des différentes techniques diagnostic

Dans le cadre d'un diagnostic oncologique, il n'y a pas de technique idéale, mais le choix d'un examen par rapport à un autre dépend surtout de ce que recherche le médecin.

Tableau 6 : Avantages et inconvénients des techniques de diagnostic en cancérologie

METHODES	INVASIF	COUTEUX	CONTRAINTE	DELAIS DES RESULTATS
ANALYSE DE SANG	Oui	En fonction des constantes recherchées	Prise de sang Inconfort	+/- long
TOMODENSITOMETRIE (SCANNER X OU CT)	Non	Coûteuse	Radiation 100 à 200 fois plus de rayons X que la radiographie	Immédiat
IRM	Non	Très coûteuse		Immédiat
ECHOGRAPHIE	Non	Oui	Inconfort possible	Immédiat
RADIOGRAPHIE	Non	Élevé	Risque de cancers si accumulation de rayon X(32)	Immédiat
BIOPSIE	Oui	Oui	Risques liés à l'acte chirurgical.	+/- long

Tableau 7 : Dose de rayons X reçue par type d'examen (32)



1.3. METHODES NON CONVENTIONNELLES : INNOVATIONS DANS LE DEPISTAGE ET LE DIAGNOSTIC EN CANCEROLOGIE

A l'heure actuelle, toute recherche de mutation somatique nécessite au préalable la réalisation d'une biopsie.

Sa réalisation comporte de multiples inconvénients, exposés dans le chapitre précédent, à savoir : les contraintes liées à l'invasivité et à la douleur que peut provoquer ce geste médical, et surtout les risques de complications. D'où l'intérêt de développer des techniques de plus en plus innovantes, pouvant apporter les mêmes informations que les pratiques conventionnelles, tout en étant moins invasives, moins douloureuses et moins contraignantes pour le patient.

En matière d'innovation, une attention toute particulière est portée sur la recherche et la validation de biomarqueurs accessibles directement à partir d'un prélèvement sanguin, caractérisant le concept de « biopsie liquide ».

L'aboutissement de ce concept permettrait la mise en place d'analyses réalisables dans les délais réduits et pouvant être réitérées au cours du suivi des patients. Dans tous les cas, les biomarqueurs identifiés devront être validés et atteindre un niveau de preuve avant d'être proposés en application diagnostique.

1.3.1. Exploration génomique

En présence d'une tumeur, on distingue deux types de génome :

- Le génome de l'hôte (génome constitutionnel)
- Le génome de la tumeur

Ces deux entités représentent une source d'information capitale, aussi bien pour le diagnostic, que le pronostic, mais aussi pour la mise en place d'une stratégie thérapeutique.

Le profil d'expression génique des cellules cancéreuses est associé à l'hétérogénéité tumorale et au résultat du traitement, permettant ainsi une vision globale du fonctionnement cellulaire.

Le profil d'expression protéique des cellules cancéreuses fournit quant à lui des informations importantes pour l'instauration d'un traitement, car la plupart des agents thérapeutiques ciblés sont conçus pour inhiber l'activité des protéines (33).

1.3.1.1. Génome constitutionnel

Les informations fournies par le génome du patient sont essentiellement les mutations germinales. Ces dernières permettront de caractériser certaines dispositions génétiques :

- Les prédispositions aux cancers,
- Les polymorphismes associés à l'évolution de la maladie ou aux effets des traitements

Exemple de mutation germinale :

Gènes BCRA1 et BCRA2 : leur présence évoque l'existence d'un syndrome de prédisposition familiale. Ils sont recherchés de façon systématique dans les cancers du sein.

La disponibilité du séquençage du génome humain a incité à proposer le séquençage systématique des génomes cancéreux, conduisant à la découverte de nombreux gènes cancéreux supplémentaires (34).

1.3.1.2. Génome tumoral

Les génomes de toutes les cellules cancéreuses portent des mutations somatiques (35) :

- Substitutions de base
- Insertions et délétions (« indels »)
- Réarrangements et des altérations du nombre de copies
- Changements épigénétiques

Ces 30 dernières années, environ 400 gènes du cancer ont pu être identifiés. Ils sont répertoriés dans le COSMIC, catalogue des mutations somatiques dans le cancer (36), la plus vaste base de données mondiale de mutation somatiques des cancers humain.

Les anomalies moléculaires présentes dans le génome tumoral sont maintenant recherchées afin de justifier la prescription de certains agents anticancéreux dont l'activité n'est possible que sur les cellules présentant l'altération génétique considérée.

Exemple d'anomalies moléculaire :

Mutation du domaine kinase du gène EGFR des cancers du poumon : sa présence conditionne la prescription de Gécitinib et Erlotinib (35) (37).

1.3.2. La théranostique

Cette nouvelle discipline, dont le nom est dérivé du terme « thérapie » associé au terme « diagnostique », permet à la fois d'établir un diagnostic et de mettre en place une intervention thérapeutique en libérant un principe actif de façon ciblée, tout ceci à l'aide de nanoparticules développées à cet effet. La Figure 3 ci-dessous schématise le principe de la théranostique.

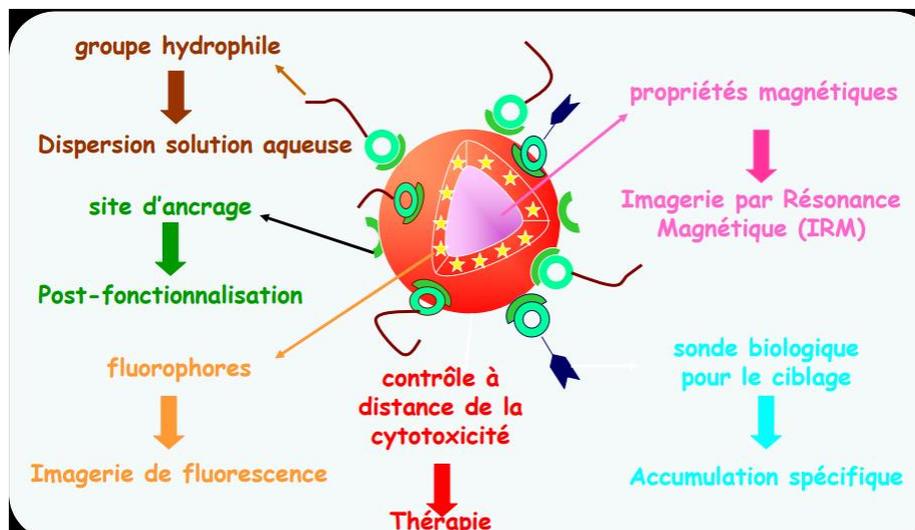


Figure 3 : Principe de la théranostique. Nanoparticule combinant imagerie et thérapie (38)

Grâce à cette technologie, utilisant des stratégies multidisciplinaires de pointe, la détection précoce d'une tumeur ainsi que le suivi de son évolution est envisageable, permettant ainsi d'instaurer un traitement adapté par libération de principe actif *via* les nanoparticules.

En effet, dans le cas du cancer, les nanoparticules vont sélectivement cibler les tissus tumoraux, grâce à l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention). Ce concept selon lequel des molécules de tailles nano-moléculaires ont tendance à s'accumuler dans le tissu tumoral beaucoup plus que dans les tissus normaux (39), permet d'observer sélectivement les tissus malades par des techniques d'imagerie médicale comme l'IRM.

Un exemple typique en théranostique est l'utilisation de traceurs marqués au gallium 68 (Ga^{68}) pour le diagnostic. Une thérapie s'ensuit en utilisant des radionucléides thérapeutiques comme le lutécium 177 (Lu^{177}) pour le traitement, puis l'yttrium 90 (Y^{90}) pour une radiothérapie métabolique (PRRT) permettant le suivi de la thérapie (40).

Cette approche, où le diagnostic et la thérapie sont couplés, peut conduire à des soins plus efficaces, en adaptant l'intervention thérapeutique des patients qui en bénéficieront le plus tôt possible, tout en réduisant ou en éliminant les traitements inutiles (37).

1.3.3. Technique du ganglion sentinelle (GS)

Ce concept a été développé en 1992 par Morton, en vue d'améliorer le taux de détection de métastases par analyse histologique (41). La théorie du ganglion sentinelle est née en supposant que si le premier relais d'une chaîne ganglionnaire est sain, les autres ganglions le sont également et donc le curage ganglionnaire, dont la morbidité n'est pas négligeable, est inutile (42).

En effet, les ganglions dénommés « sentinelles » sont les premiers de la chaîne ganglionnaire dans laquelle se draine la lymphe et par conséquent les métastases d'une tumeur.

Cette notion a été caractérisée la première fois en injectant du bleu Patent dans le derme entourant le mélanome cutané, tout en observant le drainage lymphatique. Le ganglion sentinelle est repéré en peropératoire par sa couleur bleue.

Cette technique chirurgicale permet de prélever et d'analyser le premier relais d'une chaîne ganglionnaire et de rechercher des micro-métastases qui signeraient l'envahissement ganglionnaire, dans le cadre du bilan d'extension de certains cancers.

L'absence d'envahissement par des cellules métastatiques semble être un signe fiable de l'absence d'envahissement des autres ganglions et permet d'éviter au patient la morbidité d'un curage ganglionnaire (Figure 4). La lymphadénectomie est, de ce fait, réservée aux patients présentant un ou plusieurs ganglions envahis (7).

Cette technique est utilisable pour les tumeurs cutanées ayant un fort potentiel lymphophile, en particulier le mélanome malin cutané. On l'utilise également pour les carcinomes neuroendocrines de Merkel et certains carcinomes épidermoïdes cutanéomuqueux à haut risque de récurrence (42).

Cette technique de détection a ensuite été améliorée par Alex et al., en 1993 par l'utilisation de la lympho-scintigraphie au sulfure colloïdal de rhénium marqué au technétium 99 métastable (^{99m}Tc), associée à une détection peropératoire à l'aide d'une sonde de détection gamma. Le taux de succès de cette procédure était de 97 %. Il s'agit maintenant de la technique de référence.

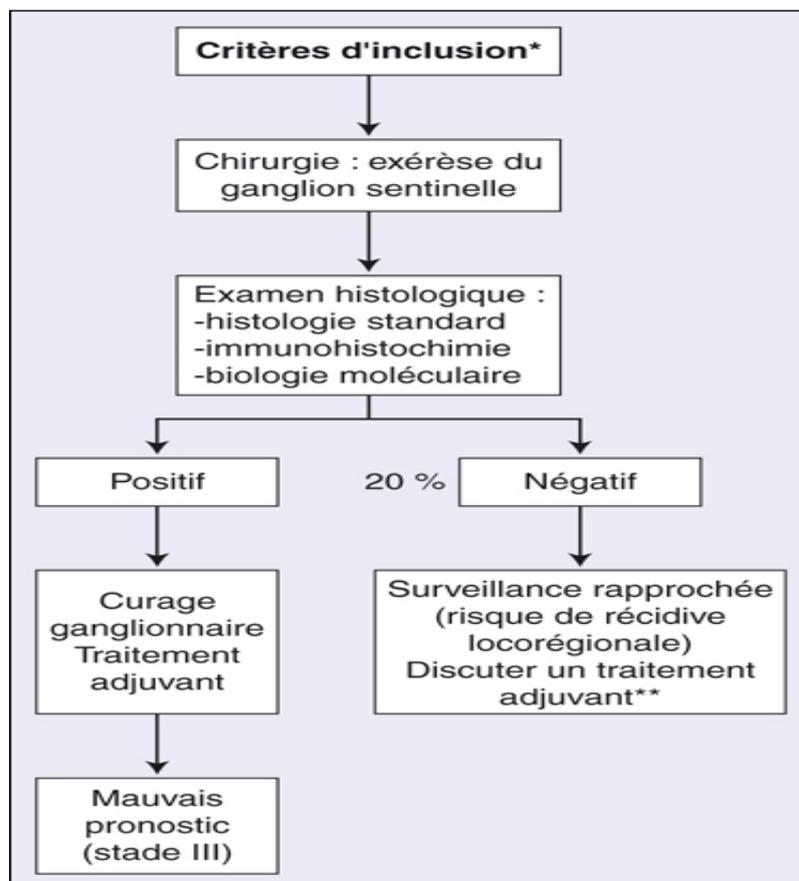


Figure 4 : Arbre décisionnel selon l'histologie du ganglion sentinelle (42)

1.3.4. Les biomarqueurs en cancérologie

Dans un même souci d'amélioration des conditions de diagnostic médicale et d'efficacité thérapeutique, la médecine moderne fait de plus en plus appel à l'analyse des paramètres biologiques du malade. L'étude de ces paramètres permet, de surcroît, l'identification de marqueurs biologiques, autrement dit les biomarqueurs.

La mise en évidence de nouveaux biomarqueurs occupe une place importante dans la recherche en oncologie, impliquant ainsi de plus en plus la biologie moléculaire.

L'un des objectifs d'identification des marqueurs biologiques est d'aider le clinicien à établir un diagnostic et de fournir une thérapeutique la plus personnalisée possible, adaptée à chaque type de tumeur et à chaque patient.

Au fil des ans, des biomarqueurs ont été découverts pour un grand nombre de cancers. La recherche dans ce domaine évolue rapidement. Certains biomarqueurs du cancer sont déjà utilisés dans la pratique hospitalière quotidienne, d'autres sont encore en phase d'expérimentation.

1.3.4.1. Définition d'un biomarqueur

Le terme de biomarqueurs a été défini par le National Institute of Health, en 1998, comme « une caractéristique mesurée objectivement (c'est à dire avec une précision et une reproductibilité suffisante) et évaluée comme indicateur de processus physiologique, pathologique ou de l'action des médicaments, permettant ainsi de distinguer un état médical normal d'un état pathologique ou de mesurer une réponse à un traitement » (43).

Toutefois, cette définition s'avère non réaliste, car les différences entre les teneurs pour une cellules malades et une cellule normale sont essentiellement quantitatives.

Si on reprend la définition issue de l'ouvrage de Biochimie médicale, rédigé par l'association des enseignants de biochimie et biologie moléculaire des facultés de pharmacie, un marqueur biologique est « un composé biochimique dont les teneurs chez un ensemble homogène de

malades, sont statistiquement très éloignées de celles d'un ensemble de sujets sains, donnant un caractère discriminant à sa mesure » (44).

Ces marqueurs peuvent appartenir à tous les types de familles de molécules biologiques existant, néanmoins la majorité des marqueurs biologiques appartiennent à la famille des protéines.

1.3.4.2. Les différents types de biomarqueurs

On distingue des biomarqueurs de différentes natures :

- Physiopathologiques : en lien avec des modifications des fonctions de l'organisme
- Diagnostiques : permettent d'identifier une pathologie
- Pronostiques : permettent de prédire l'évolution de la pathologie et de déterminer le risque de la récurrence (pronostic)
- Pharmacodynamique prédictible : définit la dose optimale de médicaments chez un patient donné
- Génétiques (constitutionnels) : permettent de prédire une éventuelle toxicité pharmacogénétiques ou pharmacogénomiques, d'envisager la réponse du patient au traitement proposé et de déterminer la susceptibilité vis-à-vis des traitements

Certains biomarqueurs sont déjà utilisés en cancérologie pour aider au diagnostic, par exemple à l'identification des cancers dans les premiers stades de leur développement, ou prévoir l'agressivité de la tumeur.

Les biomarqueurs génétiques informent du contenu du matériel génétique présent dans chaque cellule. L'augmentation des connaissances sur les mutations héréditaires a permis le développement d'un dépistage génétique dans certaines situations bien particulières. Les personnes pour lesquelles on identifie ce risque héréditaire peuvent alors bénéficier de mesures de prévention ou de dépistage spécifiques.

Il est probable de découvrir dans un proche avenir, davantage de mutations prédisposant au cancer, ce qui multipliera les possibilités de dépistage et de prévention.

Les marqueurs tumoraux sont des substances - généralement des protéines - présentes chez chaque individu en très faibles quantités. Ces marqueurs peuvent aussi être produits en excès par certaines cellules cancéreuses. Des quantités anormales de ces protéines dans le sang, l'urine, les selles ou dans certains tissus, peuvent donc indiquer l'existence d'une tumeur. Mais la présence ou l'absence d'un marqueur tumoral n'est pas une preuve suffisante de l'existence d'un cancer. Des examens complémentaires sont nécessaires pour obtenir un diagnostic de certitude.

À titre d'exemple, une augmentation du taux de PSA (Prostate-Specific Antigen - antigène prostatique spécifique) dans le sang peut révéler un cancer de la prostate mais aussi avoir bien d'autres causes (inflammation, augmentation banale du volume de la prostate, tumeur bénigne, etc.). À l'inverse, un taux normal de PSA ne garantit pas l'absence d'un cancer de la prostate. L'interprétation des taux de marqueurs tumoraux est donc délicate.

Pour pouvoir être utilisés dans le diagnostic, l'idéal serait d'avoir des marqueurs tumoraux parfaitement spécifiques à différents cancers.

1.3.4.3. Biomarqueurs et traitements

Il est important d'établir avec un maximum de précision la nature et le degré d'agressivité d'un cancer pour pouvoir adapter le traitement au cas par cas. Certains biomarqueurs peuvent y contribuer.

Dans le cancer du sein, par exemple, il est possible, en analysant l'activité de sept gènes différents, de prévoir le risque de micro métastases susceptibles de provoquer une rechute (45). L'intensité du traitement peut donc être adaptée en fonction des résultats.

Autre exemple, la présence de l'anomalie appelée chromosome de Philadelphie, spécifique à certaines formes de leucémies, est importante pour le choix d'un traitement sur mesure.

1.3.4.4. Validation d'un biomarqueur

Les conditions des phases pré-analytiques et analytiques, en particulier les modalités de prélèvement, d'acheminement, de stabilisation, sont à prendre en compte dans l'application en pratique clinique de ces biomarqueurs (46) (47).

Il est possible d'attribuer un degré de preuve à un facteur biologique grâce au diagramme *Tumor marker utility grading system* (TMUGS) (Figure 5), permettant d'établir une classification selon leur niveau d'utilité et leur niveau de preuve.

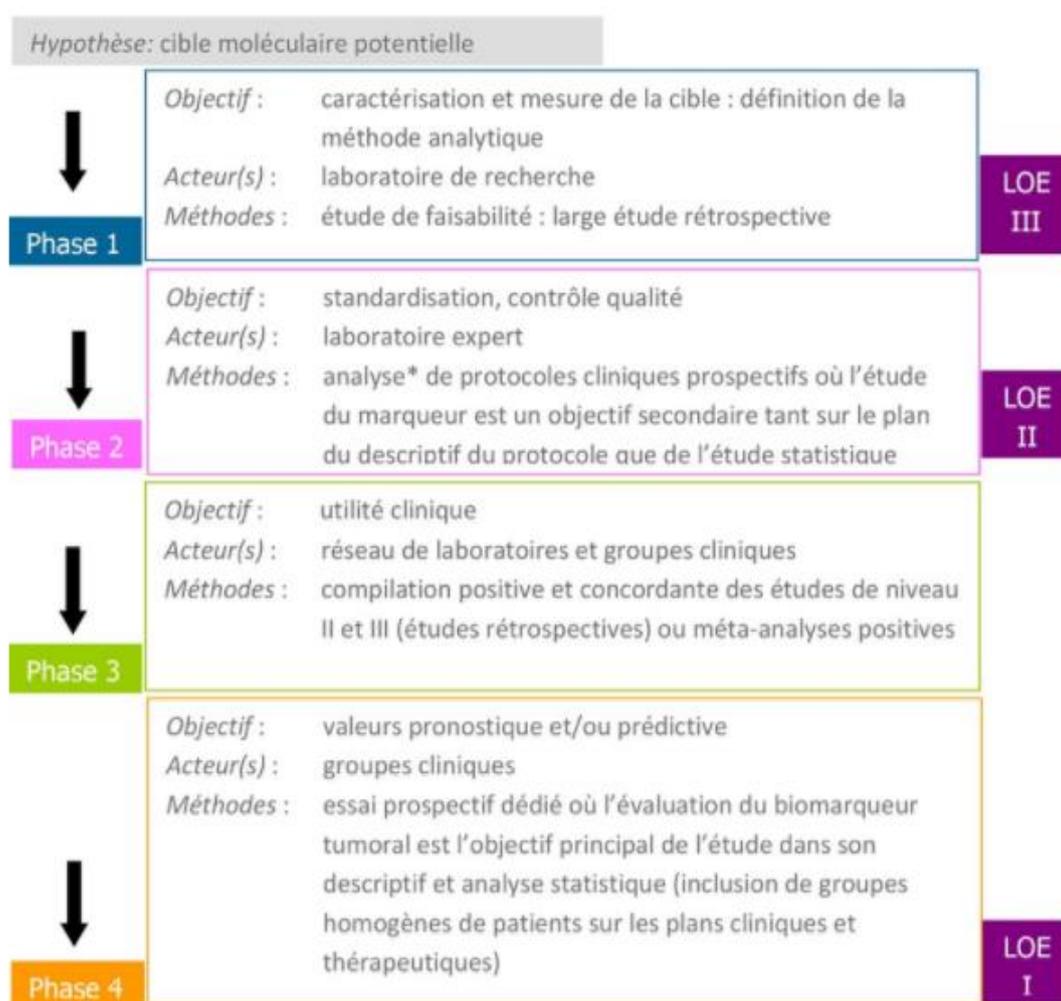


Figure 5 : Diagramme TMUGS (grille de Hayes) (48)

La grille de Hayes a été mis à jour par Simon, en 2009. Dans cette dernière version les attributions des niveaux de preuves ont été précisés (Tableau 8).

Tableau 8 : Grille de SIMON (49)

Niveau de preuve	Description des études	Etudes de validation disponibles
LOE IA	Prospectives	Non nécessaires
LOE IB	Prospectives-Rétrospectives utilisant des échantillons archivés prospectivement dans le cadre d'un essai clinique (*)	1 étude ou plus avec des résultats concordants Échantillons provenant d'essais cliniques différents
LOE IIB	Prospectives-Rétrospectives utilisant des échantillons archivés prospectivement dans le cadre d'un essai clinique	Aucune étude ou plusieurs études avec des résultats non concordants
LOE IIC	Prospectives-observationnelles (registre)	2 études ou plus avec des résultats concordants
LOE IIC	Prospectives-observationnelles (registre)	Aucune étude ou 1 étude avec des résultats concordants ou non concordants
LOE IV-VD	Rétrospectives-observationnelles	Non applicable
(*) Particularité : « attribution d'un niveau de preuve LOE IB à des études rétrospectives s'appuyant sur des échantillons archivés d'un biomarqueur qui avaient été collectés prospectivement dans le cadre d'un essai randomisé non dédié à l'étude de ce marqueur » [42] [18].		

En vue d'une validation, un marqueur doit répondre à des critères de qualités :

- Stabilité : il ne doit pas varier au cours de la maladie, mais le faire de manière rapide ;
- Spécificité
- Sensibilité.

Les méthodes de mesures adaptées à ces marqueurs devront également répondre à des exigences strictes quant à leurs qualités analytiques.

Les points clés d'une méthode d'analyse sont : sa sensibilité, sa précision, sa reproductibilité, sa fiabilité et sa justesse.

1.3.4.5. Biomarqueurs sérologiques ou concept de la « biopsie liquide »

a) Autoanticorps

En raison de leur stabilité et de leur persistance dans les échantillons de sérum, les autoanticorps ont attiré l'attention en tant que marqueurs sérologiques.

Avec l'amélioration des technologies de détection des anticorps, on s'intéresse de plus en plus à l'utilité des auto-anticorps en tant que biomarqueurs diagnostiques et pronostiques, notamment dans le cancer de l'œsophage.

b) Les cellules tumorales circulantes (CTC)

Les cellules tumorales circulantes proviennent de la tumeur primaire et sont libérées dans la circulation, où elles peuvent former des micro-métastases.

Différents tests ont été développés et utilisés pour évaluer le potentiel diagnostique et pronostique des CTC dans plusieurs types de cancer, y compris le cancer du sein, colorectal, gastrique et œsophagien.

c) ADN tumoral circulant

Lors de la croissance tumorale, certaines cellules tumorales meurent et libèrent leur contenu dans la circulation sanguine (50). Il a été mis en évidence que le plasma contenait une représentation de l'ensemble du génome de la tumeur et donc les mêmes altérations géniques et épigéniques que la tumeur dont il provient (51).

L'idée est d'isoler de l'ADN libéré par la tumeur dans les systèmes fluides (sang, sécrétions, urine...) et de détecter les mutations somatiques.

Cette technique offre au patient un meilleur confort par sa mise en œuvre aisée. L'ADN tumoral circulant pourrait ainsi devenir un biomarqueur de choix dans le diagnostic, le suivi mais également dans la thérapeutique des cancers.

Cependant, la présence d'ADN en quantité très faible dans le sang rend sa détection difficile et exige le développement de techniques très sensibles et spécifiques, sans toutefois être coûteuses et complexes (52).

Les études réalisées sur ADN tumoral circulant ont été effectuées à différents stades de la maladie afin d'établir une corrélation entre les mutations identifiées, la taille de la tumeur et le stade de la maladie, ce qui a permis de mettre en évidence une concordance entre les mutations détectées par prise de sang et à partir de la biopsie de la tumeur primitive (51).

La capacité de cet examen à prédire la récurrence de la maladie est un point particulièrement intéressant. Les techniques de détection actuellement disponibles sont cependant, pour la plupart, toujours à l'état de recherche et ne sont pas reconnues comme des examens diagnostiques validés (Tableau 9).

L'étude récente d'une équipe de Montpellier a démontré la faisabilité clinique sur 106 patients atteints d'un cancer colorectal métastatique et l'existence d'une corrélation forte entre l'ADN tumoral retrouvé dans la circulation et le génome tumoral (53).

La faisabilité de ces techniques en routine reste cependant à démontrer.

Tableau 9 : Différentes techniques de détection d'ADN circulant par PCR (7)

Technique	Volume de l'échantillon	Qpcr	Précision	Multiplexage
QX200™ Droplet Digital™ PCR System	20µl	Non	+/- 10%	Oui -détection jusqu'à 2 mutations
RainDrop™ Digital PCR System	5-50 µl	Non	1mutant/25 x10P4	Oui -détection jusqu'à 10 mutations
Intplex	1 ml de plasma 5 µl d'ADN extrait	Oui	< 0.01 %	Oui -détection jusqu'à 10 mutations
BEAMing	0.5 – 4 ml de plasma/sérum	Non	<0.1%	Oui -détection jusqu'à 10 mutations
QuantStudio™ 12K Flex System	10-100µl	Oui	< 1 copie	Oui -détection jusqu'à 2 mutations
Digital PCR Biomark HD	8 µl	Oui	1copie /0.85nl	Oui -détection jusqu'à 5 mutations

d) Les microARN circulants

Les microARN (miARN) sont de petits ARN non codants (~ 22 nt), capables de réguler l'expression des gènes et des protéines. Les miARN sont abondamment exprimés dans une forme stable, avec des niveaux très constants dans les fluides corporels par rapport aux protéines et aux ARNm, et ont attiré l'attention comme biomarqueurs du cancer et de la maladie.

Des études récentes ont rapporté que les miARN circulants / plasmatiques sont des marqueurs potentiels de diagnostic et de pronostic dans certains cancers gastro-intestinaux, adénocarcinome œsophagien, gastrique et colorectal.

Les miARN sont facilement détectés dans les fluides corporels, par exemple, le sérum, le plasma, l'urine, ainsi que des cellules tumorales circulantes. Leur potentiel en tant que biomarqueurs diagnostiques et pronostiques facilement accessibles, non invasifs et thérapeutiques reste à exploiter (54). En tant que tel, la mutation des miARN, le dysfonctionnement de la biogenèse des miARN et le dérèglement des miARN et de leurs cibles peuvent entraîner diverses maladies. Actuellement, il a été rapporté que ~70 maladies sont associées à des miARN(55).

1.3.4.6. *Biomarqueurs respiratoires ou concept de la « biopsie respiratoire »*

Une nouvelle approche basée sur l'identification et l'analyse des composés organiques volatils (COV) est en pleine évolution dans le diagnostic du cancer. Les COV sont des composés organiques caractérisés par une pression de vapeur élevée dans des conditions normales de température ambiante, et présents dans les échantillons corporels tels que l'air expiré, le sang, l'urine, les matières fécales, les sécrétions cutanées, le lait maternel, la salive.

Parmi ces diverses sources de COV de l'organisme, l'haleine est une matrice très intéressante. L'air expulsé lors de l'expiration contient en plus du dioxyde de carbone et de l'oxygène, plusieurs autres gaz élémentaires comme l'oxyde nitrique (NO), et un grand nombre de composés organiques volatils (COV), pouvant être exploités en tant que biomarqueurs (56).

Ce mélange complexe constitue une sorte d'empreinte, l'"empreinte de souffle", et transporte une multitude d'informations sur notre état de santé. Sa composition chez des patients atteints, par exemple, d'un cancer du poumon, d'une maladie pulmonaire inflammatoire, d'un dysfonctionnement hépatique ou rénal peut être caractérisée par un profil de COV particulier (57).

En effet, les COV générés dans l'organisme voyagent à travers le corps via le sang, puis traversent l'interface alvéolaire avant d'apparaître dans le souffle expiré à l'état de trace.

Le principe d'observer des modifications de concentrations de COV lors d'un stress oxydatif, lui-même provoqué en réponse à un processus pathologique, ou produit par des cellules cancéreuses ou par des micro-organismes, a bâti cette hypothèse.

Le lien entre odeur de l'haleine et maladie est reconnue depuis l'époque d'Hippocrate dans la Grèce antique, qui a décrit *fetor hepaticus* et *fetor oris* dans son traité sur l'arôme et la maladie respiratoire (58).

Dans le cadre de cette synthèse, c'est le point de vue diagnostique de l'analyse des COV qui est mis en avant. Il a été récemment décrit qu'une seule respiration humaine peut délivrer plus de 2000 COV uniques, représentant ainsi un conséquent réservoir de biomarqueurs potentiels du cancer. Certains ont déjà démontré leur utilité clinique en tant que biomarqueurs potentiel du cancer du poumon, du cancer du sein, du cancer de la prostate, du cancer colorectal, du cancer gastrique et, plus récemment, du cancer de l'œsophage.

Parce qu'elle est totalement non invasive, relativement bon marché et qu'elle fournit un résultat rapide après la collecte des échantillons, l'analyse de l'haleine représente une solution intéressante pour la détection précoce du cancer, en comparaison aux méthodes conventionnelles de diagnostic histopathologique qui nécessitent beaucoup de temps et de travail et qui peuvent de ce fait retarder la prise de décision au cours des procédures diagnostiques et thérapeutiques.

Bien que les développements dans les méthodes de diagnostic et les technologies de surveillance se sont concentrés sur l'analyse de sang et d'urine pour le diagnostic clinique, le souffle expiré est une matrice évidente pour un dépistage précoce grâce à l'analyse des COV. Ces COV, à l'état de traces, sont mesurés en parties par million en volume (ppmv) et en parties par milliard en volume (ppbv), voire moins (59).

En termes d'avancée technologique, les techniques analytiques actuelles permettent la mesure adaptée des composés organiques volatils (COV) émis par des échantillons cliniques, tels que la respiration exhalée, l'urine, le sang, le sérum, les expectorations et les fèces.

L'analyse des concentrations de COV dans la respiration avec une précision acceptable peut fournir un indicateur de l'état métabolique, permettant une distinction entre les états sains et malades. En dépit de ses avantages, les diagnostics basés sur le profilage des COV ne sont pas encore largement utilisés en pratique clinique (60).

Il est bien établi que la recherche de biomarqueurs moléculaires constitue un complément dans les méthodes de diagnostic conventionnelles et une amélioration du rendement diagnostique. C'est pourquoi, la poursuite dans ce domaine de recherche est indispensable.

Cette tendance actuelle vers la médecine personnalisée dans le traitement du cancer est essentielle pour optimiser la réponse clinique et minimiser la toxicité des thérapies (33).

Beaucoup de progrès ont été réalisés dans ces domaines, mais certaines difficultés persistent, telles que l'hétérogénéité tumorale, les effets génétiques, épigénétiques et micro environnementaux, et doivent être surmontées pour développer des biomarqueurs efficaces.

Néanmoins, l'analyse de la respiration est un domaine de recherche récent et doit faire face à des défis de taille, principalement dus au manque de connaissance des mécanismes biochimiques derrière la formation des COV.

PARTIE II

ANALYSE ET EXPLOITATION DE L'AIR EXPIRÉ

ASPECTS BIOCHIMIQUES, METHODOLOGIQUES ET ANALYTIQUES DES TESTS D'HALEINE

II. ANALYSE ET EXPLOITATION DE L'AIR EXPIRÉ

2.1. GENERALITES : DEFINITION ET COMPOSITION DE « L'HALEINE »

2.1.1. Définition

Le dictionnaire Larousse définit l'haleine comme « l'air qui sort des poumons pendant l'expiration » (61) ; cet « air » est plus complexe qu'il n'y paraît. Il s'agit, plus précisément, d'un ensemble de composés sous forme gazeux, pouvant avoir diverses origines.

En effet, l'haleine est un mélange d'air, de vapeur d'eau, de gaz carbonique et de différentes molécules émanant des voies respiratoires inférieures (poumons) et supérieures (cavité buccale) du sujet qui expire.

Elle véhicule notamment les « odeurs buccales » dont les caractéristiques changent tout au long de la vie et selon l'état de santé.

Comme d'autres fluides corporels, l'haleine renferme de larges quantités de métabolites, des composés produits par le métabolisme de l'organisme, ce qui lui confère la possibilité de transmettre des informations pertinentes sur l'état physiopathologique d'un organisme.

En effet, les métabolites sont des molécules instables et suffisamment petites pour passer du sang aux voies respiratoires, et se retrouver ainsi dans le souffle.

Les résultats de diverses études mettent en évidence une composition de métabolites propre à chaque individu.

Dans la littérature scientifique, l'ensemble de ces composés est défini comme le "breathprint", littéralement "empreinte d'haleine".

En matière d'empreinte, mise à part l'empreinte digitale, déjà bien exploitée, une autre sorte de signature intéresse de plus en plus l'odorologie, notamment à des fins de criminologie. Il s'agit de l'empreinte d'odeur corporelle. Proche de l'empreinte d'haleine compte tenu de sa composition riche en composés organiques volatils, elle se distingue néanmoins de celle-ci car la nature et la quantité des COV qu'elle contient sont déterminés selon des prédispositions

génétiques propre à chaque individu, ce qui explique leur caractère stable et inchangé, telle une véritable empreinte.

En effet, contrairement à elle, "l'empreinte d'haleine" diffère selon les habitudes de consommation du sujet et éventuellement les facteurs influant sur son organisme, comme une pathologie particulière. Les changements dans les concentrations de composés organiques volatils biogéniques peuvent être utilisés pour refléter les processus métaboliques, pathologiques, et physiologiques dans le corps entier ou estimer les concentrations sanguines d'un médicament.

Ainsi, ces propriétés de l'haleine laissent entrevoir une nouvelle génération de tests non intrusif.

2.1.2. Composition de l'air expiré

2.1.2.1. Principaux composés

En termes de proportion, la respiration expirée est principalement composée :

- D'Azote (N) : 78%
- D'Oxygène (O) 13%
- De Dioxyde de carbone (CO₂) : 5%
- D'Argon (Ar) : traces
- De vapeur d'eau (H₂O) : 4%
- De composés organiques volatils (COV) : présents à l'état de traces (ppmv-ppbv) (60)

2.1.2.2. Autres composés présents dans l'haleine

La respiration alvéolaire contient également des composés organiques non volatils (CONV), et des composés inorganiques non volatils (CINV), comme par exemple le dihydrogène (H₂), le NH₃, le méthane (CH₄), etc... Ainsi que d'autre gaz inertes tels que l'oxyde nitrique et le monoxyde de carbone.

Les gaz respiratoires comprennent des gaz organiques et inorganiques, telle que le :

- CO₂ et CO
- NO : catalysée par des synthèses d'oxyde nitrique, impliquées dans la vasodilatation ou la neurotransmission
- NH₃ : issus du métabolisme des protéines
- CH₄ : issus du métabolisme des hydrates de carbone de l'intestin
- H₂ : issus du métabolisme bactérien de l'intestin
- H₂S : issus du métabolisme bactérien des protéines thiols

L'air expirée contient également d'autres composés normalement non volatils, tels que le peroxyde d'hydrogène, les leucotriènes, les prostaglandines, les isoprostanes, les produits dérivés de l'oxyde nitrique et les ions hydrogène. Ces substances sont présentes sous forme de particules d'aérosol (62).

2.1.3. Facteurs influençant la composition des COV

La composition des COV dans la respiration varie considérablement d'une personne à l'autre, à la fois qualitativement et quantitativement.

De multiples facteurs sont à l'origine de cette variation : régime alimentaire, condition physique, exposition à des polluants environnementaux, style de vie, état de santé général du sujet, etc (63).

Ces interférences potentielles peuvent générer des profils tout autant variés.

Plusieurs études utilisant la GC-MS ont montré que l'âge, le genre, le mode de vie, la nutrition, les médicaments, le tabagisme et d'autres facteurs de confusion, influent sur la composition chimique de la respiration (64) et par conséquent, la sensibilité et la spécificité du diagnostic (65).

D'autres paramètres sont à prendre en compte : les taux d'excrétion des molécules dans l'haleine sont directement liés aux taux de ventilation et au débit cardiaque du sujet qui expire, par exemple, lorsque la ventilation alvéolaire augmente, cela génère un effet de dilution et donc une diminution de la concentration en isoprène en fin du souffle (88).

Les propriétés physiques et chimiques des molécules affectent également leurs taux d'excrétion (72).

2.1.3.1. Facteurs endogènes

a) Effets de l'âge et du sexe sur le profil des composés organiques volatils expirés :

Selon les résultats obtenus par une équipe de chercheurs Italiens, en 2016, après avoir pris des mesures, par nez électronique, chez 68 adultes non-fumeurs en bonne santé (66), le sexe ne semble pas affecter le profil global des composés organiques volatils expirés.

Néanmoins, cette conclusion est différente si l'on s'intéresse aux effets de l'âge. Il est bien connu que le stress oxydatif a tendance à augmenter avec l'âge chez les insectes et les mammifères ; ce phénomène biochimique est essentiel pour comprendre l'augmentation de l'exhalation des alcanes avec l'âge, étant donné qu'il constitue une source importante de COV (cf. 2.2.3 : Mécanismes de formation des COV). D'autres études confirment cet effet, avec l'augmentations significative avec l'âge des gradients alvéolaires de plusieurs alcanes C4 à C20 et alcanes monométhylés dans le souffle de sujet normaux (67).

b) Effets de la présence de comorbidités

Il a été observé que dans les états pathologiques de l'organisme de nouveaux composés supplémentaires sont produits ou leur concentration est changée ; c'est précisément cette caractéristique qui est exploité dans la recherche de l'analyse de la respiration et qui est mis en lumière dans ce travail.

Par exemple, des changements de concentration concernant l'Isoprène est assez bien documentée, et touche un certain nombre de trouble : un taux significativement plus faible d'isoprène a été trouvé dans l'air expiré de patients souffrant d'insuffisance cardiaque (68) et de cancer du poumon (69,70).

D'avantage de changement de concentration COV en relation avec des pathologie, seront détaillés plus loin.

c) Effet de l'effort physique sur le profil de COV

Un stress physique peut également influencer la composition de la respiration.

L'acétate de méthyle est un exemple de composé qui augmente en concentration pendant l'effort (71).

D'autres COV comme l'isoprène augmente rapidement pendant la charge de travail modérée suggérant que les muscles peuvent libérer des quantités substantielles de cet analyte (72), en particulier pendant l'activité physique. D'ailleurs, ce composé (numéro CAS 78-79-5) possède certainement un statut distingué, puisqu'il peut être considéré comme le prototype d'un souffle exhalé COV présentant des transitions prononcées de repos au travail (72,73). Des recherches récentes avec des patients souffrant de dystrophie musculaire démontrent que les tissus musculaires peuvent agir comme des sites extra-hépatiques responsables de la production substantielle d'isoprène (72). En dehors de l'isoprène, d'autres composés augmentent également pendant l'effort. Parmi ces composés, on trouve le méthylacétate, le diméthylsulfure et le 2-pentanone (74).

D'autre étude, comme celle de King et al., s'est basée sur la méthode d'analyse SPME-GCMS et a trouvé que la concentration de cinq composés étaient modifiée sensiblement en réponse à une séquence de charge de travail, et pour qui on observait une augmentation ou une diminution : l'isoprène, le butane, l'acétate de méthyle, le DMS et le 2-pentanone (71).

2.1.3.2. Facteurs exogènes

Bien que de nombreux résultats d'analyses respiratoires aient été publiés jusqu'à présent, l'influence des COV inspirés sur la composition de l'air expiré n'est pas encore suffisamment maîtrisée.

Cependant, il est bien démontré que la composition de la respiration exhalée est considérablement impactée par des polluants environnementaux (pollution, contaminants de l'air intérieur, tabagisme, etc...), soit par :

- Inhalation directe
- Exposition cutanée
- Consommation d'aliments, de médicaments.

En effet, l'exposition par la peau, l'inhalation ou l'ingestion par les aliments peuvent entraîner une accumulation temporaire ou prolongée de polluants en fonction de leurs propriétés hydrophiles et lipophiles (75).

a) Aliments et boissons

L'influence des aliments et des boissons sur la composition de COV a été confirmée par de nombreuses analyses respiratoires d'individus à jeun en comparaison au statut « non à jeun », au cours desquelles les gradients alvéolaires de plusieurs COV se sont révélés positifs (76).

D'autres COV comme l'acide propionique voient directement leur métabolisme influencé par le régime alimentaire (77).

De plus, les concentrations d'hydrocarbures sont influencées par la supplémentation en vitamine E et en bêta-carotène, avec une tendance à la baisse sur leur excrétion. Néanmoins, l'utilisation à long terme d'un régime riche en acides gras polyinsaturés, comme dans les régimes de nutrition parentérale, peut entraîner une augmentation de l'exhalation des hydrocarbures (78).

Le café semble être un produit important en ce qui concerne la concentration en furanes. Les infusions de café des machines de type expresso contiendraient des quantités de furane considérablement plus élevées que les autres infusions de café. Ce type de café est considéré par les experts comme ayant le meilleur arôme de café. On suppose que pour les consommateurs réguliers de café, le café est la principale source d'ingestion de furane (79).

Pour ces raisons, et c'est le cas dans le protocole de la plupart des études, un temps à jeun de plusieurs heures doit être respecté avant la collecte d'air.

b) Composés apparentés au tabac

Selon les résultats présentés par l'équipe Autrichienne de Filipiak en 2012, divers hydrocarbures insaturés sont liés à l'habitude de fumer, dont 30 composés (comprenant 19 diènes) non retrouvés dans l'air exhalé des non-fumeurs (75).

Alors que de nombreux hydrocarbures insaturés sont des constituants de la fumée de cigarette (créée principalement lors de la combustion du tabac), d'autres peuvent provenir de l'oxydation des phospholipides des membranes causée par des produits chimiques réactifs issus de la fumée de cigarette (80).

En dehors des hydrocarbures insaturés, le groupe de composés aromatiques appelé BTEX (benzène, toluène, éthyle-benzène et xylène), présente également une relation avec le tabagisme. Les fumeurs passifs sont également exposés à ces composés (81).

c) Polluants environnementaux

Divers aldéhydes sont détectables dans l'air inspiré à des niveaux sensiblement plus élevés que dans l'air expiré des non-fumeurs. C'est le cas par exemple du benzaldéhyde qui se trouve en deuxième position parmi les aldéhydes, et qui pourrait provenir de l'apport exogène lorsqu'il est rejeté dans l'environnement par les émissions provenant des processus de combustion, comme les moteurs à essence et diesel, les incinérateurs et le chauffage au bois, qui est révélé des taux dans le niveau inspiratoire supérieur au niveau expiratoire (75).

d) Médicaments

Un certain nombre de composés volatils peuvent être liés à la consommation de médicaments (74). En effet, leurs métabolisations peuvent conduire à la libération de composés volatils.

A ce titre, des évaluations pharmacocinétiques de la respiration peuvent être appliquées pour la surveillance directe de composés administrés ou permettre un suivi thérapeutique des médicaments (82). Un exemple a été décrit pour le Valproate de sodium, médicament administré chez les patients épileptiques ou les personnes souffrant d'acidémie propionique (53). Le valproate est métabolisé en 3-heptanone, détectable dans l'air expiré. Il a été observé dans cette étude que la concentration de 3-heptanone chez les volontaires sains normaux était inférieure à 1 ppb, ainsi toute trace de 3-heptanone dans la respiration exhalée peut être attribuée raisonnablement à l'administration de valproate métabolisé.

L'utilisation de l'analyse des gaz respiratoires expirés pour des études d'exposition pharmacocinétique et environnementale a jusqu'ici fait l'objet d'une attention limitée malgré son énorme potentiel.

Les analyses diagnostiques de l'haleine doivent être considérées avec précaution des taux élevés de certains composés tels que les hydrocarbures et en particulier les aldéhydes dont leur exhalaison peut révéler un lien avec le tabac ou l'exposition aux polluants atmosphériques plutôt qu'à un cancer du poumon. De même, la présence de certains COV tels que les furannes pourraient résulter d'une alimentation spécifique et non d'une infection pulmonaire bactérienne ou d'un dysfonctionnement hépatique. Par conséquent, lors de l'analyse de l'haleine à des fins médicales, il est essentiel d'être informé de l'histoire immédiate du sujet, y compris les médicaments, le régime alimentaire, ainsi que l'environnement de résidence.

2.1.4. Les approches « omiques » en lien avec l'analyse de la respiration

La nécessité d'étudier de nouvelles méthodes de détection précoce du cancer a conduit la recherche à mettre en application la mesure globale d'un ensemble de constituants biologiques : gène (génomique), ARN (transcriptomique), protéines (protéomique), métabolites (métabolomique), composés volatils (volatilomique), etc.

Parmi l'ensemble de ces analyses, regroupées sous le terme de « omiques », les deux dernières disciplines, le métabolome et le volatilome, nous intéressent tout particulièrement dans cette synthèse.

Ces approches tendent vers une médecine personnalisée en déterminant des profils d'expression pour une pathologie donnée (Figure 6).

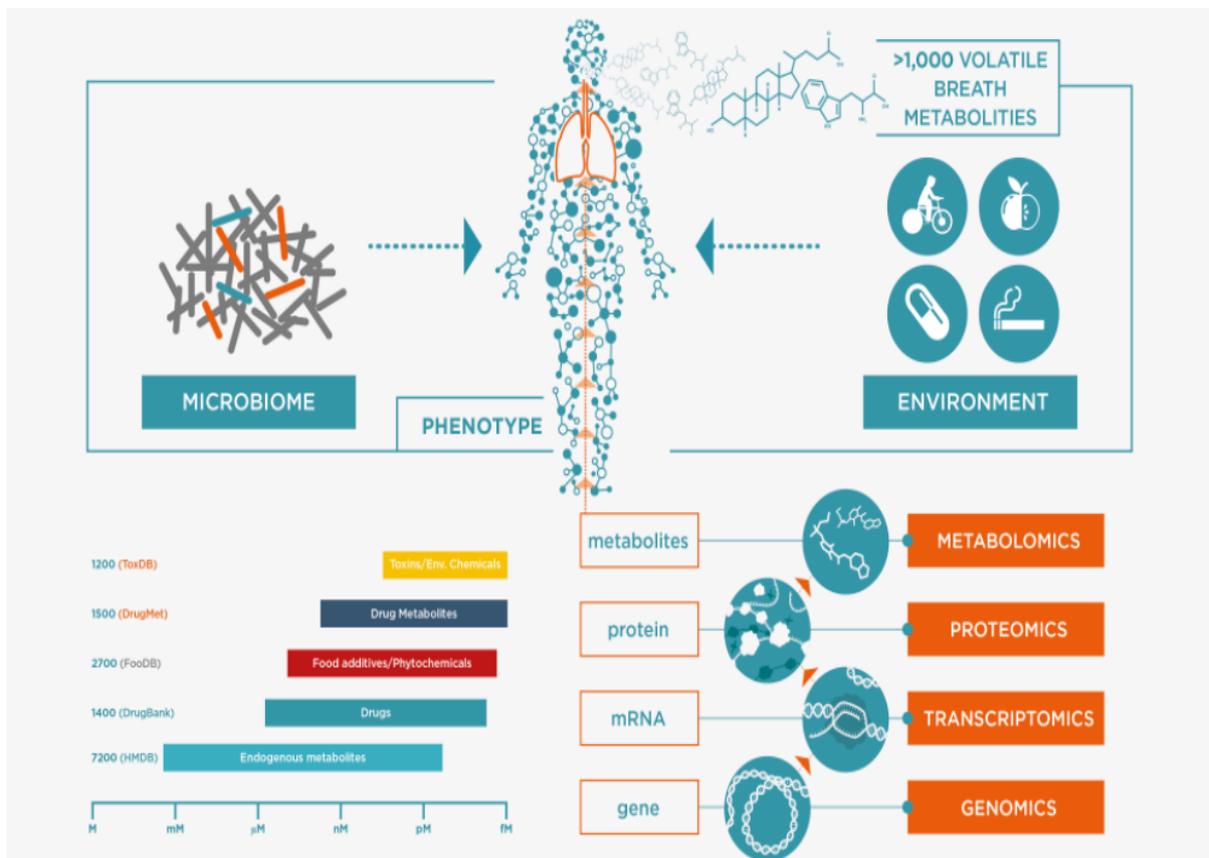


Figure 6 : les approches « omiques » au service de l'analyse du souffle (83)

2.1.4.1. *Notion de métabolome*

La métabolomique est définie comme l'étude des métabolites.

Selon une définition simple et largement utilisée, un métabolite est une petite molécule de bas poids moléculaire, impliquée dans le métabolisme soit en tant que produit du métabolisme ou nécessaire pour le métabolisme.

Cependant, les données de métabolites ne permettent pas à elles seules une compréhension du métabolisme. En effet, pour donner un sens à ces données, les métabolites doivent d'abord être compris dans le contexte de leurs voies biochimiques.

La compréhension des voies biochimiques qui composent le métabolisme humain représente l'une des réalisations majeures de la recherche au cours du siècle dernier. Les enzymes, cofacteurs, substrats, produits et intermédiaires à travers la multitude de voies moléculaires sont quasiment complètement compris (84).

L'étude du métabolome peut avoir deux orientations :

- Détermination de profil métabolique : concerne l'étude d'un groupe de métabolites spécifiques à une voie métabolique ; cette approche quantitative est développée pour une voie ou une classe de composés. Elle fournit des informations indépendamment des interactions physiologiques connues, pouvant être collectées dans une base de données.
- Détermination d'empreintes métaboliques : caractérisation de profils métaboliques variant en réponse à la maladie. Dans cette approche, l'intention n'est pas d'identifier chaque composé observé, mais de comparer des modèles ou un ensemble de métabolites qui changent en réponse à l'exposition d'une maladie. Cette comparaison d'« empreintes métaboliques » est réalisée à l'aide d'outils statistiques.

La combinaison du profilage quantitative du métabolisme et des « empreintes métaboliques » conduira à la globalité de la métabolomique.

Le métabolome varie selon le contexte physiologique ou pathologique de la cellule, du tissu, de l'organe ou de l'organisme.

Ainsi le métabolisme individuel est finalement un aperçu de l'état génétique, nutritionnel, pharmacologique et environnemental de l'individu en question. Autrement dit, les changements dans le métabolome sont l'ultime réponse d'un organisme à des altérations génétiques, des maladies ou des influences environnementales (85).

Pour preuve, plutôt que des carences nutritionnelles, les principaux problèmes de santé des pays riches sont la conséquence d'un métabolisme perturbé. Les analyses métaboliques des tumeurs ont montré que la progression de la tumeur entraîne souvent un « recâblage » métabolique de la cellule (*par exemple, l'effet Warburg*), qui résulte d'altérations des gènes du cancer ou des enzymes métaboliques elles-mêmes (86).

Par conséquent, la métabolomique contribue à la compréhension biologique tant sur le plan mécanistique, que sur le plan prédictif des pathologies, et pourrait ainsi atteindre la pratique clinique pour aider à améliorer la santé humaine.

L'avantage de la métabolomique est que les métabolites se situent en aval de la transcription et de la traduction, à l'extrémité de la cascade « omique » et peuvent donc être les plus prédictifs du phénotype (87).

Le métabolome est considéré par les scientifiques comme le point finale de la cascade des sciences « omiques » (85).

Comme pour toute discipline « omique », la métabolomique dépend fortement de la disponibilité et de la qualité des bases de données électroniques. C'est pourquoi, en 2007, une nouvelle base de données du métabolome humain a été créée : The Human Metabolome Database (HMD), dont la dernière version publiée en 2009 relève plus de 6800 métabolites entièrement annotées (88).

La mise en œuvre réussie de la métabolomique nécessite une instrumentation analytique qui offre un débit, une résolution, une reproductibilité et une sensibilité élevés. Seul un ensemble de plates-formes analytiques différentes fournira actuellement une couverture maximale du métabolome. Néanmoins, en raison de la diversité et de la variabilité des propriétés physiques des métabolites aucun procédé unique pour leur détection n'est encore défini. À ce jour, les études de type métabolomiques utilisent principalement la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou spectrométrie de masse couplée à une chromatographie (GC-SM).

Bien que la métabolomique soit encore dans un stade précoce de son évolution, nous pouvons nous attendre à voir de nouveaux développements dans ce domaine dans un avenir proche.

C'est le cas de l'application de la métabolomique à des échantillons biologiques, tel que l'air expiré, a été un élément clé de la recherche de diagnostic rapide et de médecine personnalisée. Cet exemple d'évolution est à l'origine du développement de la volatolomique. En effet, comme le processus d'échantillonnage utilisé pour recueillir l'air expiré est non intrusif et relativement peu coûteux et qu'il utilise une série de méthodes largement acceptées, l'analyse métabolomique de la respiration est un domaine en croissance rapide et a montré son potentiel pour détecter et diagnostiquer les premiers stades de nombreuses maladies et infections dans les études précliniques (89).

2.1.4.2. *Notion de volatilome*

En 1971, Linus Pauling rapporte une découverte inattendue grâce à l'utilisation d'une nouvelle technique de microanalyse de la respiration, la chromatographie en phase gazeuse, qui lui a permis de révéler que les humains expirent un grand nombre de composés organiques volatils (COV) en faibles concentrations (1).

Depuis cette découverte, des COV ont ensuite été observés dans le métabolisme animal, végétal et bactériologique.

a) Définition

Le volatilome d'un individu comprend l'ensemble des métabolites volatils, sous forme de composés organiques volatils (COV) ou inorganiques volatils, provenant de ce même organisme (90).

C'est pourquoi, il est tout à fait légitime de considérer les COV comme la partie volatile du métabolome, et par extension, considérer le volatilome comme un sous-ensemble du métabolome.

Néanmoins, le volatilome contient également des composés exogènes qui ne proviennent pas de processus métaboliques (p. ex. contaminants environnementaux) ; par conséquent, le volatilome peut aussi être considéré comme une entité distincte du métabolome.

En effet, les humains émettent des centaines de COV associés à leur propre processus métabolique, mais aussi d'autres COV formés dans le corps humain par le biais du métabolisme des aliments, des boissons, des médicaments ou par l'exposition aux COV environnementaux.

Les composés organiques volatils (COV) offrent un aperçu unique des processus biochimiques en cours chez les humains sains et malades. Pourtant, leur utilisation diagnostique est freinée faute de compréhension de leur origine biochimique ou cellulaire et leur lien souvent mal défini avec les maladies sous-jacentes. C'est ce que la recherche du volatilome tente d'éclaircir.

Cependant, les nombreuses tentatives d'identification des composés du volatilome ces dernières décennies illustrent la complexité du volatilome humain.

b) Volatilome humain

Les COV humains apparaissent aussi bien dans l'haleine expirée, qu'à travers la peau, l'urine, la salive, le lait maternel humain, le sang et les selles (Figure 7).

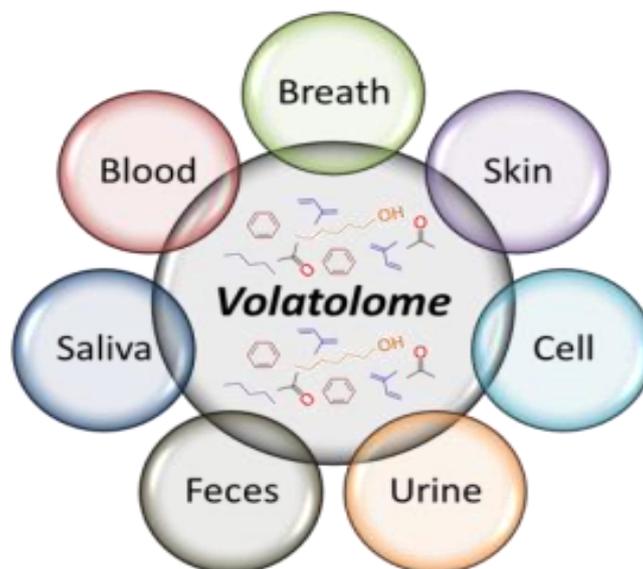


Figure 7A : Sources du volatilome dans l'organisme humain

Les premières études ont révélé des différences quantitatives et qualitatives importantes entre de petits groupes de sujets sains : les concentrations de COV dans les haleines variaient considérablement et un certain nombre de COV étaient détectables dans la respiration de certains sujets mais pas dans d'autres.

En effet, il existe de larges variations inter-individuelles, sur le plan quantitatif et qualitatif, des composés organiques volatils (COV) présents dans la respiration.

Dans une étude américaine datant de 1999, dans laquelle des échantillons d'haleine dans une population typique ont été étudiés, il a été observé environ 3000 COV différents au total, la plupart du temps à de faibles concentrations allant de pptv à ppbv (91). Cette étude, menée par un des pionniers dans la recherche sur la respiration, le docteur Phillips Michael, a confirmé les larges variations interindividuelles et la présence d'un « noyau commun » de COV respiratoires chez tous les sujets.

Les résultats de cette étude concordent avec les rapports précédents selon lesquels les humains en bonne santé diffèrent largement les uns des autres dans la composition de leurs COV respiratoires, à la fois qualitativement et quantitativement.

Cette étude a permis de mettre en avant deux points de similitude entre les individus qui n'ont pas été rapportés précédemment :

- Le nombre total de COV respiratoires varie dans une fourchette assez étroite d'un individu à l'autre : un échantillon d'haleine présentait une moyenne de 200 COV (écart-type = 19,8, intervalle 157-241), pour un total de 3481 COV différents observés ;
- La présence d'un « noyau commun » de 27 COV chez les cinquante sujets examinés a été observé et ce malgré le grand nombre total de COV.

Néanmoins, il est important de souligner que cette étude portait sur seulement 50 sujets (92).

Ainsi une grande partie du spectre des COV varie selon les individus, alors que peu de COV partagent un état de santé commun dans une population donnée.

Plus récemment, en 2014, et pour la première fois, une équipe de chercheurs Anglais a proposé une compilation de tous les COV analysés à travers la littérature scientifique, avec la volonté de générer les prémisses d'une base de données du volatilome (74). Dans cette étude un total de 1840 composés a été identifié comme volatils, chez des sujets en bonne santé, et listé selon leur provenance dans l'organisme. L'observation de ces listes montre de manière inattendue que peu de composés sont omniprésents dans toutes les sources de COV. L'ensemble des fluides corporels et la respiration partagent seulement 12 composés en commun, soit 0.7% des COV signalés :

- | | | |
|-------------------------|--------------|------------|
| - Acétaldéhyde | - 2-butanone | - Pentanol |
| - 2-propanone (Acétone) | - Hexanal | - Benzène |
| - Benzaldéhyde | - Heptanal | - Styrène |
| - 1-butanol | - Octanal | - Toluène |

Des données quantitatives pour chacune des différentes sources seront détaillées plus loin et s'appuient essentiellement cette base de données établit par l'équipe de chercheur encadrée par B de Lacy Costello. Les composés rapportés ont reçu des numéros d'enregistrement CAS et ont été nommés selon une convention commune. Puis ils ont ensuite été regroupés en fonction de leur classe chimique, sous forme de tableaux, permettant ainsi une comparaison facile.

La figure ci-dessous repartie selon les classes chimiques de composés et leurs nombres relatifs retrouvés pour chacune des sources.

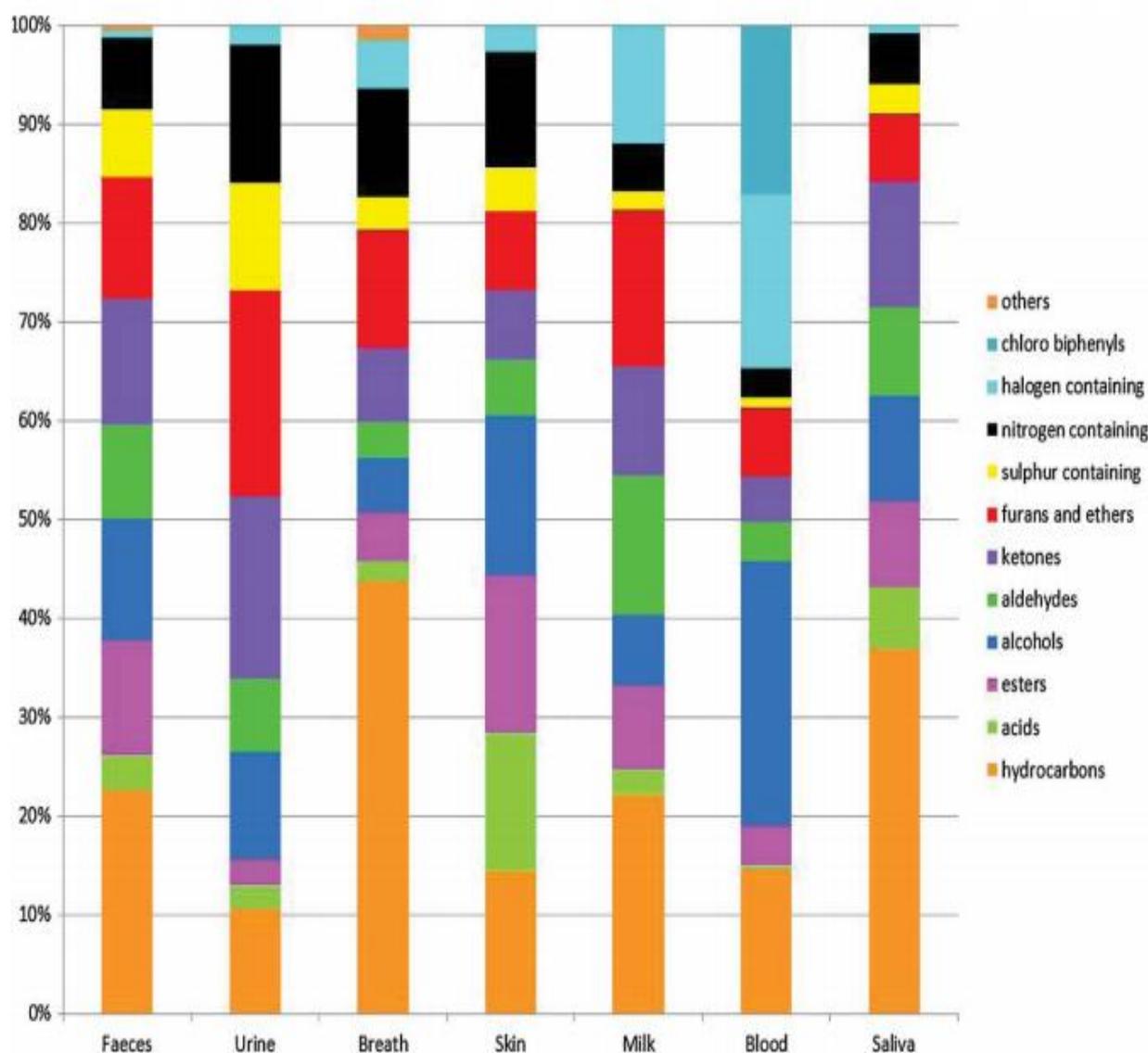


Figure 7B : Sources du volatilome : nombres relatifs de composés classés par famille chimique répartis détectées dans les selles, l'urine, la respiration, les sécrétions de la peau, le lait, le sang et la salive (Sur la base de différents composés identifiés, non pas sur leurs concentrations relatives.) d'après B de Lacy Costello (74).

i. Composés organiques volatils dans le Souffle

Parmi les nombreuses publications sur l'analyse de la respiration, parues dans la littérature scientifique, l'étude de Costello a listé 872 COV attribués à la respiration. Pour beaucoup de ces composés, on ne sait pas s'ils sont produits de manière endogène.

Les composés volatils endogènes les plus importants sont l'isoprène et l'acétone. L'isoprène est un sous-produit de la voie du mévalonate. L'acétone peut être formée à partir d'acétoacétate par l'acétoacétate-décarboxylase. Dans les mesures pendant le sommeil, l'isoprène et l'acétone présentent des caractéristiques de concentration très différentes. Les deux montrent des concentrations croissantes pendant la nuit. La concentration en isoprène présente une structure en pic très prononcée, qui est due aux mouvements du corps ou aux changements du stade du sommeil. L'acétone ne montre pas une telle structure de pic mais juste une augmentation régulière.

D'autres composés retrouvés dans la respiration expirée ont vraisemblablement une origine exogène, comme le tabagisme. Ainsi, les fumeurs présentent des concentrations plus élevées pour : 29 diènes, 27 alcènes et 3 alcynes (75). D'autres exemples de COV mentionnés comme étant liés au tabagisme sont l'acétonitrile, divers furanes et de nombreux diènes spécifiques, tels que le 1,3-cyclohexadiène, le 1,3-pentadiène, le 1,4-pentadiène ou le 1,4-hexadiène (75).

Les composés volatils retrouvés dans la respiration peuvent également être liés à la consommation alimentaire ou aux médicaments (93) [53], produits par des bactéries dans l'intestin, comme l'hydrogène H₂ (94).

ii. Composés organiques volatils dans le sang

L'analyse des COV dans le sang est un domaine de recherche actif car il peut refléter directement l'environnement interne du corps, comprenant l'état nutritionnel, métabolique et immunitaire. Les nombres de substances volatiles identifiées dans le sang sont relativement peu nombreux comparés à ceux identifiés dans l'haleine. L'étude de Costello a répertorié 154 COV dérivés du sang.

Toutefois, cette matrice est moins bien supportée par les patients par rapport à la production d'un échantillon d'urine ou de souffle, ajouté à cela le coût et le temps de prétraitement d'un prélèvement sanguin, généralement élevé. Ces points pourraient expliquer le manque d'études

rapportant l'analyse des composés volatils dans le sang ou comparant des profils volatils chez des volontaires sains par rapport à un groupe malade. Il s'agit plutôt d'études basées sur la surveillance de l'exposition aux polluants environnementaux (95) ou la quantification de l'alcool dans le sang ou d'autres inhalant dérivés des solvants (96).

L'analyse de l'alcoolémie est l'analyse des gaz sanguins la plus courante en raison de la consommation importante d'alcool aux États-Unis et en Europe, et implique généralement la mesure du méthanol, de l'éthanol, de l'alcool isopropylique, du 1-propanol, de l'acétaldéhyde et de l'acétone. De nombreux laboratoires médico-légaux s'intéressent également à la mesure et à la quantification d'un nombre élevé de COV à travers le sang, pouvant être dérivés de l'inhalation et de l'ingestion de substances volatiles dangereuses telles que l'éther diéthylique, le butane, l'acétate d'éthyle, l'hexane, le toluène, le xylène et certains hydrocarbures halogénés COV couramment utilisé en mésusage (renfilage) (97).

Point intéressant pour notre recherche, Horvath et al. ont décrit les résultats d'une étude où des chiens entraînés pouvaient faire la distinction entre des échantillons sanguins de patients atteints de cancer de l'ovaire et des échantillons de sang prélevés sur des patients atteints d'autres cancers gynécologiques ou de sujets témoins sains (98).

Par ailleurs, la mesure de l'ammoniac dans le sang est également un test clinique bien établi (99). Des niveaux élevés d'ammoniac dans le sang sont considérés comme un indicateur important d'une anomalie de l'homéostasie liée à l'azote, la raison la plus fréquente étant liée à un dysfonctionnement hépatique. L'hyperammoniémie résulte d'une production excessive de bactéries coliques et de l'intestin grêle. À des niveaux élevés, l'ammoniac est une toxine puissante du système nerveux central et a été associée à l'encéphalopathie hépatique (HE).

iii. Composés organiques volatils provenant des sécrétions cutanées

L'étude de Penne et al, publiée en 2007 (100), indique que les individus ont leur propre parfum distinctif, analogue à une empreinte digitale. Bien que l'odeur d'un individu puisse changer en raison de divers facteurs, tels que le cycle menstruel, l'état émotionnel, la santé, chaque individu peut conserver son propre parfum. De même, les mères peuvent reconnaître leurs nouveau-nés par des signaux olfactifs après quelques heures de contact et les bébés apprennent rapidement à reconnaître le parfum de leur mère. La recherche de COV issus de la peau,

s'intéresse également aux odeurs para-axillaires et de l'aréole pour élucider les interactions chimiques dans la reconnaissance mère-nourrisson (101).

En sachant que l'odeur particulière d'un individu peut être distinguée à la fois par les personnes et par les chiens, ces derniers sont capables de distinguer des jumeaux homozygotes par leur odeur corporelle (102), on s'attend à ce que le nombre de composés différents identifiés à partir des sécrétions cutanées humaines soit très important. L'étude documentaire de Costello and al a révélé 532 composés volatils issus de la peau.

Néanmoins, la peau n'est pas homogène et on peut s'attendre à ce que la distribution des différents types de glandes et de la flore bactérienne à travers le corps conduise à des profils de COV différents. De la même manière, les odeurs d'un seul individu varient avec le régime alimentaire, l'état émotionnel, le cycle menstruel, l'âge et bien d'autres facteurs (103,104).

Les études sur les sécrétions de la peau sont particulièrement sensibles aux interférences telles que les produits de soin. Bien que des précautions soient prises lors des procédures expérimentales pour minimiser la présence de composés exogènes, comme l'interdiction d'utiliser des cosmétiques pendant un certain temps avant le test, certains composés identifiés sont hautement susceptibles de provenir de sources exogènes.

iv. Composés organiques volatils de la salive

L'analyse des COV dans la salive est assez limitée. L'étude Costello et al a rapporté 359 COV depuis la littérature scientifique (74).

L'enquête la plus complète sur les COV issus de la salive a été réalisée à récemment par al Kateb et al (105). Ils ont rapporté dans une revue, une base de données de composés volatils, identifiés par la méthode GC-MS. Il s'agissait d'une enquête longitudinale dans laquelle l'espace de tête d'échantillons salivaire de dix personnes ont été évalués sur une période de dix jours. Ils ont signalé la présence de 317 composés, dont 41 % d'hydrocarbures, 13 % de cétones et de lactones, 10% d'aldéhydes, tandis que les aromatiques et les alcools représentaient tous deux 8%.

Certaines études signalent la présence de composés volatils de la salive attribués à diverses sources extérieures : air, eau potable, régime alimentaire et préparations cosmétiques (106). Alagendran et ses collaborateurs ont également étudié les COV salivaires pendant le cycle

menstruel (107), et ont trouvé 15 composés associés à l'ovulation et aux cycles menstruels des volontaires ; ces substances volatiles comprennent les acides, les aldéhydes, les amines et les alcools.

v. Composés organiques dans les Urines

Les substances volatiles dans l'urine couvrent une large gamme de classes chimiques, tels que les acides, alcools, cétones, aldéhydes, amines, N-hétérocycles, O-hétérocycles, composés soufrés et hydrocarbures, ainsi que quelques esters. Un grand nombre de terpènes sont décrits et ont été considérés comme dérivés d'aliments (108).

La recherche documentaire de l'équipe de Costello a répertorié 279 COV. Parmi toutes les publications à ce sujet, neuf composés étaient communs à toutes les études : propanone, 2-butanone, 2-pentanone, 2-heptanone, 3-hexanone, 4-heptanone, 2,5-diméthylfurane, 2-éthyl-5-méthyl uréthane, toluène et ainsi considéré comme présent avec un très haut degré de certitude. L'intestin peut être une source de quelques-uns de ces composés. Le grand nombre de cétones dans l'urine découle, au moins en partie, de l'action de décarboxylation des acides des bactéries dans l'intestin (108). Les bactéries intestinales sont également susceptibles d'être impliquées dans la production de méthylamine (probablement à partir de la créatinine) car les rats sans bactéries intestinales produisent moins de la moitié de la production(109).

vi. Composés organiques dans les fèces

L'étude de Costello a listé 381 COV dans les selles.

Le premier rapport d'analyse de gaz provenant de fèces date de 1861, lorsque Ruge a rapporté que le gaz rectal humain contenait de l'hydrogène, du dioxyde de carbone et du méthane, en plus d'autres gaz non identifiés (74).

En effet, les gaz provenant de l'intestin est un mélange d'hydrogène (0-50 %), d'azote (5 - 90%), d'oxygène (0- 10 %), du dioxyde de carbone (10 à 30 %) et le méthane (0-10%). La production de méthane est corrélée avec les bactéries méthanogènes.

Des concentrations significatives d'une gamme, d'acides gras à chaîne courte (AGCC), d'indoles et de phénols ont également été observées dans les fèces.

La fermentation des hydrates de carbone dans l'intestin, en particulier par les bactéries, produit des acides éthanoïque, propionique, butanoïque, pentanoïque et hexanoïque.

Des études *in vitro* ont démontré que les aliments protéiniques produisent également des AGCC par l'action de bactéries telles que *Clostridium*. Les substances volatiles telles que le méthanthiol et l'ammoniac sont considérées comme pouvant être dérivées de la méthionine par l'action de cette même bactérie telle.

Les deux études les plus récentes indiquent que 297 et 135 COV différents ont été identifiés respectivement par Garner et al (110) et De Preter et al (111) dans l'espace libre des fèces d'individus apparemment en bonne santé.

Les alcools étaient classiquement considérés comme rares dans les fèces adultes, mais on sait maintenant qu'au moins 52 alcools différents peuvent être présents. Il est probable que les bactéries intestinales peuvent réduire les acides en alcools.

De plus, les champignons, bien connus pour être des organismes commensaux de l'intestin, seraient à l'origine de la production de furanes, possiblement via le métabolisme du fructose.

Des composés tels que diméthylbenzènes, l'éthylbenzène, et du toluène (constituants d'essence) proviennent probablement de la pollution de l'air.

Les aldéhydes éthanal, propanal, butanal et hexanal, ont été rapportés dans les selles d'un grand nombre d'individus (16). Éthanal est particulièrement intéressante en raison de son abondance et du fait qu'il soit considéré comme favorisant de la mutagenèse, notamment en association avec le cancer de l'intestin.

L'acétone et le butan-2-one ont été rapportés dans 100% des échantillons fécaux d'une étude de cohorte longitudinale (110), qui proviennent probablement du métabolisme des acides gras et des glucides. De nombreux hydrocarbures ont également été découverts dans les fèces, bien que les espèces à chaîne plus longue aient été trouvées en petit nombre (110). L'isoprène, considéré comme l'hydrocarbure le plus commun dans le corps humain, a également été extrait des fèces.

De nombreux composés éthers ont été isolés de l'espace libre des fèces : le 2-éthoxyéthanol, retrouvé fréquemment dans les produits manufacturés tels que les savons et les produits cosmétiques et le 1, 3- diméthoxybenzène, utilisé comme additif alimentaire (110). De même, il est très peu probable que les composés chlorés retrouvés dans les fèces soient d'origine

biologique. La consommation de nourriture contaminée ou d'eau est la source probable de ces composés. Le chloroforme peut se présenter comme un composant de COV provenant de plusieurs sources, il est un contaminant de l'air et a été détecté dans les aliments. La chloration pour la désinfection de l'eau potable est une autre source de production de chloroforme et de méthanes halogénés.

L'ammoniac fécal résulte de l'activité des microorganismes.

Une gamme variée de composés soufrés a été identifiée. Par exemple, le méthane-thiol et le diméthylsulfure ont été couramment observés dans cette matrice ; le premier est, au moins en partie, considéré comme produit à partir de la méthionine par *Clostridium*. Le méthane-thiol a une toxicité approchant le cyanure et les facteurs contrôlant sa concentration et sa biosynthèse pourraient justifier une étude plus poussée. Le méthane-thiol et le sulfure de diméthyle peuvent également être produits par méthylation du sulfure d'hydrogène en tant que mécanisme de détoxification par le thiol S-méthyltransférase.

vii. Composés volatils présent dans le lait maternel

L'étude de Costello a classé 256 COV provenant du lait maternel. La liste la plus complète des substances volatiles probables a été fournie par Pellizari *et al.*, Qui ont identifié 156 composés (112). Il existe de nombreux articles sur sa composition nutritionnelle, mais peu d'entre eux sont relatifs à ses composants volatils spécifiques. En effet, la plupart des études analytiques visent généralement à identifier la présence d'un polluant spécifique, d'une substance médicinale ou d'un groupe de composés environnementaux, afin de déterminer l'exposition chimique du nourrisson. La recherche documentaire de l'équipe de Costello, a révélé que de nombreux articles portés sur les pesticides organochlorés, les diphenyléthers bromés, les dioxines, les polychlorobiphényles, les parabènes, les triclos, les parfums de musc polycycliques, les flavonoïdes et bien d'autres. Cependant, tous ces composés ne peuvent être considérés comme volatils aux températures corporelles. Une étude plus vaste, utilisant la méthode SPME, a tenté de quantifier 36 différents COV (113) et Buettner (114) a analysé les substances volatiles du lait maternel qui lui a permis d'identifier 45 constituants olfactifs.

La connaissance du volatilome corps humain sain dans sa globalité et des informations quantitatives certifiées pour chaque fluide corporel, permettrait de me mieux appréhender

l'analyse de la respiration. Les études rapportées ont montré des similitudes en fonction de la source, néanmoins, des différences sont observées selon l'âge, l'alimentation, le sexe, la taille, la graisse corporelle, la flore intestinale, les métabolismes des individus.

L'une des utilisations de ce type de base de données, serait d'aider dans le choix d'un liquide corporel à collecter pour évaluer un composé ou des composés particuliers. Elle peut également être utilisée pour aider à l'identification de l'origine d'un COV qui pourrait être de valeur médicale.

En résumé, plus de travail est nécessaire pour définir une gamme de normalité des COV humains, ainsi que des plages de concentration dans les fluides corporels et la respiration. Ces données pourraient ensuite être utilisées dans le dépistage de masse des populations.

c) Volatilome environnemental

Plusieurs milliers de substances commercialisées répondent à la définition de COV. Parmi celles-ci, plusieurs centaines sont largement utilisées, dans l'industrie notamment, et sont susceptibles d'être retrouvées dans les différents milieux (air, eau, sol).

Ainsi, plus de 400 COV sont identifiables dans l'air (PPA, 2006).

Parmi les principaux COV étudiés, on retrouve le benzène, le toluène, les isomères du xylène (m-xylène, o-xylène, p-xylène), l'éthylbenzène, le formaldéhyde, etc. (Tableau 10).

Tableau 10 : Concentration ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) d'une sélection de COV dans l'air ambiant, et l'air expiré, chez deux groupes de sujet : fumeur et non-fumeur. Nd = non détecté

Compound	No smoking		Tobacco cigarette smoking	
	Indoor air	Exhaled breath	Smoke	Exhaled breath
Pent-1-ene	0.5	0.6	700	68
n-Pentane	nd	nd	1200	63
Pent-2-ene	nd	0.5	625	52
Isoprene	0.4	87	2700	670
Pent-2-ene	nd	0.3	460	32
n-Hexane	1	nd	975	14
Benzene	0.6	4	1100	49
Isooctane	0.4	0.2	nd	nd
n-Heptane	0.2	0.4	890	26
Toluene	5	11	1400	60
n-Octane	nd	0.2	560	3
Ethylbenzene	0.2	0.6	660	6
m-Xylene	0.2	0.5	980	7
p-Xylene	0.1	0.2	420	2
o-Xylene	0.1	0.2	590	2
Naphthalene	0.05	0.1	240	3
Nicotine	nd	nd	1300	7

2.2. ASPECT BIOCHIMIQUES ET PROPRIETES DES COMPOSES ORGANIQUES VOLATILS

2.2.1. Définition

La définition d'un COV repose à la fois sur des critères chimiques et physiques. Il existe donc des hétérogénéités, voire des ambiguïtés, dans les définitions couramment utilisées. Ces hétérogénéités s'expliquent en partie par ces différents critères qui peuvent être utilisés pour déterminer si un composé organique est volatil, notamment sa pression de vapeur saturante ou sa température d'ébullition.

La température d'ébullition d'un composé correspond à la température à laquelle le changement d'état liquide-gaz a lieu. Aux températures supérieures à cette température d'ébullition, le composé n'est plus que sous sa forme gazeuse.

Plus la température d'ébullition d'un composé est faible, plus ce composé possède ce caractère volatil.

La pression de vapeur saturante correspond, quant à elle, à la pression de la phase gazeuse du composé se trouvant en équilibre au-dessus de sa phase liquide, à une température donnée.

Plus la pression de vapeur saturante d'un composé est élevée, plus le composé est volatil. Il est donc possible de raisonner à partir de l'un ou l'autre des critères pour aboutir à une définition des COV.

2.2.1.1. Critères chimiques

Les COV sont avant tout des composés organiques, c'est-à-dire des composés contenant au moins l'élément carbone et un ou plusieurs autres éléments tels que l'hydrogène, l'oxygène, l'azote, les halogènes (fluor, chlore, brome, iode), le soufre, le phosphore, le silicium, etc.

Ce sont plutôt de petites molécules, sous forme de gaz ou de liquide à température ambiante.

Au vu de ces critères chimiques, toutes les familles chimiques sont susceptibles d'être concernées.

Les COV appartiennent donc à des familles chimiques très diverses telles que :

- Des hydrocarbures : alcanes, alcènes, alcynes, hydrocarbures aromatiques,
- Des alcools
- Des aldéhydes
- Des acides carboxyliques
- Des cétones
- Des esters
- Des dérivés chlorés, nitrés, aminés, etc.

2.2.1.2. Critères physiques

Les COV se caractérisent par leur grande volatilité ; autrement dit, dans les conditions normales de pression et de température, ils passent très facilement de l'état liquide à l'état gazeux.

Une définition précise, et souvent reprise, est celle de la directive européenne n° 1999/13/CE (115), qui repose sur la pression de vapeur saturante.

Cette directive définit un composé organique volatil comme « un composé organique ayant une pression de vapeur de 0,01 kPa ou plus à une température de 293,15 K (c'est-à-dire 20 °C) ou ayant une volatilité correspondante dans les conditions d'utilisation particulières ».

Plus la pression de vapeur est élevée, plus une excrétion de ces composés est possible au travers de la respiration, l'urine ou la peau.

Une autre façon de définir les COV est celle du décret n° 2006-623 (116) basée sur la température d'ébullition.

D'après ce décret, les COV regroupent tous les composés organiques dont le point d'ébullition, mesuré à la pression standard de 101,3 kPa, est inférieur ou égal à 250 °C. De même, la norme NF ISO 16000-6 définit les COV selon leur température d'ébullition et distingue, d'après la classification adoptée par l'OMS en 1989, les composés organiques très volatils, volatils et semi-volatils (OQAI, 2001) (Tableau 11).

Tableau 11. Classification des COV selon leur température d'ébullition

VOLATILITE	TEMPERATURE D'EBULLITION
Très volatils	< [50 - 100 °C]
Volatils	[50 - 100 °C] à [240 - 260 °C]
Semi-volatils	[240 - 260 °C] à [380 - 400 °C]

2.2.2. Propriétés

D'après les définitions des COV, un très grand nombre de composés organiques peuvent être considérés comme volatils.

Les COV peuvent être inodores ou avoir une odeur plus ou moins caractéristique (Tableau 12).

Parmi les plus odorants, on retrouve les amines, les composés soufrés, les dérivés oxygénés (aldéhydes, cétones) et quelques composés aromatiques. En outre, leur volatilité leur confère l'aptitude à se propager plus ou moins loin de leur lieu d'émission.

Tableau 12 Propriétés de quelques COV. Source : fiches toxicologiques de l'INERIS et de l'INRS

Famille chimique	Nom usuel	Nom IUPAC *	N° CAS **	Formule brute	Pression de vapeur saturante (Pa à 20°C)	Apparence
Alcanes	éthane	éthane	74-84-0	C ₂ H ₆	3,85.10 ⁶	Gaz incolore, inodore
	n-hexane	n-hexane	110-54-3	C ₆ H ₁₄	1,6.10 ⁴	Liquide incolore, odeur caractéristique
Alcènes	éthylène	éthène	74-85-1	C ₂ H ₄	8,1.10 ⁶	Gaz incolore, odeur caractéristique
	propylène	propène	115-07-1	C ₃ H ₆	1,16.10 ⁶	Gaz incolore
	1,3-butadiène	1,3-butadiène	106-99-0	C ₄ H ₆		Gaz incolore
Alcyne	acétylène	éthyne	74-86-2	C ₂ H ₂	4,5.10 ⁶	Gaz incolore, inodore
Alcools	méthanol	méthanol	67-56-1	CH ₄ O	1,23.10 ⁴	Liquide incolore, odeur agréable
	éthylène glycol	éthane-1,2-diol	107-21-1	C ₂ H ₆ O ₂	7	Liquide incolore
	propylène glycol	propane-1,2-diol	57-55-6	C ₃ H ₈ O ₂	10,6	Liquide incolore, inodore
Dérivés aminés	éthylamine	éthylamine	75-04-7	C ₂ H ₇ N	1,17.10 ⁵	Gaz incolore, forte odeur
Dérivés nitrés	2-nitropropane	2-nitropropane	79-46-9	C ₃ H ₇ NO ₂	1,73.10 ³	Liquide incolore, odeur agréable
Hydrocarbures halogénés	dichlorométhane	dichlorométhane	75-09-2	CH ₂ Cl ₂	4,65.10 ⁴	Liquide incolore, odeur éthérée
	trichlorométhane	trichlorométhane	67-66-3	CHCl ₃	2,13.10 ⁴	Liquide incolore, odeur éthérée
	trichloroéthylène	trichloroéthylène	79-01-6	C ₂ HCl ₃	8,6.10 ³	Liquide incolore, odeur douce
	tétrachloroéthylène	tétrachloroéthylène	127-18-4	C ₂ Cl ₄	1,9.10 ³	Liquide incolore, odeur caractéristique
Hydrocarbures aromatiques	benzène	benzène	71-43-2	C ₆ H ₆	9,97.10 ³	Liquide incolore, odeur aromatique
	toluène	méthylbenzène	108-88-3	C ₇ H ₈	3,8.10 ³	Liquide incolore, odeur caractéristique
	o- xylène	1,2-diméthylbenzène	95-47-6	C ₈ H ₁₀	663	Liquide incolore, odeur caractéristique
	éthylbenzène	éthylbenzène	100-41-4	C ₈ H ₁₀	900	Liquide incolore, odeur aromatique
Aldéhydes	formaldéhyde	méthanal	50-00-0	CH ₂ O	4,4.10 ⁵	Gaz incolore, odeur piquante
	acétaldéhyde	éthanal	75-07-0	C ₂ H ₄ O	1,01.10 ⁵	Liquide incolore, odeur fruitée
Cétones	acétone	2-propanone	67-64-1	C ₃ H ₆ O	2,4.10 ⁴	Liquide incolore, odeur suave
Ethers	éther éthylique	éther diéthylique	60-29-7	C ₄ H ₁₀ O	5,89.10 ⁴	Liquide incolore, odeur sucrée piquante
	éthylène glycol n-butyl éther (EGBE)	2-butoxyéthanol	111-76-2	C ₆ H ₁₄ O ₂	100	Liquide incolore, odeur éthérée
Esters	acétate de méthyle	éthanoate de méthyle	79-20-9	C ₃ H ₆ O ₂	2,17.10 ⁴	Liquide incolore, odeur fruitée

* IUPAC = nomenclature de référence, développée par l'International Union of Pure and Applied Chemistry

** n° CAS = numéro d'enregistrement auprès du Chemical Abstracts Service, une division de l'American Chemical Society. Cette numérotation sert de référence en chimie.

2.2.3. Mécanismes de formation

D'un point de vue général, les composés organiques volatils expirés peuvent provenir de deux sources :

- Soit de l'environnement = COV exogènes : introduits par la nourriture, inhalés avec l'air ou absorbés par la peau.
- Soit de l'hôte = COV endogènes : générés au cours de différents processus biochimiques cellulaires dans l'organisme

2.2.3.1. COV d'origine exogène

D'autres sources de COV sont liées au tabagisme, à l'apport alimentaire ou à l'exposition aux polluants de l'air intérieur.

- Acétones

La concentration d'acétones excrétés dans l'air expiré peut varier en fonction de la consommation alimentaire (cf. Partie 3.3.2 : COV d'origine alimentaire).

- Esters

Ce groupe de composés peut être trouvé dans les graisses naturelles et les huiles grasses, la cire naturelle et les huiles essentielles de fruits en grandes quantités.

Les esters peuvent être hydrolysés par des estérases pour donner des alcools et des acides, à des températures inférieures à 40 ° C.

Un exemple d'une telle enzyme est la lipase qui catalyse l'hydrolyse des lipides dans le cadre du métabolisme naturel du corps.

- Nitriles et composés aromatiques

Les nitriles et les COV aromatiques retrouvés dans l'haleine, sont généralement considérés comme des polluants de sources exogènes.

Ces sources comprennent l'exposition à la fumée de cigarette, à l'alcool, et à la pollution de l'air (117).

Bien que ces composés soient plus susceptibles d'être d'origine exogène, ils pourraient être intéressants pour le suivi des patients atteints de cancer, car certains sont connus pour être des cancérigènes.

En effet, il s'agit de molécules très réactives, pouvant entraîner des dégâts de peroxydation des AGPI, de structure des protéines et d'ADN. Ces dommages s'accumulent au cours de la vie, tandis que les mécanismes de fixation naturels dans le corps deviennent moins efficaces, ce qui conduit à des maladies dépendantes de l'âge comme le cancer.

Ces composés sont stockés dans les tissus adipeux du corps ; il est donc probable que des patients cancéreux, préalablement exposés à des polluants professionnels continus ou à un tabagisme excessif, pourraient les libérer lentement à des concentrations significatives à travers la respiration expirée.

Un de ces composés est l'acétonitrile que l'on trouve chez les fumeurs. La voie suggérée pour l'acétonitrile est la biotransformation en cyanohydrine par le cytochrome P450 monooxygénase, qui se décompose spontanément en cyanure d'hydrogène et en formaldéhyde. En raison du métabolisme plutôt lent de l'acétonitrile dans le corps, des quantités substantielles d'acétonitrile peuvent être émises telles quelles par le souffle expiré et / ou l'urine. L'acétonitrile (CAS: 75-05-8) est prédominant dans le souffle expiré des fumeurs et pratiquement absent dans la respiration des non-fumeurs.

- Aldéhydes

Une source d'aldéhydes dans le corps concerne le tabagisme. Les aldéhydes saturés et insaturés tels que le formaldéhyde, l'acétaldéhyde et l'acroléine sont présents dans la fumée de tabac.

Des aldéhydes sont également issus du processus de détoxification par le cytochrome P450 à la suite du sous-produit du métabolisme du tabac.

Enfin, les aldéhydes peuvent également provenir de sources alimentaires. L'origine de certains aldéhydes peut être diététique, par exemple le 2-méthylpropanal, le 3-méthylpropanal l'hexanal, le nonanal, le décanal et le benzaldéhyde se trouvent dans les tubercules patata et l'hexanal dans les carottes.

- Cétones

D'autres sources exogènes comme les industries alimentaires ou chimiques peuvent entraîner une production de cétone qui pourrait éventuellement être absorbée dans le corps.

2.2.3.2. COV d'origine endogène

Seul les COV de ce groupe peuvent donner un aperçu des fonctions du corps et être considérés comme biomarqueur de maladies.

En effet, les composés organiques volatils, détectés dans des échantillons d'haleine, de sang ou d'urine, sont produits à l'intérieur du corps et fournissent des informations précieuses sur l'état de santé d'un individu.

Quelle que soit la distance de l'organe où il est produit, les COV peuvent être transportés via le sang vers les poumons et être expirés pendant la respiration. Par conséquent, l'origine des COV expirés est supposé être principalement alvéolaire.

Malgré l'avancée dans la recherche sur les biomarqueurs volatils respiratoires, les voies métaboliques de plusieurs d'entre eux restent inconnues.

Cependant, un lien entre le métabolisme énergétique, et en particulier le stress oxydatif, et la formation de COV est bien documenté dans la littérature scientifique (Figure 8).

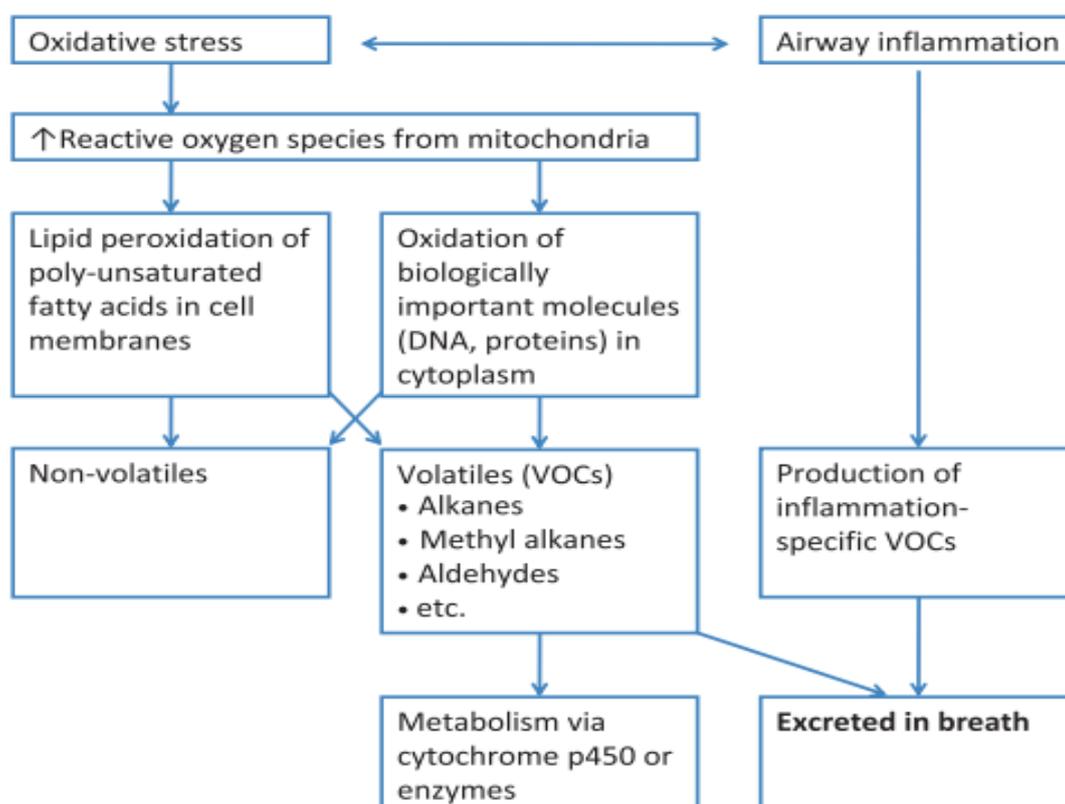


Figure 8 : Cascade du stress oxydatif aboutissant à la production de COV excrétés dans l'haleine (118)

- Le stress oxydatif :

L'effet de l'oxygène sur les marqueurs du stress oxydatif a été partiellement élucidé.

Dans le cadre du processus cellulaire dans les mitochondries, la cellule fabrique des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui ont un électron non apparié dans leur enveloppe externe. D'autres sources de ROS pourraient provenir d'origines exogènes, par exemple la fumée de cigarette, la pollution, les médicaments et les rayonnements gamma ou ultra-violet.

La contrainte oxydative d'un organisme est liée à l'équilibre général entre la formation et la désactivation des ROS et des radicaux libres. Un déséquilibre de la balance pro-oxydant/anti-oxydant induit le phénomène de stress oxydatif.

Pendant le stress oxydatif, les ROS et les radicaux libres sont excrétés des mitochondries dans la cellule. Une fois accumulés dans le tissu, les ROS peuvent attaquer différentes molécules dans l'organisme telles que les acides gras polyinsaturés (AGPI) et les protéines.

Le stress oxydatif provoque des dommages cellulaires irréversibles, structurelle et fonctionnelle : changements structurelle dans les protéines essentielles, peroxydation lipidique, rupture de brin d'ADN, modification de base azotée, forte augmentation du calcium libre intracellulaire et, dans certains cas, l'apoptose ou la nécrose (119).

Or, on sait qu'un des facteurs de risque au développement du cancer est lié au stress oxydatif et à l'induction des enzymes du cytochrome p-450 (le CYP450), groupe d'enzymes oxydases qui catalysent l'oxydation de substances chimiques organiques (120).

En outre, il a été démontré que cette famille d'enzymes est surexprimée dans le tissu de certains cancers, comme par exemple le cancer du sein humain au cours duquel l'aromatase synthétise les œstrogènes.

A noter que la plupart des processus inflammatoires sont associées à la production de ROS, et, par conséquent, les produits ROS pourraient ne pas être spécifiques du cancer.

L'état tumoral ou inflammatoire, de différentes manières, modifie le métabolisme des COV des deux origines endogène et exogène.

Le tabagisme est un facteur de risque de pathologies telles que le cancer du poumon, la bronchopneumopathie chronique obstructive et les maladies cardiovasculaires, entre autres. Dans la plupart de ces maladies, un degré élevé de stress oxydatif se produit

principalement en raison de la quantité de radicaux libres et d'espèces réactives d'oxygène et d'azote provenant de la fumée du tabac.

La plupart des composés organiques volatils (COV) sont créés au cours de l'explosion oxydative. En effet, les ROS et les RL excrétés en dehors des mitochondries produisent des alcanes volatils qui sont émis dans la respiration alvéolaire humaine. Pour le cas du cancer du poumon par exemple, ce cancer résulterait de l'interaction de facteurs héréditaires et environnementaux. Plusieurs CYP450 sont activés à la suite de l'exposition de toxiques environnementaux comme la fumée du tabac (Figure 9).

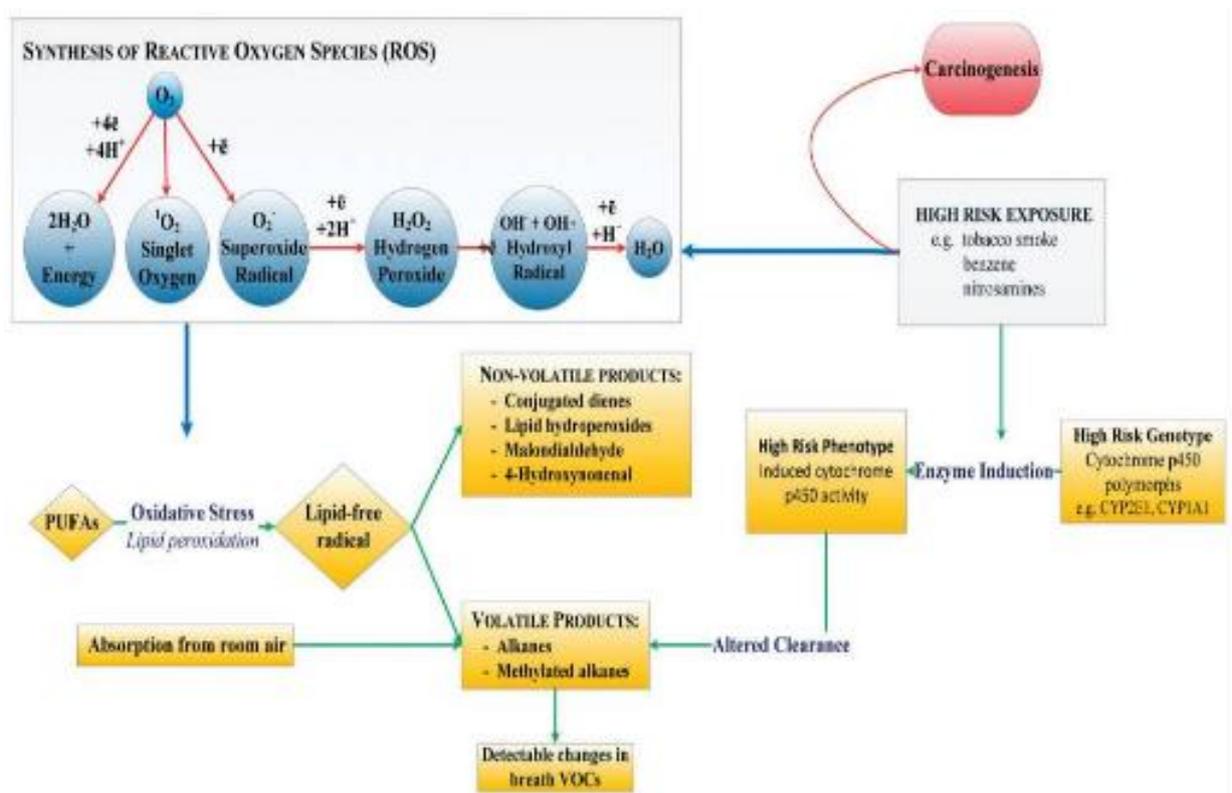


Figure 9 : Base hypothétique du test de l'haleine pour le cancer du poumon

En outre, la détection et la quantification du stress oxydatif, et sa surveillance pendant la chirurgie en se référant à la composition de la respiration exhalée, ont permis de faire des progrès considérables (121).

- Voies biochimiques des principales familles de COV endogènes

La connaissance combinée de la source cellulaire et du processus biochimique sous-jacent fournira une base logique pour l'utilisation des COV dans la détection des altérations métaboliques, qui sont causées ou associées à des maladies.

Les voies biochimiques menant à la production de diverses classes de COV (hydrocarbures, alcools, aldéhydes, cétones, esters, nitriles et composés aromatiques) ont été examinées dans la littérature scientifique.

- Peroxydation lipidique :

De tous les changements causés par l'augmentation du stress oxydatif, la peroxydation lipidique génère un grand nombre de métabolites de réactions d'oxydation catalysées par les enzymes cytochrome P450 avec des systèmes associés.

La peroxydation lipidique est responsable de l'endommagement des tissus in vivo, pouvant être le point de départ d'un cancer, de maladies inflammatoires, d'athérosclérose et de vieillissement. Le corps humain essaie de contrôler et de réduire la peroxydation des lipides par l'utilisation d'antioxydants.

A titre d'exemple, la présence des substances dans l'air expiré telles que, les composés Heptanal et Nonanal a pour origine le processus de peroxydation lipidique. Il s'agit de métabolites issus des acides gras omega3 et ω_6 , principaux composants des phospholipides formant une partie des membranes cellulaires.

Alcanes, alcools et aldéhydes sont produits par divers systèmes, y compris la réduction de l'hydroperoxyde par le cytochrome P450, en tant que produit secondaire de la peroxydation lipidique.

- Hydrocarbures

Les alcanes sont principalement produits par peroxydation de PUFA (Acides gras polyinsaturés), principalement dans les membranes cellulaires et subcellulaires (peroxydation lipidique).

La peroxydation des lipides et d'autres biomolécules par des espèces réactives de l'oxygène, produit des composés volatils de la famille des Alcanes, comme l'éthane et le 1-pentane.

Ces hydrocarbures saturés, produits finaux de la peroxydation lipidique, ont été largement utilisés comme indicateurs *in vivo* non invasifs de la peroxydation lipidique.

Bien que l'apparition d'autres hydrocarbures saturés (par exemple, C 3 -C 11) puisse être liée au processus de peroxydation des lipides, dans le cas des hydrocarbures ramifiés, ce mécanisme ne semble pas pertinent. En raison de leur faible solubilité dans le sang, les hydrocarbures qui ne sont pas métabolisés dans le corps sont émis dans la respiration en quelques minutes.

Le propane, le *n*- butane et le *n*- pentane ont été retrouvés dans l'haleine avec une fréquence élevée de 87%, 99% et 90%, respectivement. Les deux premiers sont considérés comme les produits métaboliques des bactéries et de l'oxydation des protéines.

- Acétone

L'acétone formé par la décarboxylation de l'acétoacétate provient également de peroxydation lipidique. Plus précisément, l'acétoacétate et le b-hydroxybutyrate synthétisés dans le foie en quantités significatives, subissent une décarboxylation spontanée de l'acétoacétate pour donner de l'acétone (Figure 10).

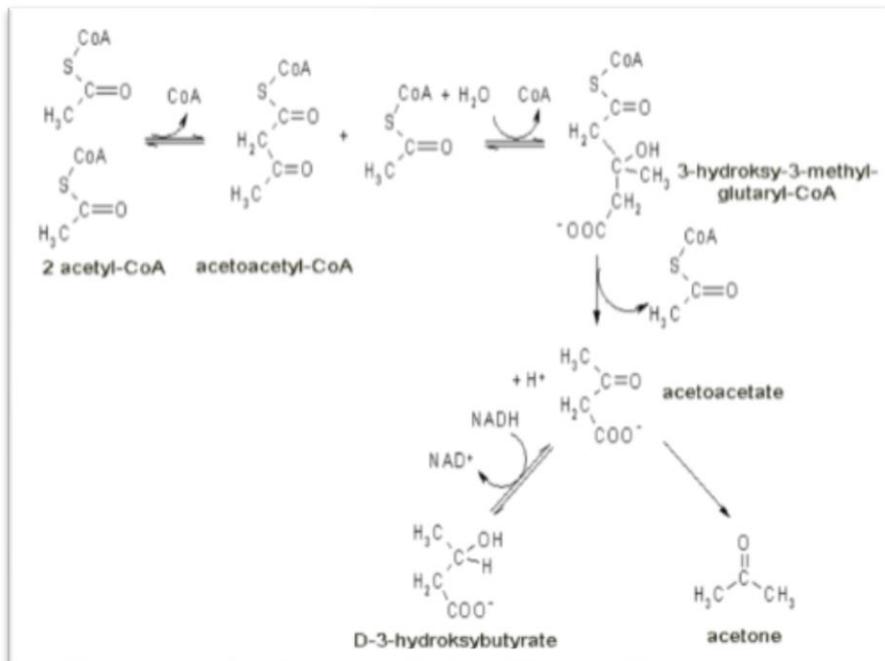


Figure 10. Mécanisme de formation de l'acétone

Par ailleurs, au cours de la progression du cancer, une augmentation du taux d'oxydation des acides gras due à des changements dans les conditions métaboliques entraîne la formation de corps cétoniques, dont l'acétone.

- Aldéhydes

L'hydroperoxyde, en tant que produit secondaire de la peroxydation des lipides, subit une réduction enzymatique par le cytochrome P450, ce qui aboutit à la formation de composés Aldéhydes (Figure 11).

D'autres aldéhydes, tels que l'acroléine et la méthacroléine sont considérés comme les produits finaux de la peroxydation lipidique.

Les aldéhydes sont également générés par le catabolisme des acides aminés et des hydrates de carbone.

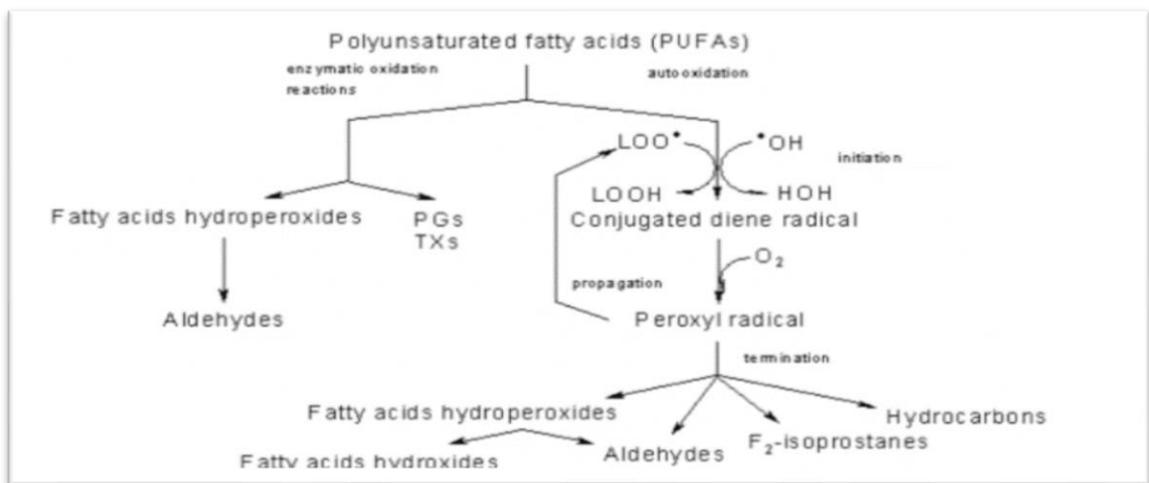


Figure 11. Produits générés dans l'oxydation des acides gras polyinsaturés (36)

o Métabolisme de l'acide mévalonique

La principale source d'isoprène est une synthèse endogène d'acide mévalonique, précurseur de la biosynthèse du cholestérol. Ce composé est présent de façon universel chez tous les individus, à hauteur de 30 à 70% de tous les hydrocarbures (74)

D'autres sources d'isoprène sont connues, principalement l'industrie pétrochimique (fabrication de caoutchoucs synthétiques) et la production naturelle par les plantes.

- Métabolisme du glucose et des acides aminés

L'acétone provient également du métabolisme du glucose.

Le métabolisme des protéines peut également produire des corps cétoniques. Dans l'état de cachexie, typique dans des conditions pathologiques telles que le cancer, le métabolisme des protéines augmente, ce qui entraîne des niveaux plus élevés de corps cétoniques.

Cependant, l'acétone ne peut pas être utilisée comme biomarqueur du cancer car ses niveaux de concentration dans l'haleine sont altérés par l'exercice, le jeûne et / ou la consommation de nourriture.

L'acide acétique, ainsi que la 2,3-butanedione, le 1-butanol, le 2-propanol, l'acétaldéhyde et l'éthanol, peuvent également être formés par les fermentations glycolytiques et non-glycolytiques des hydrates de carbone (oxydation de l'acétaldéhyde par l'enzyme *aldéhyde déshydrogénase*), mais aussi les fermentations d'acides aminés (par exemple l'alanine, la glycine et surtout le glutamate) (74).

- Métabolisme des alcools

Constitue la première source d'aldéhydes.

Les alcools peuvent être absorbés par toutes les parties du tractus gastro-intestinal principalement par diffusion dans le sang. Les alcools peuvent également être un produit du métabolisme des hydrocarbures.

Des enzymes telles que l'alcool déshydrogénase (ADH) et le cytochrome P450 (CYP2E1, qui agissent principalement dans le foie) sont responsables du métabolisme de l'alcool dans l'organisme. L'ADH peut catalyser l'oxydation de plusieurs alcools différents chez l'homme ; les COV restants sont éliminés par l'excrétion d'alcool dans l'haleine, l'urine, la sueur, les fèces, le lait maternel et la salive.

L'analyse de l'éthanol de souffle a été un test pour l'intoxication à l'alcool pendant beaucoup d'années, cependant de petites quantités d'éthanol exhalé peuvent être mesurées chez les individus qui s'abstiennent de l'alcool. L'éthanol produit de manière endogène peut être un sous-produit métabolique du métabolisme bactérien (58).

les alcools respiratoires, tels que le méthanol et l'éthanol, sont des produits métaboliques bien connus qui proviennent en partie d'une fermentation dans l'intestin. Le méthanol endogène est également généré par le système enzymatique méthyltransférase.

Tableau 13 : Origine des COV et leurs liens avec un type cancer

COV	Origine	LIEN AVEC CANCERS
Acétone	Catabolisme des acides gras	Cancer du poumon (69)
Isoprène	Biosynthèse du cholestérol. Voie mévalonique	Cancer du poumon (122) Cancer gastrique (13)
Ethanol	Naturel par les plantes, diététique, Métabolisme bactérien de l'intestin des sucres (117)	Cancer du foie (123)
Acétonitrile	Fumée de tabac	Cancer du poumon (69)
2-propanol	Produit d'une réduction à médiation enzymatique de l'acétone	Cancer du poumon (57) Cancer du sein (65)
Xylène	Essence, fumée de tabac	Cancer de la tête et du cou (65)
Ethane	Naturel plante, essence, Peroxydation lipidique	Cancer du poumon (65)
4-Méthyloctane	Contaminant plastiques, tubes, équipement médical	Cancer de la tête et du cou (124)
Heptanal	Déchet naturel ou industriel, alimentation	Cancer du poumon (33)
Furaldéhyde	Déchet naturel ou industriel	Cancer de l'estomac (117)
Benzène	Essence, fumée de tabac	Cancer du poumon (69)
Nonane	Naturel des plantes ou essence	Cancer du sein (4)
Méthylpropane	Réfrigérant, plastiques	Cancer du poumon (70)

2.3. ASPECT METHODOLOGIQUE DE L'ANALYSE DE L'AIR EXPIRE

Les composés organiques volatils constituent une part importante de la chimie actuelle.

L'étude d'échantillons gazeux est aujourd'hui un domaine à part entière de la chimie analytique.

Cette progression dans la recherche est liée à l'intérêt porté par de nombreux secteurs, allant de l'agroalimentaire, le milieu médical, en passant par l'environnement, en quête d'innovations dans la production d'arôme, le contrôle ou le diagnostic.

En effet, l'analyse de l'air expiré trouve son intérêt dans la détection et la quantification de composés organiques volatils (COV), notamment ceux d'entre eux liés à certains types de cancers.

En 2006, le forum international MNT Gas Sensor Forum (Micro Nano Technology), annonce comme « Grand défis de la recherche » les points suivants (125) :

- La caractérisation de COV
- L'identification des gaz expirés pour l'analyse médicale
- Mesure des variations anormales des marqueurs gazeux de maladies
- L'amélioration de la sélectivité et de la stabilité pour les capteurs de gaz semi-conducteurs
- Des microsystèmes électromécaniques (MEMS) intégrés en utilisant des réseaux de capteurs

En effet, ce type d'analyse constitue une nouvelle dynamique dans le diagnostic médical car elle utilise des techniques de collecte de prélèvements et d'échantillonnage non invasives qui peuvent être facilement acceptées par les patients et potentiellement peu coûteuse (126).

Avant toute analyse respiratoire de COV, il est important de cibler la phase de l'expiration à privilégier, les échantillons d'haleine sont ensuite recueillis dans des récipients prévus à cet effet (cartouches ou sacs en plastique inerte), puis concentrés avec des dispositifs de concentration, tels que la microextraction en phase solide (SPME) ou les tubes absorbants.

2.3.1. Prélèvements

Au cours du prélèvement de l'échantillon d'haleine, il est possible de choisir la partie de la respiration qui peut être collectée. En effet, la phase expiratoire peut être divisée en 3 phases distinctes en fonction des concentrations de composés gazeux (Figure 13) :

- Expiration tardive (*late expiratory*)
- Expiration de fin de marée (*end tidal*)
- Expiration mixte (*mixed expiratory*)

Chacun des trois principaux types d'échantillonnage sera discuté plus en détail.

Rappel physiologique de la respiration

En physiologie pulmonaire, l'air expiré est un mélange de deux types d'air (Figure 12) :

- Air contenu dans l'espace mort : c'est à dire les voies respiratoires qui ne participent pas aux échanges gazeux. Il s'agit de l'air provenant de la cavité buccale, de la trachée et des bronches.
- L'air alvéolaire : il s'agit de la fraction d'air expiré qui a été en contact avec le sang dans les alvéoles.

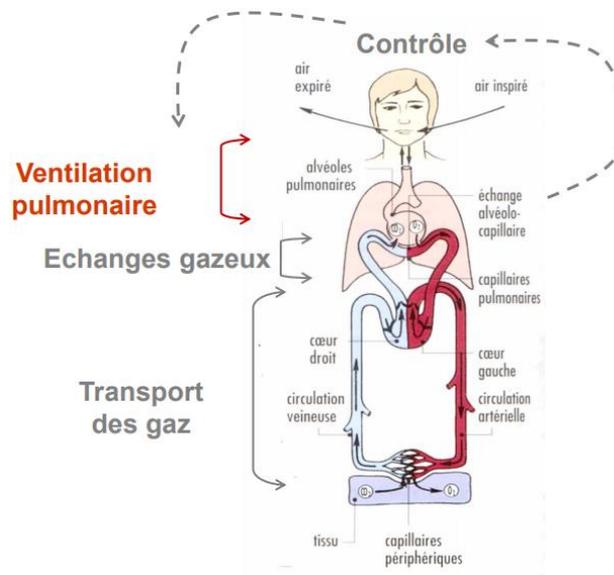


Figure 12 : Schéma de la physiologie respiratoire (127)

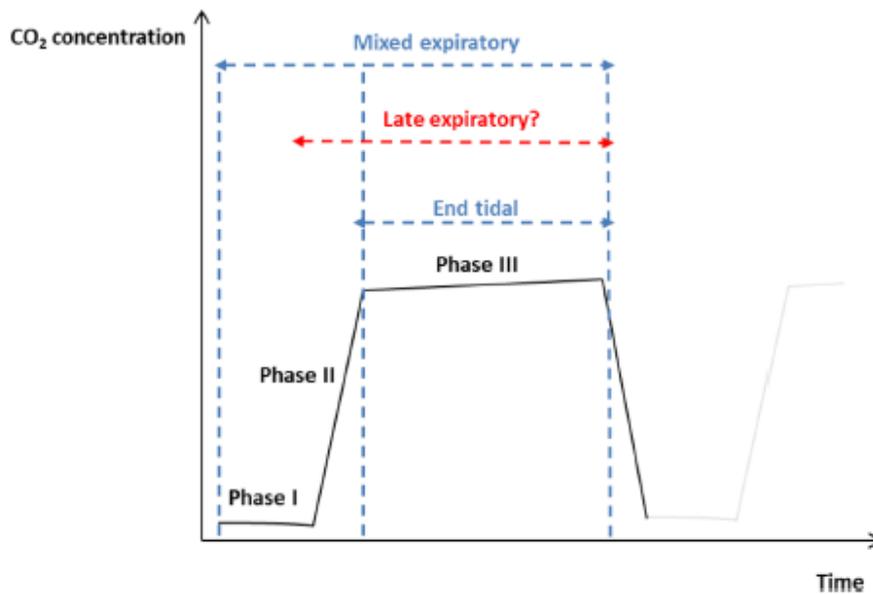


Figure 13. Cycle expiratoire (128)

Dans la plupart des articles disponibles, le contrôle visuel du CO₂, en repérant les concentrations de CO₂ pendant l'expiration, représente la méthode la plus couramment utilisée pour situer le type d'air expiré recueillis,

Il existe en effet une corrélation entre la phase expiratoire et la quantité de CO₂ expiré : au cours de la phase I de l'exhalation (Figure 13), les niveaux de CO₂ sont généralement faibles mais augmentent pendant la transition (phase II) et évoluent ensuite en plateau annonçant le début de la phase III, dite phase alvéolaire.

Cette méthode, permettant de visualiser les différentes phases de l'expiration, est connue sous le nom de capnométrie et offre la possibilité de savoir quand commencer la capture de l'haleine. Il existe des dispositifs qui permettent l'extraction manuelle de l'air lorsque la phase alvéolaire a été atteinte (128) et d'autres de façon automatisée (129). L'utilisation du contrôle visuel de la respiration par le CO₂ peut également être étendue aux patients ventilés (130).

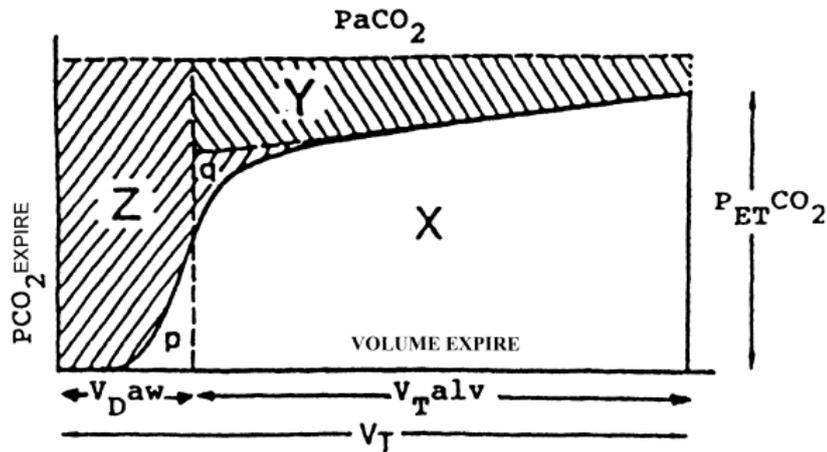


Figure 14. Représentation visuelle schématique représentant une seule phase respiratoire expirée par capnographie (128).

Z = espace mort anatomique
 Y = espace mort alvéolaire
 X = volume courant effectif
 V_i = volume courant
 V_{Daw} = espace mort des voies aériennes

} $Z + Y$ = espace mort physiologique

Idéalement, la respiration devrait être prélevée lorsque la concentration de dioxyde de carbone atteint son plateau (Figure 14). D'autre part, il est important que la personne fournissant l'échantillon ne n'hyperventile pas.

2.3.1.1. Souffle d'expiration mixte

L'échantillonnage expiratoire mixte de l'haleine englobe le souffle exhalé total, incluant l'air de l'espace mort. Cependant, l'air de cet espace, correspondant à l'air logé dans la bouche et la cavité nasale, n'est pas impliqué dans les échanges gazeux.

L'espace mort est une notion essentielle pour l'interprétation des problèmes liés à la ventilation. Il s'agit d'un espace dans lequel la ventilation s'effectue mais où les échanges gazeux n'ont pas lieu. Il comprend par exemple la bouche, le passage nasal, le pharynx, le larynx, la trachée, les bronches et les bronchioles. Ces structures anatomiques ne participent jamais aux échanges de gaz et constituent ce que l'on appelle l'espace mort anatomique.

En plus de cet espace, quelques alvéoles sont ventilées, mais non perfusées, et ne participent pas non plus aux échanges de gaz : ils constituent l'espace mort alvéolaire.

La somme des espaces morts anatomiques et alvéolaires est l'espace mort physiologique.

Alors que le volume de l'espace mort anatomique est généralement fixé pour un individu, l'espace mort alvéolaire apparaît plus variable et dépend notamment de la position spatiale de l'individu (34) et de la survenue de diverses affections (131).

La respiration expiratoire mixte peut être considérée comme le type de respiration le plus simple, car elle regroupe toutes les phases de l'air exhalé illustrées sur la Figure 14. Cette option peut être intéressante en raison de sa simplicité, mais elle n'offre pas la meilleure qualité d'échantillon d'haleine en raison de la plus grande abondance de contaminants de l'environnement, issus de la bouche et du nez.

Ce temps de collecte n'est pas idéal car il peut encore y avoir de fortes chances d'obtenir un faux résultat positif dans cette situation ; à savoir, l'identification d'un COV exogène en tant que marqueur candidat. Cela a été reconnu par plusieurs études soulignant la nécessité d'un contrôle rigoureux et d'un échantillonnage reproductible lors de l'obtention d'échantillons d'haleine (128).

Les autres types de souffle visent donc à minimiser la contamination de l'air expiré par cet espace mort.

2.3.1.2. Souffle d'expiration tardive

L'échantillonnage de l'haleine expiratoire tardive consiste à rejeter la partie initiale de l'expiration expirée (espace mort estimé) et à capturer l'air à la fin du cycle respiratoire. Ce type de respiration représente le choix d'une grande partie des études de biomarqueurs respiratoires. La minimisation de l'espace mort permet une plus grande contribution relative des COV endogènes dans l'échantillon.

Dans certaines méthodes, il suffit d'exclure les premières secondes d'expiration d'un individu avant que l'échantillon d'haleine ne soit collecté.

2.3.1.3. Souffle de fin d'expiration

Également appelé expiration « alvéolaire », il s'agit de l'air collecté du début à la fin de la phase III du cycle respiratoire (Figure 13). Durant cette phase, on note de fortes concentrations de COV endogènes et un minimum de contaminants.

L'utilisation du terme « alvéolaire » peut être trompeuse car les modèles d'échange de gaz ont montré que l'échange de COV avec les voies respiratoires peut se produire (132).

De la même façon qu'une respiration expiratoire tardive, les COV des voies respiratoires peuvent être perdus et comme tous les marqueurs endogènes ne sont pas systématiquement produits, ce type de souffle ne convient pas pour étudier les maladies des voies respiratoires, dans lesquelles il est utile d'explorer les marqueurs locaux d'une inflammation, comme par exemple l'oxyde nitrique, un marqueur respiratoire endogène provenant des voies aériennes et utilisé en clinique pour la caractérisation de l'asthme (133).

Un échantillon d'air de fin d'expiration peut être obtenu par ré-inhalation. Dans cette approche, le but est de parvenir à un équilibre entre les voies respiratoires et la circulation sanguine. Étant donné l'absence d'introduction d'une source d'air externe pendant ce processus, on considère que la concentration recueillie reflète une concentration proche de la concentration sanguine.

Cette méthode fut utilisée en 1983 pour comparer une concentration d'éthanol dans sang et dans l'air expiré (134). Cependant, cette étude concernait un seul analyte et peut ne pas s'appliquer à tous les métabolites.

Un résultat similaire a été obtenu par Ohlsson et al. en utilisant une variation de ré-respiration connue sous le nom de ré-respiration isotherme (135). Cette variante vise à minimiser la condensation dans le récipient et les voies respiratoires.

La représentation visuelle des phases respiratoires est absente et peut ne pas être nécessaire en utilisant cette méthode car l'air ambiant n'est pas introduit après la première exhalation.

Cette approche peut ne pas convenir à la clinique en raison d'une gêne potentielle pour les patients, générée par la hausse des niveaux de dioxyde de carbone et la diminution de la concentration d'oxygène, et ne convient encore moins aux personnes souffrant de problèmes respiratoires aigus (ou chez les patients ventilés mécaniquement).

La condensation peut également avoir un impact sur la stabilité des COV recueillis de cette manière si elle n'est pas optimisée.

2.3.1.4. Variabilités

Plusieurs précautions sont à prendre en compte lors du prélèvement des échantillons pour amoindrir le risque de contamination des échantillons par des COV contenu dans l'air ambiant.

Les variabilités inter-individuelles sont également à prendre en considération pour exploiter au mieux les résultats des analyses.

a) Air exteieur

L'air ambiant contient des composants organiques volatils à des concentrations pouvant dépasser les quantités présentes dans l'air expiré, il est donc nécessaire de prendre un soin particulier dans le nettoyage de l'air environnant en contact des personnes examinées avant de prélever un échantillon d'haleine.

En effet, la plupart des analytes d'intérêt sont également présents dans l'air inhalé et leur impact sur les mesures représente un problème fondamental (130) (Figure 15).

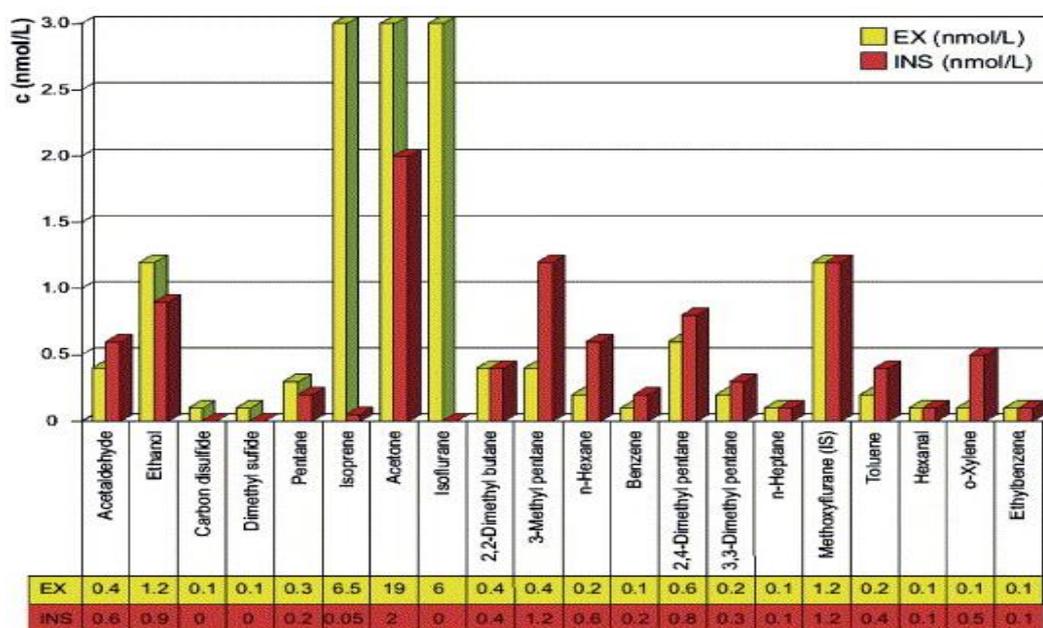


Figure 15. Comparaison des concentrations des substances volatiles respiratoires inspirées et expirées (83).

b) Reproductibilité

L'amplification et la fréquence de la respiration sont sous contrôle du système nerveux autonome. Cependant, les prélèvements peuvent être soumis à une variabilité. En effet, lorsqu'on demande au patient de fournir un échantillon d'haleine, cette action entraîne un changement de la respiration autonome vers une respiration consciente.

D'autres préoccupations relatives à la reproductibilité se posent également en raison des propriétés physiologiques distinctes entre individus tels que le débit cardiaque et la ventilation pulmonaire qui peut également introduire une variabilité indésirable, même au sein d'un même individu échantillonné à plusieurs reprises dans différents états physiologiques (136).

c) Tabac

Chez l'homme et la femme, respectivement 90% et 78% des cancers du poumon seraient dus au tabac. En effet, un lien univoque entre la fumée de tabac et la carcinogénèse pulmonaire a été établi par des observations moléculaires ainsi que par des données expérimentales précliniques et épidémiologiques sur les animaux.

La fumée de tabac contient de nombreux COV également retrouvés dans l'haleine. Selon Horvath et al., fumer est associé à l'altération des COV exhalé, car la fumée de tabac contient une quantité importante de COV, et modifie le processus cellulaire relatif à la production de COV en augmentant le stress oxydatif et la peroxydation des lipides (69). On pourrait s'attendre ainsi à un facteur de confusion lorsque l'on utilise le profil COV pour la détection du cancer du poumon mais Philipps *et al.* ont montré que fumer ne modifiait pas le pouvoir discriminant des tests de COV d'haleine (137).

Néanmoins, par précaution et pour une collecte d'échantillon optimale, il est nécessaire d'interdire aux patients de fumer avant un prélèvement d'air expiré.

d) Eau/ humidité

L'interaction des COV avec de la vapeur d'eau, comprenant 99% en volume de liquide exhalés est une autre considération importante lors de la prescription d'une collecte normalisée. Des études ont montré une concentration réduite de COV clés en raison de leur absorption dans de l'eau de condensation dans le dispositif de collecte (138).

En général, une augmentation de l'humidité est associée à une augmentation de la conductivité et donc à une diminution de la résistivité (139).

En résumé, un risque de contamination se pose en raison de l'inclusion de l'espace aérien mort, mais aussi de la présence de contaminants exogènes, et ne doit être pas négligée afin d'obtenir des résultats représentatifs de la réalité et exploitables.

Ainsi, plus d'efforts sont encore nécessaires avant de pouvoir déterminer un standard de temps expiratoire idéal, utilisable en clinique. Le système idéal aurait besoin d'être adapté à l'état physiologique de chaque individu pour recueillir un échantillon représentatif et réduire au minimum la contamination de l'espace mort, mais ce serait au détriment de la simplicité et l'aspect pratique de nombreux systèmes actuels.

En revanche, l'utilisation d'un capteur de pression qui active l'échantillonnage au cours d'une phase d'expiration prédéfinie, déterminée par la courbe de pression expiratoire de l'individu, peut être utilisée comme un système personnalisé pour l'échantillonnage (140). Malgré un volume imposant et sa complexité, il peut être une alternative plus précise.

La méthode idéale du type de prélèvement expiratoire de l'haleine devra répondre à des exigences : simplicité, adaptée à la physiologie personnelle, permettant une sélection ciblée des voies aériennes et / ou alvéolaires (selon la maladie étudiée) et éliminant l'air collecté de l'espace mort et de l'environnement.

Cette combinaison n'est pas encore possible et toutes les méthodes actuelles nécessitent un compromis dans un ou plusieurs domaines.

Comme l'analyse de la respiration n'en est encore qu'à ses débuts et que l'objectif principal est la découverte de biomarqueurs, il apparaît judicieux de minimiser les compromis, au détriment de la simplicité.

2.3.2. Echantillonnage de l'air expiré

L'échantillonnage de l'air expiré est une étape cruciale dans l'analyse de la respiration.

L'échantillonnage direct est préférable au stockage pour une analyse ultérieure. De cette façon, la décomposition des échantillons ou la perte de composés par diffusion est évitée.

Lorsque l'analyse directe n'est pas possible, le stockage approprié de l'air expiré est une question importante à considérer, car il expose à des risques :

- De transfert de contaminants de l'air,
- De perte par diffusion à travers le sac de stockage,
- D'adsorption sur les parois intérieures du sac de stockage,
- D'interactions entre les constituants de l'échantillon et/ou avec les COV présents sur les parois du récipient de stockage (COV des adhésifs et des plastifiants des ballons).

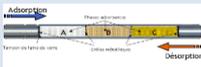
Tout ceci peut altérer irréversiblement la composition initiale de l'échantillon et ainsi fausser les résultats finaux des analyses (141).

2.3.2.1. *Les différents types de collecteurs*

Généralement, la respiration peut être collectée de plusieurs façons. Une liste non exhaustive des moyens de collecte est présentée dans le Tableau 14.

L'échantillonnage direct de l'haleine préalablement concentrée est possible (140), mais une grande partie des études examinées décrivent le stockage temporaire avant la concentration préalable.

Tableau 14 : Exemples de collecteurs d'haleine en vigueur dans la recherche de l'analyse respiratoire

Collecteur	Matière	Particularités	Avantages Inconvénients
Sacs en polymère type Tedlar®	 PTFE	Transparents ou noirs Préconcentration nécessaire	Absorption de certains constituants de la respiration pendant le stockage.
Sacs Flexfoil®	 PET / NY / AL / CPE	Utilisé pour le prélèvement d'air en bâtiment d'élevage	Matériau limitant l'adsorption du NH ₃ sur les parois
Sacs BreathBag™	 NR	Contient une bande chimique éliminant les contaminants volatils de fond	
Sacs Nalophan®	 PET	Utilisation pour SPME	Coût très limité, inertie, stabilité de l'échantillon
Flacons en verre	 Verre	Utilisation pour SPME	Ne libère pas de composés organiques
Désorption thermique	 Tubes avec Différents adsorbants	Utilisé dans TD-GC TD	
Bio-COV Sampler™	 Plastique (présenté comme sûr et sans émission) Expiratoire tardif	Faible volume d'air collecté Personnel non qualifié possible	
Appareil BCA	 Microprocesseurs piège absorbant en acier inoxydable contenant du charbon actif Expiratoire tardif	Appareil de prélèvement d'air portatif	

Poly-tétra-fluor éthylène/ polyéthylène téréphtalate / nylon / feuille d'aluminium / polyéthylène chloré polyéthylène téréphtalate

2.3.2.2. Fréquence d'utilisation par type de collecteur

En ce qui concerne le type de matière, les sacs en polymère englobent la majorité des contenants de collecte de l'haleine ; dont les sacs Tedlar[®], Mylar, et des sacs en aluminium.

Actuellement, les sacs Tedlar sont les matériaux les plus couramment utilisés pour la collecte de l'air (142).

Les sacs Nalophan sont également populaires en raison de leur faible prix, de leur inertie et de leur durabilité relativement bonne.

Bio-COV[™] Sampler, un appareil de collecte de l'haleine est l'échantillonneur le plus utilisé après les sacs en polymères, comme on le voit dans le graphique ci-dessous (Figure 16) (143).

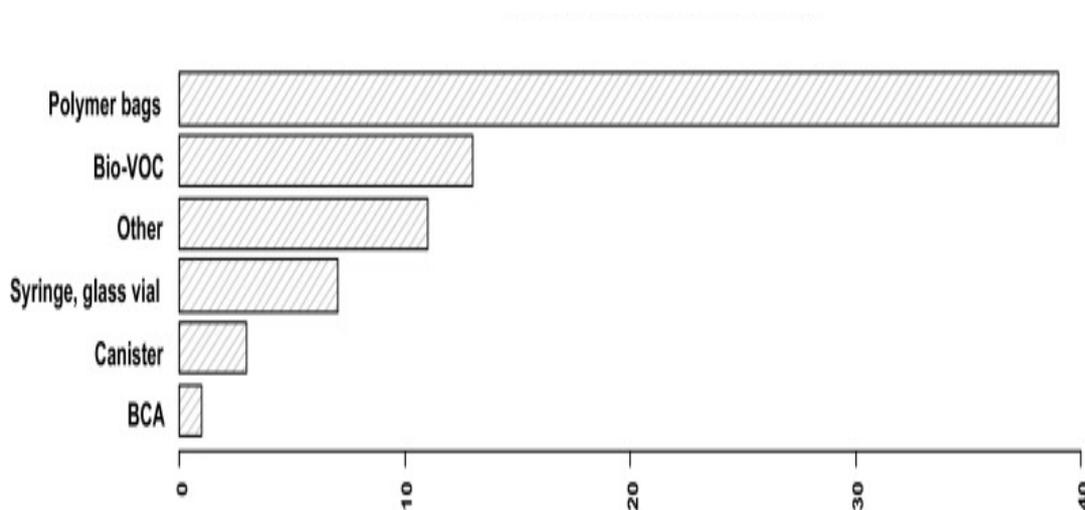


Figure 16 : Fréquence d'utilisation de procédé de collecte. répartition en pourcentage des types de récipients de collecte de l'air expiré (133)

2.3.2.3. Qualité attendu d'un collecteur

Un collecteur doit présenter certaines qualités indispensables pour une éventuelle pratique clinique :

- Economique
- Facilité d'utilisation
- Durabilité
- Inertie : contenant chimiquement inerte par rapport aux composés du souffle
- Imperméabilité : ne permettre ni l'entrée ni la sortie des COV de l'air expiré

- Compatibilité avec de multiples dispositifs de piégeage de COV

D'autres facteurs tels que les niveaux de contaminant du contenant doivent être pris en compte afin de ne pas compromettre les précieux échantillons humains.

2.3.2.4. Aperçu sur les sacs en polymère

L'utilisation des sacs en polymère pour un échantillon complet d'air consiste à remplir un sac spécial (Tedlar®, par exemple) avec le mélange gazeux à analyser et de le dégonfler dans l'appareil prévu pour l'analyse.

Le grand désavantage de cette méthode est qu'elle nécessite une étape de préconcentration.

Les composés volatils doivent être focalisés à l'entrée du détecteur par un piège ou sur un adsorbant. Cette technique engendre donc de nombreuses étapes de préparation, chacune d'entre elles pouvant conduire à des pertes. Elle n'est donc pas toujours recommandée pour l'analyse de COV. En revanche, elle est souvent employée pour réaliser des dosages olfactométriques pour le contrôle des nuisances olfactives.

2.3.2.5. Aperçu sur le BCA (Breath collecting apparatus) :

Conçu par Messana Research, organisation fondée par Michael Phillips, médecin pionnier dans l'analyse de l'haleine.

Il s'agit d'un appareil de prélèvement d'air portatif pouvant recueillir des échantillons d'haleine pratiquement n'importe où (Photo 3).

La collecte se déroule pendant deux minutes, pendant lesquelles le sujet respire normalement à l'intérieur d'un embout buccal jetable, tout en portant un pince-nez. Les COV respiratoires sont ensuite captés sur un petit piège adsorbant en acier inoxydable (Photo 2).

Ce piège est ensuite envoyé au laboratoire pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse. Un deuxième piège adsorbant, séparé du premier, capture des échantillons d'air ambiant.

En effet, la sensibilité importante du BCA permet de recueillir également un échantillon d'air ambiant, permettant ainsi de différencier les COV inhalés des COV respiratoires et calculer l'« empreinte respiratoire » provenant du corps.

Chaque analyse identifie généralement plus de 200 COV différents.

Le BCA permet la détection des COV présents en concentrations pico-molaires (10^{-12} mol / l).



Photo 3 : Appareil BCA (77)



Photo 2 : Tube BCA

Plus récemment, Messana R a développé un nouveau système d'analyse de l'haleine encore plus performant, le BreathLink™, qui en plus de recueillir l'air expiré, il concentre et analyse l'échantillon d'haleine en quelques minutes *via* un transfert instantané par Internet.

2.3.2.6. Aperçu sur le Bio-COV™

Ce dispositif d'échantillonnage commercialisé sous le nom de Bio-COV Sampler™, a été récemment introduit sur le marché et connaît depuis une utilisation croissante (144).

Le principal avantage de cet échantillonneur est de recueillir la dernière partie de la respiration exhalée, qui est plus susceptible de représenter l'air profondément dans les poumons.

L'échantillonneur d'haleine Bio-COV se compose :

- D'un embout buccal jetable
- D'un collecteur volumétrique (tube / seringue) : environ 100 ml d'air
- D'un piston.

Le sujet respire à travers un embout en carton jetable dans l'échantillonneur muni d'une extrémité ouverte permettant à l'air d'être déplacé au fur et à mesure de l'expiration.

En conséquence, cela permet la collecte de l'air alvéolaire.

Une fois la collection de respiration terminée, les COV sont concentrés en utilisant des fibres SPME, insérées directement dans l'échantillonneur.

La collecte d'échantillon d'haleine de façon contrôlée est une exigence primordiale pour la progression de la recherche d'analyse de l'haleine.

Dans ce sens, la mise en place de procédés standardisés, prenant en compte les critères de qualité, ainsi que les avantages et les inconvénients des différents types de collecteurs s'avèrent utiles pour démocratiser l'utilisation de l'analyse du souffle.

Cependant, malgré l'évolution de la recherche dans ce domaine, il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes normalisées d'échantillonnage de l'haleine ou de lignes directrices sur les meilleures pratiques, mais des efforts sont actuellement déployés pour établir un consensus commun.

2.3.2.7 Alternative à l'échantillonnage : l'analyse en temps réel

L'analyse en temps réel évite la collecte d'échantillons dans des sacs ou sur des pièges qui peuvent être source de dégradation partielle des métabolites de l'haleine ou d'introduction d'impuretés dans l'échantillon.

Au cours des dernières décennies, des techniques analytiques de spectrométrie de masse à tube d'écoulement (SIFT-MS) et de spectrométrie de masse à transfert de protons (PTR-MS) ont été développées pour des applications médicales, utilisant l'analyse de souffle, l'analyse d'urine, l'analyse fécale, les études *in vivo* de peau humaine, et les cultures cellulaires *in vitro* (74).

Ces deux techniques ont été développés pour la détection en ligne et la quantification en temps réel des gaz, avec une sensibilité élevée. Elles sont par ailleurs suffisamment sensibles et rapides pour permettre l'analyse simultanée de plusieurs métabolites gazeux à l'état de traces dans des collectes à respiration unique (145).

2.3.3. Préconcentration

Les concentrations de nombreux biomarqueurs respiratoires, sous forme de composés organiques volatils, se trouvent dans l'haleine à l'état de trace, généralement des parties par million de volume (ppmv) voire moins (pptv-ppbv), et leur détection fiable pose un défi majeur.

C'est pourquoi, avant toute tentative de séparation et de détection à l'aide d'instrument analytique, même très sensible, une préconcentration s'avère nécessaire.

En effet, cette préconcentration est indispensable pour améliorer les limites de détection (LOD) des méthodes analytiques.

D'autant plus, que pour certaines méthodes de collecte, une dilution des COV peut se produire, ce qui est particulièrement le cas pour les échantillons d'haleine à prélèvements de phases expiratoires mixtes (mélange d'air alvéolaire et d'air de l'espace mort).

Les échantillons d'air sont des mélanges très complexes, il est donc impératif de déterminer quel piège ou combinaison de pièges doit être utilisé pour obtenir les meilleurs résultats dans le contexte étudié.

Dans l'idéale, une préconcentration utilisera des pièges capables d'adsorber sélectivement et de façon complète les composés organiques volatils dans le souffle, puis de les désorber complètement, généralement par décomposition thermique, sans perte ou de contamination des analytes d'intérêt.

Les méthodes de pré-concentration couramment utilisées comprennent :

- Les tubes de désorption thermique (TD) contenant des adsorbants
- La microextraction en phase solide (SPME)
- Les dispositifs de piégeage d'aiguilles (MTN)

2.3.3.1. *Choix de l'adsorbant*

Le choix de l'adsorbant doit être réalisé selon différents critères.

En effet, chacune des deux opérations, absorption et désorption, est liées de façon déterminante à la nature physico-chimique du liquide d'absorption employé avec des spécificités propres.

- Équilibre d'adsorption et transfert de matière,
- Équilibre de désorption et transfert de matière,

- Critères techniques de mise en œuvre,
- Critères de sécurité et économiques
- Non toxique et non moussant.

Une grande variété d'adsorbants permettant de réaliser l'analyse de COV est disponibles sur le marché : Tenax®, Carbopack®, Zéolithe®, etc.

Ils diffèrent par leur propriété chimique, leur composition, leur structure poreuse et leur surface.

a) Polarité

Les sorbants solides tels que Carboxen sont adaptés pour piéger des composés organiques très volatils ($\sim C_2-C_4$), tandis que Tenax sorbants piègent les COV moins volatils dans le souffle ($\sim C_7-C_{15}$) (146).

En outre, les adsorbants tels que Carboxen sont hydrophiles, ce qui retient l'humidité, et affecte négativement la capture quantitative de certains analytes. L'introduction d'une étape de purge à sec, en particulier lorsqu'on utilise un sorbant hydrophile, peut être une solution (147).

b) Nombre de couches

D'autres facteurs doivent être pris en considération, notamment l'utilisation de sorbants à une ou plusieurs couches (ou multi-lits), dont le choix dépendra des analytes d'intérêt investigués, ainsi que la quantité de sorbants utilisée.

Alors que les sorbants multi-lits peuvent piéger un plus grand nombre d'espèces chimiques, tant en termes de volatilité que de polarité, les interactions analyte-sorbant aux interfaces des lits tassés peuvent affecter la reproductibilité et donc la stabilité (148).

2.3.3.2. *Tubes de désorption thermique (TD)*

Les tubes TD sont très populaires dans la pré-concentration des COV et représentent près de la moitié des méthodes de pré-concentration publiés à ce jour.

Les absorbants peuvent être emballés manuellement dans les tubes ou les tubes peuvent être achetés pré-emballés auprès des fournisseurs. Les sorbants couramment utilisés comprennent Tenax TA & GR, Carbograph 5TD, Carboxen.

En raison des propriétés distinctes de ces matériaux, il existe une variabilité importante dans la gamme de substances volatiles qui peuvent être piégées, ainsi que la stabilité de l'interaction des composés sorbants.

Le volume de l'échantillon doit être pris en compte afin d'éviter la percée et la perte subséquente des analytes.

Lorsque l'haleine a été stockée temporairement dans des sacs en polymère par exemple, la capture de COV se fait en attachant une extrémité du tube TD au sac et l'autre extrémité à une pompe qui fonctionne pour tirer le souffle du sac à travers le sorbant.

Bien que l'utilisation de ces tubes TD contenant un sorbant soit déclarée très sensible, cela peut prendre beaucoup de temps.

Des préoccupations telles que la stabilité des COV piégés sur les matières adsorbantes, le stockage et la logistique sont à prendre en compte.

Alternativement, les tubes peuvent être temporairement stockés et envoyés aux laboratoires. Ce qui rend cette méthode de préconcentration facilement adaptable pour une utilisation en médecine clinique.

Une fois l'échantillon piégé, les composés sont désorbés thermiquement directement dans l'injecteur (TD).

a) Avantages

Il a été montré que ces tubes peuvent être conservés jusqu'à 2 semaines avant l'analyse, alors qu'une autre étude suggère un temps plus long (148).

Cette méthode est intéressante car elle minimise les artéfacts, les pertes et les contaminations et elle permet de diminuer la limite de détection (LOD). De plus, une automatisation complète simplifie son utilisation.

Cette technique a l'avantage de ne pas utiliser tout l'échantillon lors de l'analyse.

b) Inconvénients

Cependant, cette méthode est coûteuse car elle nécessite le couplage de l'injecteur à un appareillage spécifique. Il est aussi possible de désorber par solvant et d'injecter la solution par la suite.

Le signal du solvant est très intense et les manipulations de l'échantillon sont nombreuses. Ces dernières peuvent mener à des pertes, car il s'agit de composés volatils. De plus, la dilution due à l'extraction par solvant nécessite une plus grande concentration sur le piège que pour une TD. Ce qui entraîne une cadence d'échantillonnage plus lente.

Par ailleurs, il existe de nouveau système permettant une recapture partielle des composés volatils sur un deuxième piège. Markes International® commercialise ce type d'appareil sous le nom d'Unity 2 TDU.

En conclusion, la TD permet une meilleure répétabilité et une meilleure LOD, car il n'y a pas de dilution. Tout est injecté d'un coup dans la GC. La voie thermique est donc, en général, favorisée.

2.3.3.3. La micro extraction en phase solide (SPME)

Une autre technique d'échantillonnage pour les composés volatils est la micro extraction en phase solide (SPME).

Il s'agit d'une seringue en acier inoxydable contenant une aiguille creuse à l'intérieur de laquelle se trouve une tige de silice fondue recouverte de l'adsorbant. Les matériaux de revêtement comprennent entre autres le polydiméthylsiloxane (PDMS) et le polyacrylate (PA), entre autres (Tableau 15). Ces revêtements piègent les COV par des mécanismes d'absorption.

Comme pour les autres méthodes, la phase polymère absorbante et les conditions d'adsorption et désorption doivent être choisies en fonction de l'échantillon. La fibre peut soit être directement introduite dans l'échantillon, soit être exposée à l'espace de tête (Head pace).

Il ne s'agit pas d'une extraction totale, mais d'un équilibre qui se crée entre la matrice et le polymère, si les conditions sont maintenues constantes.

Tableau 15 Combinaisons courantes de revêtements SPME

COMBINAISONS D'ADSORBANTS	COMPOSES PIEGES
CAR / PDMS	Gaz et composés bas poids moléculaire
PDMS 65 MM / DVB	Composés volatils, les amines et les composés nitro-aromatiques
PA 85 MM	Composés semi-volatils polaires
PDMS 7 MM	Composés non polaires de haut poids moléculaire
PDMS 30 MM	Composés semi-volatils non polaires
CW	Alcools et les composés polaires
CAR : CARBOXEN / CW : CARBOWAX / DVB : DIVINYLBENZENE / PA : POLYACRYLA / PDMS : POLYDIMETHYLSILOXANE	

a) Avantages

La SPME est une méthode d'extraction sans solvant qui n'altère pas la structure de l'échantillon. Cette technique est avantageuse car elle ne nécessite pas d'appareillage spécifique comme des pompes calibrées et chaque fibre peut être employée une cinquantaine de fois.

La SPME n'est pas très affectée par la teneur élevée en humidité de l'échantillon et les étapes d'adsorption et de désorption peuvent être facilement automatisées.

SPME représente une alternative intéressante pour préconcentrer les composés volatils de l'haleine où la désorption est réalisée par chauffage direct dans l'entrée GC.

b) Inconvénients

Toutes les substances volatiles respiratoires ne peuvent pas être préconcentrées sur les fibres SPME actuellement disponibles sur le marché.

L'échantillonnage est généralement terminé lorsque l'équilibre est établi entre la fibre et l'échantillon, généralement rapide dans le cas d'analytes volatils. Le temps d'équilibre dépend de plusieurs facteurs dont le type de fibre, l'épaisseur, la longueur et le degré d'agitation.

Cette méthode a prouvé une sensibilité comparable aux tubes TD mais peut être limitée par la quantité de revêtement et l'épaisseur des fibres (149).

2.3.3.4. *Les pièges à aiguilles (NTD)*

La méthode vise à combiner les points forts de la SPME et des tubes TD, en réduisant les temps d'échantillonnage tout en conservant une sensibilité adéquate (150).

Les matériaux sorbants sont confinés dans un dispositif semblable à une aiguille et la respiration est aspirée à travers l'aiguille pour capturer les COV.

Comme pour les tubes TD, la sensibilité peut être améliorée en augmentant le volume d'échantillonnage (151).

Après chaque manœuvre, l'air collecté est transféré dans un tube de désorption recouvert de 3 matériaux absorbants : Tenax TA , noir de carbone graphitisé, tamis moléculaire carbonisé (Markes Int. TM) .

Le tube est ensuite scellé avec un bouchon DiffLocks (Marks Int. TM) pour une analyse ultérieure.

2.3.3.5. *Cryo focalisation directe*

Le principe de cette méthode est de faire passer l'échantillon d'air prélevé à travers une boucle immergée d'azote ou d'oxygène liquide afin de condenser les COV.

Le piège à froid est ensuite chauffé très rapidement de manière à diriger tous les composés volatils vers la colonne chromatographique dans un intervalle de temps très court.

2.4. ASPECT ANALYTIQUE DE L'ANALYSE DE L'AIR EXPIRE : IDENTIFICATION, DETECTION, ET PROFILAGE DES BIOMARQUEURS RESPIRATOIRES.

L'analyse du souffle a construit son fondement grâce à l'avancée scientifique dans la recherche du métabolome. L'une des approches métabolomiques les plus prometteuses est l'analyse des composés organiques volatils (COV), représentant un domaine émergent de la biochimie analytique, le volatilome.

De plus, la miniaturisation des méthodes chromatographiques, les progrès de l'électronique appliquées à la spectrométrie de masse et ceux de l'informatique ont permis, de développer de nouvelles technologies d'analyse biologique au cours des dernières années, dans le cadre de la surveillance des troubles métaboliques.

L'analyse respiratoire suscite un intérêt scientifique considérable du fait que l'échantillonnage respiratoire soit une technique non invasive, totalement indolore et non désagréable pour les patients (126).

L'étude des échantillons d'haleine humaine avec diverses méthodes d'analyse a montré une corrélation entre les profils de concentration des composés organiques volatils (COV) et la survenue de certaines maladies (121). Les instruments analytiques modernes permettent ainsi la détermination de nombreux composés présents dans l'haleine humaine, à des concentrations normales et anormales.

Néanmoins, à l'heure actuelle il s'agit d'un domaine peu exploité dans la pratique quotidienne. Le développement de techniques analytiques, aidant à la caractérisation d'échantillons gazeux les plus complexes, contribuera indiscutablement à la pleine progression de la pratique clinique en adéquation avec la recherche.

D'un point de vue méthodologique, une fois l'échantillonnage réalisé, plusieurs possibilités sont envisagées pour la séparation, la détection et le dosage des composés volatils présents présent dans le volume d'air collecté.

Pendant longtemps, l'un des principaux problèmes dans l'analyse des composés volatils fut la séparation et l'identification des substances. Cette phase était très laborieuse avant

l'aboutissement des techniques de chromatographie gazeuse entre les années 1980 et 1990 (62).

À l'heure actuelle, d'autres progrès considérables ont été réalisés en chimie analytique.

L'analyse instrumentale de biomarqueurs du souffle peut être divisée en deux sous-groupes.

- **Les méthodes classiques** qui utilisent la chromatographie en phase gazeuse (GC), généralement couplés avec la spectrométrie de masse (MS) : il s'agit de méthodes conventionnées et validées pour leur usage dans la pratique clinique.
- **Les méthodes non conventionnelles**, basées sur l'odorologie, surtout utilisées en recherche et développement, et faisant l'objet de plusieurs études pour démontrer leurs applicabilités en pratique clinique :
 - Utilisation des prédispositions olfactives des animaux,
 - Analyse électronique via l'utilisation de capteurs, sous la forme de « nez électroniques », ou eNose.

2.4.1. Méthodes conventionnelles d'analyse des COV

Il n'existe pas un seul choix de méthode pour l'analyse des COVs dans la respiration.

Les techniques de séparation et d'analyses doivent être définies en fonction de l'échantillon et de l'information que l'on souhaite obtenir.

Idéalement les recherches sur les biomarqueurs doivent reposer sur des méthodes analytiques qui offrent une sensibilité, une précision et une résolution élevées, en raison de leur faible concentration.

2.4.1.1. Méthode de séparation : Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (GC) est sans conteste la reine de la discipline, impliquée dans un grand nombre de méthodes analytiques, utilisée aussi bien en routine qu'en recherche et développement. La GC tire parti du haut pouvoir de résolution des colonnes capillaires

utilisées, de la disponibilité de détecteurs universels et de son couplage possible à la spectrométrie de masse (MS) (Figure 17).

Un chromatographe en phase gazeuse comporte trois parties: un injecteur, une colonne de séparation et un détecteur (152).

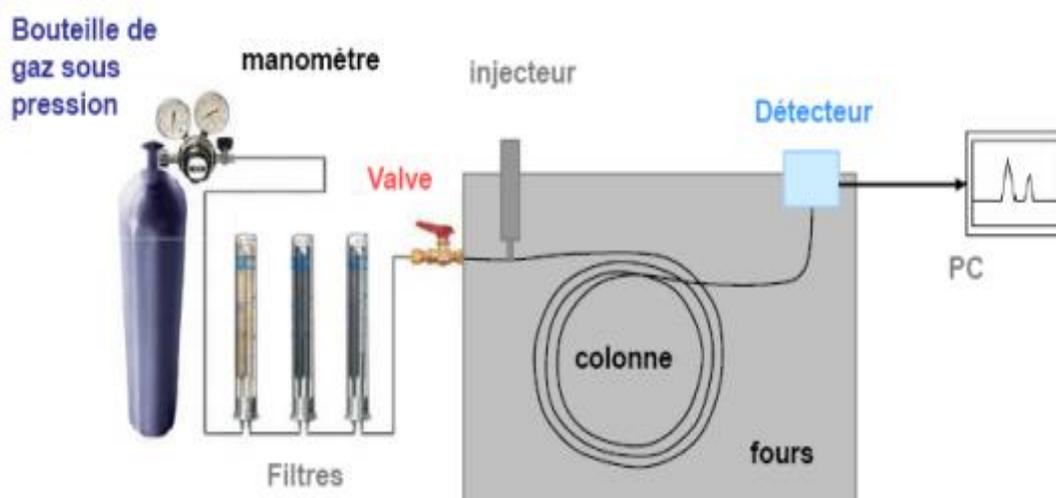


Figure 17 : Schéma d'une chromatographie en phase gazeuse

Après avoir introduit l'échantillon au moyen d'une micro-seringue *via* l'injecteur, la séparation des molécules s'effectue dans la colonne en fonction d'un gradient de température sous la pression d'une phase mobile, le gaz vecteur (azote ou hélium).

En 1969 et 1971, elle a permis à deux chercheurs, Jansson et Pauling (62) de détecter plus de 200 composés différents dans la respiration humaine, dont la quantité était de l'ordre du partie par million (ppm).

Il existe une grande variété de chromatographie en phase gazeuse. Ce qui va différencier une CG d'une autre sera la spécificité de sa phase stationnaire.

Une phase stationnaire est de qualité si elle présente une stabilité en cas de fortes température, une inertie totale vis-à-vis du soluté, ainsi qu'un facteur de rétention et un facteur de sélectivité situé dans la fourchette optimale des composés à séparer.

Phases en polymères siliconés

Ce sont les phases les plus répandues, elles sont dérivées du diméthyle polysiloxane.

Cette phase est greffée sur la colonne en silice par une liaison -O-Si-O-. La polarité de la chromatographie sera déterminée en fonction du nombre de groupement radical (R) par rapport aux groupes méthyles (CH₃), c'est ainsi que les propriétés d'une chromatographie peuvent varier :

- R= CH₃ : colonne complètement apolaire, séparation des produits suivant leur point d'ébullition (noms commerciaux : DB-1, OV101, SE-30...)
- R= Phényle à 5% : colonne la plus utilisée en CG, elle est répertoriée sous les noms commerciaux suivants : DB5, CPSil5, OV5...
- (R=-CH₂-CH₂-CH₂-CN) (ajout d'un substituant cyanopropyle) : colonne très polarisée (moment dipolaire du groupe -CN important). Ce sont les phases DB 1701, CPSil 18...

Phases à base de PEG (les wax)

Ce sont des phases beaucoup plus polaires.

Elles sont greffées sur les parois en silice de la colonne par l'intermédiaire d'une liaison Si-O-C.

Les dénominations commerciales de ces phases sont : Carbowax, DB-wax, CP wax 52. Ces phases sont utilisables entre 20° et 250°C, elles sont moins inertes que les phases siliconées, elles sont en particulier très sensibles à l'oxygène.

a) La chromatographie simple

Cette première technique consiste à injecter la substance à analyser sur la tête de la colonne chromatographique, pour ensuite passer à travers la colonne sous la pression continue d'une phase gazeuse inerte. Tout au long de son passage à travers la colonne, les différents constituants de l'analyte se séparent, dans un ordre dépendant en grande partie du matériau utilisé pour la colonne.

Les phases Silicones ont tendance à séparer les analytes selon le point d'ébullition alors que les phases polaires les séparent selon leurs polarités relatives (14).

Cette méthode est couramment couplée à la spectrométrie de masse (MS) afin d'identifier les espèces séparées.

À l'heure actuelle cette méthode est la procédure de référence pour l'identification des COV dans l'haleine humaine.

b) La chromatographie multicentrique

Ces dernières années, de nouvelles méthodes performantes ont vu le jour, comme les techniques chromatographiques multidimensionnelles (MDGC, GCxGC).

La GCxGC est une méthode étudiée et utilisée pour résoudre les problèmes liés à la complexité de certaines matrices. Elle commence à conquérir de plus en plus le secteur de l'analyse de composés volatils, principalement occupé par la GC simple.

L'avantage de la chromatographie est la possibilité de la coupler à différents détecteurs.

2.4.1.2. Méthodes de détection

Il existe deux types de détecteur :

- Les détecteurs universels,
- Les détecteurs spécifiques.

Les détecteurs universels présentent une sensibilité moyenne pour la plupart des composés organiques, alors que les détecteurs "spécifiques" donnent une réponse beaucoup plus intense pour certaines familles chimiques.

a) Détecteur universel

Le détecteur universel par excellence est celui à ionisation de flamme (FID en anglais). C'est un des détecteurs les plus utilisés.

i. Détecteur à ionisation de flamme FID

Les effluents à la sortie de la colonne sont brûlés dans une flamme alimentée par un mélange hydrogène-air. La combustion des composés organiques produit des ions qui sont collectés par

une électrode entourant la flamme. Ce courant de flamme est amplifié par un électromètre qui transforme le courant en tension puis cette tension est dirigée sur un enregistreur.

Ce détecteur est très sensible, car il offre une limite de détection de 2 à 4 pg. Il est linéaire. En revanche, il est discriminant, sa réponse varie suivant les produits injectés, ce qui impose un étalonnage si on veut analyser un mélange.

Le détecteur à ionisation de flamme ne donne aucune réponse avec les gaz les composés inorganiques et des corps très simples comme H₂O, NH₃, CO₂, H₂C=O...

b) Détecteurs spécifiques

i. Détecteur à capture d'électrons (ECD)

Considéré comme sélectif en raison de sa sensibilité importante vis-à-vis des dérivés halogénés. Il est composé d'une source radioactive, lui imposant une réglementation particulière. En règle générale utilisé dans l'analyse des pesticides chlorés et des polychlorures de biphényle.

ii. Détecteur thermo-ionique (NPD)

Détecteur spécifique sensible aux composés azotés (N) ou phosphorés (P).

iii. Détecteur à photo-ionisation (PID)

Ce détecteur est assez sélectif mais peu répandu, il convient aux hydrocarbures aromatiques, ainsi qu'aux dérivés contenant S ou P.

Lorsque le chromatogramme présente des pics rapprochés, des confusions de composés peuvent se produire. Pour y remédier, on peut associer plusieurs détecteurs complémentaires (153) (Figure 18).

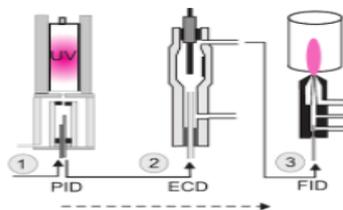


Figure 18 : Couplage de plusieurs détecteurs pour analyse chromatographique (108).

Même si la plupart des appareils utilisés sont fixes, il existe des GC portables avec des détecteurs PID, ECD ou FID permettant, par exemple, une analyse sur le terrain à partir de tige SPME.

2.4.1.3. Méthodes d'identification et de dosage

a) Spectrométrie de masse

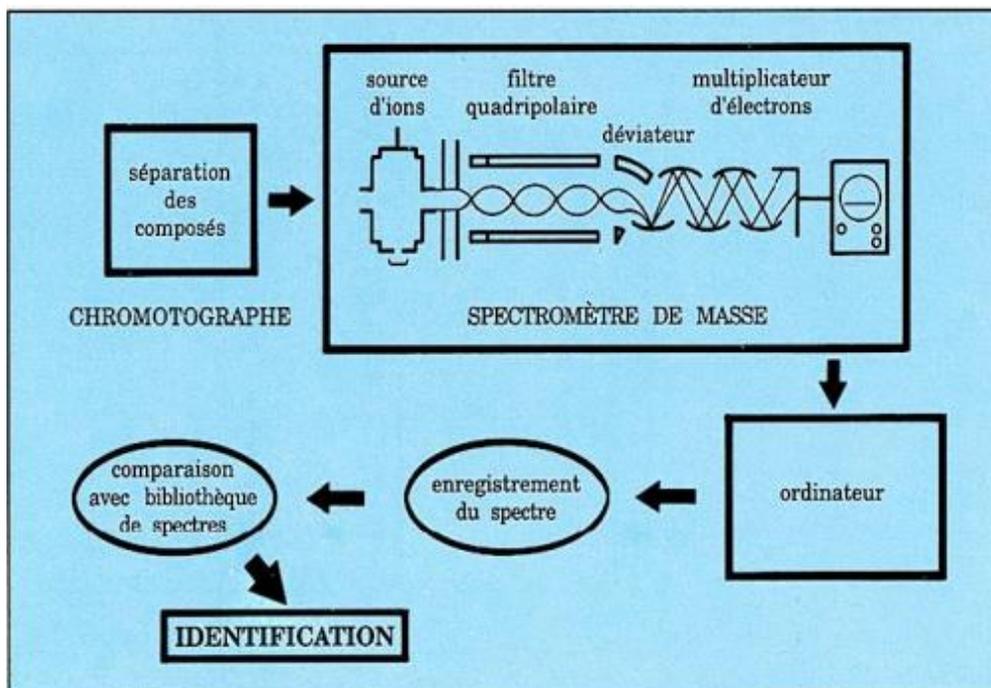


Figure 19 : principe de la spectrométrie de masse (108)

Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) (Figure 19).

Le jumelage de la spectrométrie de masse (MS) à la HPLC ou à la GC permet une identification structurale des composés.

Différentes techniques de spectrométrie de masse comme la spectrométrie de masse à réaction de transfert de protons (PTR-MS), la spectrométrie de masse à tubes à ions sélectionnés (SIFT-MS), la spectrométrie de mobilité ionique (IMS), permettent de réaliser des tests respiratoires en ligne.

b) Les différentes techniques couplées à la spectrométrie de masse

i. GC-MS spectrométrie de masse par chromatographie en phase gazeuse

L'utilisation d'un couplage GC-MS permet le dosage des différentes familles de composés compatibles avec la chromatographie en phase gazeuse en utilisant un seul solvant d'extraction (ex.: le dichlorométhane) et une seule séparation chromatographique. Les composés sortant du chromatographe sont fragmentés par un bombardement d'électrons. L'ensemble des ions détectés (masse/charge) constitue le spectre caractéristique de la molécule.

Les spectres sont ensuite exploités informatiquement. Ce détecteur est très performant car il permet une identification des molécules même en cas de mauvaise séparation sur la colonne, d'où l'intérêt de la spectrométrie de masse par rapport aux détecteurs spécifiques.

ii. SIFT / MS

La spectrométrie de masse à tube à écoulement ionique (SIFT-MS) est une forme de spectrométrie de masse directe qui analyse les composés organiques volatils (COV), qui offre des limites de détection de l'ordre du partie par billion (pptv). L'analyse quantitative en temps réel est réalisée en appliquant une ionisation chimique douce contrôlée à l'aide de huit agents d'ionisation chimique (ions réactifs) : H_3O^+ , NO^+ , O_2^+ , O^- , O_2^- , OH^- , NO_2^- et NO_3^- , qui réagissent avec les COV de l'échantillon et les gaz inorganiques et non avec les composants majeurs de l'air (N_2 , O_2 et Ar).

Ceci permet à SIFT-MS d'analyser l'air aux niveaux de traces et d'ultra-traces sans préparation de l'échantillon, la pré-concentration et la chromatographie préalable (154).

iii. PTR / MS

Technique SM constitué d'une source d'ions directement connectée à un tube de dérive (contrairement à SIFT-MS, aucun filtre de masse n'est interconnecté) et d'un système d'analyse par spectromètre de masse à temps de vol. Les instruments PTR-MS disponibles dans le commerce ont un temps de réponse très rapide et atteignent une limite de détection dans l'ordre du pptv (155). Cette technique présente l'avantage de ne pas avoir recours à une

préconcentration ni une séparation par GC préalable de l'échantillon, ce qui permet une analyse en temps réel (156).

iv. PTR-TFMS

Innovation récente qui combine la spectrométrie de masse à temps de vol avec le réacteur à transfert de protons. A l'avantage de fournir une plus grande résolution dans le spectromètre de masse analytique et permet la séparation des molécules isobariques protonées.

v. IMMS

Les procédés d'analyses des COV utilisant la mobilité ionique (IMS) font de plus en plus leur apparition dans les domaines de l'analyse d'haleine ou d'urine dans un cadre médical. .

IMS peut être intégré à une MS (IMMS), permettant un complément de leur performances respectives, et ainsi améliorer la précision et l'efficacité. Cette combinaison en fait un outil d'analyse puissant pour identifier la structure moléculaire et la séparation des échantillons complexes que la MS seule peut ne pas être en mesure de distinguer. Cette technique est intéressante en raison de la diminution de l'influence de l'humidité sur l'IMS.

vi. VPM-MS

Technique capable d'analyser des concentrations d'analytes aussi faibles que quelques pptv. Cela repose sur la protonation d'espèces chimiques, provenant d'un transfert de l'eau protonée. La technique est particulièrement avantageuse pour l'analyse d'haleine car l'eau n'interfère pas avec la mesure.

Comme la MS, l'identification des espèces se fait uniquement sur un rapport m/e , ce qui signifie que la masse de recouvrement est possible lorsque la fragmentation se produit. Pour une précision accrue, la VPM-MS est généralement couplée avec la GC pour une meilleure séparation (20).

vii. SESI-MS

La technique d'ionisation par électronébulisation (SESI en anglais : Secondary electrospray ionisation), a été découverte en 1988 et utilisée dès le milieu des années 1990, elle a conduit au développement de médicaments appelés inhibiteurs de protéase, sauvant la vie des personnes atteintes de sida. L'avantage de l'électronébulisation est la vitesse à laquelle elle peut analyser les préparations pharmaceutiques complexes (qui consistent principalement en de grandes macromolécules biologiques). Les chercheurs de l'étude « Breath » ont utilisé la technique SESI-MS pour surveiller les métabolites de l'haleine auprès d'un groupe témoin en bonne santé sur plusieurs mois ; il en est ressorti que chaque personne possède sa propre « signature respiratoire » caractéristique.

Tableau 16 : comparaison des caractéristiques des techniques de recherche de souffle disponible

Analytical Method	Mode of operation	Limit of detection (LOD)	Sensitivity	Specificity
SIFT-MS	Direct/Real time	ppbv	High	High
PTR-MS	Direct/Real time	pptv	High	Medium-High
IMS	Real-time	ppbv	Medium	Medium
Sensor arrays	Reference to a database	ppbv	Medium	Medium
GC-MS	Pre-concentration	pptv-ppbv	Very-high	Very-high
LAS	Real-time	ppbv	High	High

Comparer à d'autres techniques disponibles, les techniques analytiques en ligne et en temps réel SIFT-MS et PTR-MS présentent une limite de détection allant de ppbv à pptv, ce qui les rend idéales pour l'analyse de la respiration (Tableau 16, Tableau 17) (157).

Tableau 17 : Sensibilité des méthodes d'analyse disponibles pour les tests d'haleine (61)

méthodes analytiques	Mode de fonctionnement / temps	Composés typiques	Limite de détection (LOD)
GC / MS	Préconcentration ~ 30 min	Hydrocarbures	pptv-ppbv
		Aldéhydes	pptv-ppbv
		Sulfures	pptv-ppbv
SIFT-MS	Direct	Ammoniac	ppbv
	Temps réel (MIM)	Ethanol	ppbv
	Secondes-min (FS)		
La mobilité des ions	Colonne pré-multi-capillaire: minutes	Ammoniac	ppbv
		Acétone	ppbv
		Isoprène	ppbv
Laser	Direct	Éthane	pptv
	Temps réel	COS	pptv-ppbv
		CO	pptv
PTR-MS	Direct	Isoprène	pptv
	Temps réel	Composés aromatiques	pptv
Capteur	Direct, temps réel	NON	ppt-ppbv
Réseaux de capteurs	Préconcentration	Différents COV	ppbv

L'analyse de la respiration nécessite des méthodes élaborées d'analyse des données, y compris des méthodes statistiques multivariées, permettant de montrer les différences statistiquement significatives entre deux groupes (sain / malade).

En outre, il n'existe pas de convention entre les études quant à l'analyse des COV.

Malgré ces faits, les techniques analytiques de spectrométrie de masse se sont avérées adaptées au défi et conviennent bien à la fois à la découverte de biomarqueurs et au profilage spectral entier (158).

2.4.2. Méthodes non conventionnelles de l'analyse des COV, basées sur l'odorologie

2.4.2.1. Généralités

a) Physiologie de l'olfaction

Le sens de l'odorat dépend de la capacité des cellules sensorielles spécialisées du nez de l'être vivant lorsqu'il perçoit des composés volatils.

L'être humain possède, avec la plupart des espèces animales, trois sens distincts qui opèrent une analyse chimiosensorielle de l'environnement. Il s'agit du goût, de l'odorat et du système voméronasal capable de décoder les odeurs de certaines substances non volatiles.

De ces trois sens, l'odorat est de loin le plus performant. Bien que l'odorat humain soit moins développé que celui d'autres mammifères comme le chien, capable de percevoir jusqu'à 10 000 odeurs différentes, celle d'un parfumeur lui permet d'en mémoriser facilement deux à trois mille (159).

L'appareil olfactif fonctionne comme un détecteur moléculaire, doté d'un pouvoir de séparation et d'une extrême sensibilité.

Ces qualités de précision, qui apparaissent très tôt dans l'évolution des espèces et s'y maintiennent en grande partie, expliquent le rôle majeur joué par l'olfaction dans les comportements animaux. Chez les invertébrés et la plupart des vertébrés, y compris les mammifères, l'organe olfactif constitue le système sensoriel prépondérant de la sélection et du contrôle qualitatif des aliments. A ce titre, il est indispensable à la survie du sujet et de son espèce. Chez l'homme, il contribue à la formation du goût alimentaire, qui change selon les aires géographiques et les époques historiques.

L'odorat exerce un rôle de contrôle et de prévention purement biologique. Le dégoût de la pourriture est inné, l'odeur nous avertit d'une nourriture avariée avant que nous ne prenions le risque de l'absorber (159).

Physiologiquement, une odeur est une sensation générée lorsqu'une molécule odorante gazeuse interagit avec un récepteur sur un cil situé sur un neurone olfactif du nez humain.

Les chercheurs ont d'abord pensé qu'il s'agissait d'un schéma clé serrure où pour chaque odeur il existait une molécule et un récepteur spécifique. La réalité est beaucoup plus complexe.

L'odeur perçue est, en fait, le résultat d'une combinaison spécifique d'interactions des molécules odorantes inhalées sur les récepteurs olfactifs. Chaque neurone ne porte qu'un seul type de récepteurs en revanche une même molécule odorante peut se fixer sur différents récepteurs.

Les récepteurs olfactifs peuvent être extrêmement spécifiques : par exemple seul l'isomère R du limonène sent l'agrumes ou encore certains composés ont une odeur très différente en fonction de leur concentration. Grâce à la découverte de Linda Buck et Richard Axel qui ont identifié une nouvelle famille de gènes correspondant aux récepteurs olfactifs en 1991, un regain d'intérêt pour la physiologie de l'olfaction est apparu (160).

b) Odeur et mémoire

Les raisons pour lesquelles l'odorat est considéré comme le sens de la mémoire s'expliquent par le fait que tous deux sont tributaires du système limbique. Les mécanismes neuronaux établis dans le cerveau primitif par l'odorat se répercutent dans d'autres zones et se retrouvent aux niveaux les plus élevés de l'activité cérébrale.

Ce travail de mémorisation est de plus en plus développé et exploité dans la formation d'animaux entraînés pour mémoriser des odeurs en lien avec des maladies.

Outre les animaux entraînés, la détection des odeurs par des nez électroniques (e-nez) est également en cours de développement. Ces dispositifs peuvent identifier les profils d'odeur spécifiques des maladies à travers les COV. Bien que les résultats de la recherche dans le domaine du diagnostic des odeurs soient prometteurs, la communauté médicale demeure largement sceptique.

Il existe plusieurs études pour lesquelles les animaux et les eNose ont été utilisés comme outil de diagnostic de différents types de cancer (Tableau 18).

Tableau 18 Caractéristiques des études clés de détection des odeurs par des chiens ou des nez électroniques (161)

Cancer	Type de nez	type de sensibilité échantillon / spécificité	(95% CI lorsqu'ils sont disponibles) ou taux taille de l'échantillon de réussite (malade / santé)	
Poumon ¹	Chien	Souffle	71% (51-88%) / 93% (87-98%)	60/160
Poumon ²	Enose	Souffle	71% / 100%	65/31
Poumon ³	Enose	Souffle	85% / 100%	56/36
Poumon ⁴	Enose	Souffle	94% de réussite	35/25
Poumon ¹¹	Enose	Souffle	71% (42-92%) / 92% (82-97%)	14/62
ovaire ¹³	Chien	Tissu et le sang	Tissu: 99% / 97% de sang: 100% / 98%	40/200
ovaire ¹⁴	Enose	Tissu	84% / 87%	15/15
Sein ¹⁷	Chien	Souffle	88% (75-100%) / 98% (90-99%)	6/17
Sein ¹⁸	Enose	Souffle	94% / 74%	51/147
Sein ¹⁸	Enose	Souffle	75% / 85%	54/204
Vessie ¹⁹	Chien	Urine	41% de réussite (23-58% de)	9/54
Vessie ²⁰	Enose	Urine	100% / 100%	25/18
colorectaux ²¹	Chien	Souffle et les matières fécales	Breath: 91% / 99% Fèces: 97% / 99%	Breath: 33/132 Fèces: 37/148
Mélanome ²⁶	Chien	Tissu	taux de réussite 75-88% de	7/98
Mélanome ²⁷	Enose	Tissu	70% / 90%	10/47

2.4.2.2. Utilisation des capacités olfactives des animaux et des insectes

Outre les méthodes instrumentales typiques utilisées pour l'analyse des COV, étudiées dans le chapitre précédent, d'autres méthodes non conventionnelles comme le sens de l'odorat des animaux peut être utilisées.

Ce moyen de détection s'est révélé attrayant depuis la fin des années 1980, lorsqu'un phénomène anecdotique a fait parler de lui dans la communauté médicale. En 1989, la revue britannique, *The Lancet*, rapporte le cas d'un chien qui reniflait constamment un grain de beauté sur la jambe de sa maîtresse.

Alertée par le comportement de son chien et après une tentative de morsure par ce dernier, la maîtresse a jugé bon de consulter son dermatologue. Après examens, il s'est avéré qu'il s'agissait d'un mélanome malin, à un stade précoce (162,163). C'est à partir de ce moment que l'hypothèse d'une odeur spécifique du cancer a été évoquée, et plusieurs études ont cherchées à confirmer la détection des odeurs par les animaux comme potentiel outil de diagnostic.

a) Les chiens

i. Particularités

En raison des qualités olfactives très développées, les chiens ont été mis au service de l'homme à travers des utilisations de recherches très diversifiées :

- Recherche d'explosifs,
- Recherche de stupéfiants,
- Recherche d'odeurs de gaz,
- Recherche de personnes, ...

La littérature suggère que la détection olfactive canine de la malignité peut avoir un potentiel, à la fois en termes d'application dans la pratique clinique contemporaine et de voie de recherches futures.

En 1989, Williams et ses collègues ont présenté la première hypothèse suggérant que les chiens peuvent être en mesure de détecter des tumeurs malignes par l'odeur (163).

En effet, chez les chiens, l'odorat est le sens le plus développé (10000 fois plus que chez l'homme). Les cellules cérébrales qui s'affairent au décryptage olfactif sont 40 fois plus nombreuses chez le chien que chez l'homme (164). De plus, la surface de la muqueuse olfactive canine mesure 150 cm³ contre 3 cm³ chez l'homme (165).

- Seuil de détection

Le seuil de détection est très faible chez le chien, et varie en fonction de la substance odorante et de l'apprentissage. Le chien est capable de détecter une concentration de composant volatile organique de moins de 0,001 particule par million (166). Il a besoin d'un très faible nombre de molécules odorantes pour déceler une odeur.

- Acuité olfactive et race

L'acuité olfactive varie selon la race du chien. Elle est tributaire de la surface de la muqueuse olfactive, du nombre de récepteurs, de leur sensibilité et de l'anatomie qui va modifier le courant

aérien (167). Par exemple, un Berger Allemand possède 200 millions de récepteurs tandis qu'un Fox Terrier en possède 147 millions, un Teckel en possède 125 millions et un Bouledogue 100 millions (168).

- Acuité olfactive et sexe du chien

Les femelles possèdent un odorat plus développé que celui des mâles (169). Cette acuité est liée à l'imprégnation œstrogénique et est dépendante du cycle sexuel. Leurs performances est maximale au moment de l'ovulation. Cependant, les femelles en chaleur occasionnent souvent des nuisances au chenil, en étant la source de conflit entre les mâles, ce qui entraîne souvent une stérilisation de ces dernières pour optimiser le travail. Chez les mâles, l'acuité olfactive diminue après castration (168).

- Acuité olfactive et âge

C'est un facteur de faiblesse olfactive. Avec l'âge, la muqueuse nasale va s'atrophier, l'hydratation tissulaire va être perturbée et l'innervation va être altérée. Tout cela va entraîner à terme une défaillance du système olfactif.

- Acuité olfactive et alimentation

L'olfaction joue un rôle fondamental dans le comportement alimentaire. Il est couramment répandu que la sensation de faim augmente l'acuité olfactive, alors que la sensation de satiété la diminue.

- Acuité olfactive et condition physique

L'influence de la condition physique sur l'acuité olfactive a été étudiée, et les résultats indiquent une forte diminution de la capacité olfactive chez les chiens n'ayant pas d'entraînement physique régulier. Ainsi, l'absence de conditionnement physique aboutit à une forte diminution de l'acuité olfactive lors de périodes d'effort intense et stressant.

ii. Détection de cancers par les chiens

Depuis une dizaine d'années, plusieurs études ont montré que des chiens peuvent détecter « l'odeur du cancer » et déceler des cellules cancéreuses chez l'homme.

Cette hypothèse a depuis été étudiée par plusieurs équipes à travers le monde. Et ces tests ont été couronnés de succès.

Les études réalisées montrent une fiabilité dans 88 à 100 % des cas, selon le type de cancer.

Limitée aux cancers urologiques, cette méthode de diagnostic a ensuite fait ses preuves pour des tumeurs affectant les voies aériennes, des chiens entraînés ayant été capables d'identifier l'haleine de patients atteints d'un cancer du poumon.

Cancer de la vessie

La reconnaissance du cancer par l'odorat canin a été pour la première fois attesté en 2004 lors de la publication d'une étude portant sur le diagnostic du cancer de la vessie (170). Après six mois de dressage, quatre chiens ont pu détecter les tumeurs à partir des urines dans 41% des cas. Un résultat significatif par rapport aux 14% de reconnaissance par le hasard.

Cancer du sein

Des scientifiques de l'Institut Curie (Paris) viennent de présenter de nouveaux résultats confirmant sa fiabilité dans le dépistage du cancer du sein (171).

À l'Institut Curie, les tests de dépistage du cancer du sein se déroulent à l'aide de lingettes préalablement portées au niveau du sein par des patientes, qui sont ensuite envoyées à un centre agréé où les chiens les analysent. En cas de dépistage positif (lorsque le chien s'arrête devant l'échantillon), la patiente est prise en charge pour des examens d'imagerie complémentaires (172).

Lors de cette étude préliminaire menée à l'Institut Curie, les chiens ont réussi à détecter le cancer du sein chez 100% des 31 patientes testées. À titre de comparaison, la mammographie donne des résultats sûrs dans 95 à 98 % des cas.

Afin de valider leurs résultats, les chercheurs de l'Institut Curie se sont lancés dans une nouvelle étude qui concernera 1000 femmes recrutées dans sept centres français : six en Île-de-France, dont l'Institut Curie, et le CHU de Nantes. Premiers résultats attendus pour 2021 (171).

Cancer du poumon

Des travaux américains ont mis en évidence que les chiens peuvent détecter correctement le cancer du poumon dans l'haleine chez 99 % des patients (173). Les auteurs ont utilisé une méthode basée sur la récompense alimentaire pour former 5 chiens domestiques. La sensibilité globale de la détection canine par rapport au diagnostic conventionnel confirmé par biopsie était de 99%.

Cancer de la prostate

À Paris, l'équipe du Pr Olivier Cussenot, en collaboration avec les services cynophiles de l'armée, a conclu, à une fiabilité de 98 % dans le cas du cancer de la prostate, dépisté dans l'urine.

En 2010, une équipe française de l'hôpital Tenon (AP-HP, Paris) a, pour sa part, rapporté une sensibilité et une spécificité de 91% pour la détection du cancer de la prostate par un chien de l'armée française, un berger malinois, spécialement dressé (174). Là encore, les tests ont été effectués sur de l'urine.

Taverna et al., en 2015, ont démontré qu'une olfaction canine entraînée peut détecter des composés volatiles spécifiques du cancer de la prostate dans des échantillons d'urine avec une sensibilité et une spécificité élevée (respectivement 98,6% et 96,4%). La détection d'un cancer de la prostate par les chiens est indépendante du volume et de l'agressivité de la tumeur.

Pour le cancer de la prostate, même si les tests des antigènes spécifiques de la prostate (APS) augmentés marquent la détection de cancer de la prostate, le principal inconvénient est son manque de spécificité et de précision. En effet, de fortes valeurs d'APS peuvent être détectées chez des hommes présentant des lésions bénignes. De ce fait, de nombreux hommes doivent subir des biopsies, procédures invasives, de précisions assez faibles et engendrant des complications telles que des douleurs, des hématuries, des rétentions urinaires, un dysfonctionnement érectile, des saignements rectaux, des hémospérmies et des complications

plus sévères telles que des fistules rectales ou urétrales, des gangrènes ou des sepsis. Une quantité minimale de composé volatile spécifique du cancer de la prostate peut être détectée, indépendamment de la taille de la tumeur.

Cancer du col de l'utérus

En janvier 2017, une équipe mexicaine a entraîné un Beagle à la détection du cancer du col de l'utérus (CC) (Figure 20). Ils ont noté au cours de leur expérience une capacité impressionnante de discrimination des odeurs CC et non-CC sur des sécrétions vaginales du chien, avec des valeurs de spécificité et de sensibilité de plus de 90% (175).

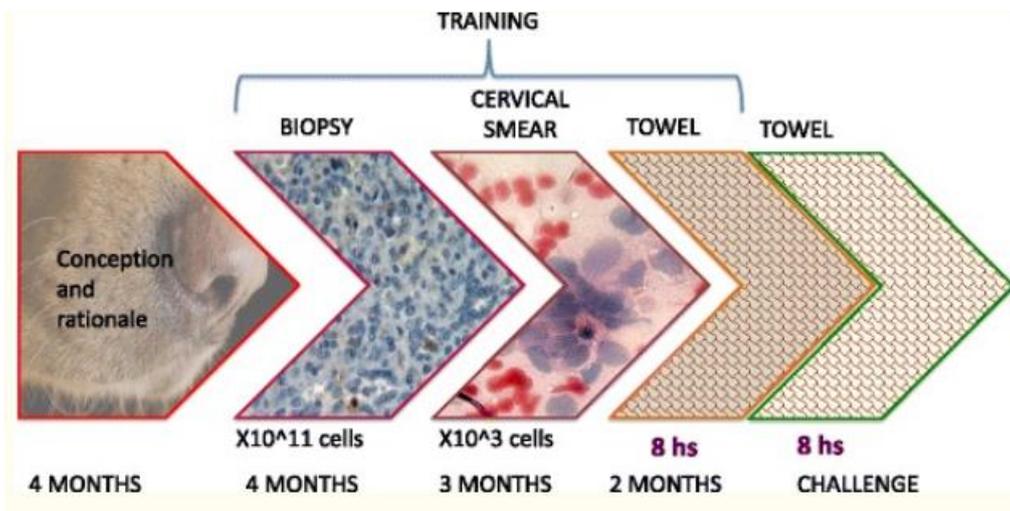


Figure 20 : Temps d'entraînement nécessaire pour la détection du cancer du col de l'utérus dans les sécrétions vaginales dans l'étude de Guerrero-Flores et al..

Cancer de la thyroïde

Après les cancers de la vessie, de la prostate ou du poumon, c'est au tour du cancer de la thyroïde d'être diagnostiqué efficacement à partir d'un échantillon d'urine, à l'aide d'un chien spécialement entraîné. Ces résultats ont été présentés en mars 2015, à San Diego (Etats-Unis), lors du congrès de l'Endocrine Society (ENDO 2015) (176).

Cette nouvelle étude suggère la présence dans les urines de composés organiques volatils propre à un cancer non urologique.

Après six mois de dressage, le berger allemand s'est montré capable de distinguer la signature olfactive du carcinome papillaire métastatique de la thyroïde en comparaison d'une pathologie thyroïdienne bénigne, à partir du flairage des urines, avec une sensibilité de 87% et une spécificité de 90%.

Les investigateurs ont recueilli 59 échantillons d'urine de patients se présentant en consultation dans un centre spécialisé. Tous avaient au moins un nodule susceptible d'être cancéreux. Les résultats présentés portent sur 15 carcinomes métastatiques thyroïdiens et 19 nodules bénins dont le diagnostic a été confirmé.

Les chercheurs en charge de cette étude, espèrent également identifier les composés odorants volatils, caractéristiques des cellules du cancer de la thyroïde. Les biomarqueurs ainsi mis en évidence permettraient de développer des nez électroniques comme outil de diagnostic.

iii. Procédé de dressage

Les chiens qui participent aux études suivent un entraînement rigoureux et tout à fait spécifique.

Par exemple, les deux malinois du test de l'Institut Curie ont été dressés pendant six mois pour repérer l'odeur du cancer du sein.

Le berger allemand dressé pour l'étude du cancer de la thyroïde a été recruté à l'âge de sept ans. Il était chien sauveteur (dressé pour la détection des corps humains). Il a donc suivi un tout autre apprentissage dans le but de différencier la signature olfactive des cellules cancéreuses de la thyroïde de celle associée à des nodules bénins.

Pendant un peu plus de six mois, l'animal a été mis en contact avec des échantillons d'urine, mais aussi de sang et de tissus de la glande thyroïde elle-même, prélevés sur des patients atteints d'un cancer papillaire (80% des cancers de la thyroïde).

Il a ensuite été dressé à se coucher face à l'échantillon d'urine d'un patient atteint du cancer et à rester assis lorsque l'échantillon provenait d'un patient ayant une pathologie bénigne de la thyroïde.

Après cet entraînement, 34 prélèvements d'urine ont donc été présentés à l'animal. Dans 30 cas sur 34, le comportement du chien s'est accordé avec celui de la biopsie

Selon les études, plusieurs méthodologies d'entraînement ont été pratiquées. Le tableau ci-dessous récapitule certaines d'entre elles (Tableau 19).

Tableau 19 : Méthodes d'entraînements et marquages utilisés dans des études sur la détection de cancer par le chien.(168)

Publication	Méthode de formation	Type de marquage	Récompense
PICKEL <i>et al.</i> (2004)	Conditionnement opérant	S'asseoir à côté du compartiment et poser la patte sur l'ouverture du compartiment pour le chien A ou mettre dans la bouche l'ouverture du compartiment pour le chien B	Non renseignée
WILLIS <i>et al.</i> (2004)	Clicker Training Method	Se coucher	Jeux
MCCULLOCH <i>et al.</i> (2006)	Clicker Training Method	S'asseoir ou se coucher devant l'échantillon	Alimentaire
EHMANN <i>et al.</i> (2012)	Reward based approach	Se coucher devant le tube avec le museau touchant le tube	Non renseignée
TAVERNA <i>et al.</i> (2015)	Clicker Training Method	S'asseoir	Non renseignée
CORNU <i>et al.</i> (2011)	Clicker Training Method	S'asseoir	Jeux
HORVATH <i>et al.</i>(2008)	Non renseignée	Gratter avec l'antérieur gauche et se coucher	Echantillon d'intérêt enlevé pour éveiller le comportement chasseur du chien
HORVATH <i>et al.</i> (2010)	Non renseignée	Gratter avec l'antérieur gauche	Non renseignée

iv. Avantages

Le coût

L'entraînement des chiens est relativement simple et peu onéreux comparativement aux équipements d'analyses (chromatographe et spectrophotomètre). De plus, la sensibilité et la spécificité sont bonnes (respectivement 72% et 93%) (177) et facilement interprétables. Dans certains pays où les patients n'ont pas accès aux outils diagnostiques (scanner, mammographie), la détection par les chiens apparaît comme un outil de dépistage à perspectives humanitaires.

La rapidité

Le chien est présenté directement au contact des échantillons prélevés sur les patients (urine, air exhalé, lingette mise au contact du sein). S'il détecte des effluves cancéreux, il adoptera le comportement qu'il a appris. Le diagnostic serait ainsi obtenu en quelques minutes diminuant ainsi l'attente anxiogène de l'interprétation des scanners, radiographies, échographies ou des résultats d'anatomo-pathologie.

D'autre part, il n'y a pas besoin de préconcentration d'analytes avant l'analyse, contrairement à la plupart des méthodes conventionnelles.

L'innocuité et la non invasivité

Contact des chiens dans la plupart des cas via les échantillons. Pas de contact direct.

Alternative lorsque les outils actuels ne sont pas adaptés

Par ailleurs la détection par le chien est intéressante car elle peut s'appliquer à des personnes à mobilité réduite, où qu'elles se trouvent, ce qui n'est pas toujours le cas des techniques de dépistage classiques. Les appareils de mammographie qui sont adaptés aux patientes en chaise roulante sont essentiellement disponibles dans les grandes villes.

La détection des cancers par les chiens pourrait s'avérer fort utile dans les lieux reculés ou pour les personnes ne pouvant pas ou ne voulant pas bénéficier des techniques d'imagerie. Néanmoins, l'imagerie restera toujours nécessaire pour confirmer le diagnostic, localiser précisément la tumeur, permettre des prélèvements, etc.

Les chiens dressés pourraient être utilisés dans des régions isolées ou défavorisées, là où les méthodes conventionnelles de dépistage s'appuyant sur une biopsie et une échographie sont moins accessibles, voire inexistantes.

Les chercheurs souhaitent désormais aller plus loin en intégrant le chien dans le suivi des patients après traitement chirurgical, afin de détecter les éventuelles récurrences. Des évaluations sont en cours pour déterminer l'efficacité de la méthode dans cette indication.

v. Limites

Compatibilité selon la race

La capacité olfactive du chien est dépendante de la race du chien et de sa génétique, notamment du polymorphisme des récepteurs.

Résultats aléatoires

La méthode d'entraînement va influencer par sa durée, le contact avec le maître, le mode de récompense, la répétition des examens, l'entretien de la mémoire du chien.

Temps de dressage et durée d'activité

Le dressage de l'animal est long, astreignant.

Durée d'exercice limitée : ne peut exercer pendant plus de 5 ans.

Un fait observé au cours d'une étude menée par Horvath et al, en 2008, à savoir l'absence de réaction par le chien entraîné face à des tissus graisseux appartenant à des patients préalablement détectés par ces mêmes chiens et dont les tumeurs avaient été enlevés, permet de suggérer qu'une odeur corporelle générale liée au cancer n'existait pas (178).

Ce mode de détection apparaît donc comme une avancée dans la prise en charge de certains cancers, non seulement pour le diagnostic, mais aussi pour mettre en évidence une rémission du cancer après une chirurgie.

b) Les insectes

L'utilisation des insectes est attrayante dans le cadre de la détection des odeurs biologiques, et ceci à plusieurs égards.

Les insectes présentent des capacités olfactives remarquables, notamment grâce à leurs antennes spécialement conçues pour l'odorat.

En effet, ils possèdent pour la plupart un réseau de capteurs olfactifs accordables les uns avec les autres, le long de leurs antennes, leur permettant d'intégrer et d'interpréter un signal *via* le lobe olfactif de l'insecte (Photo 4).

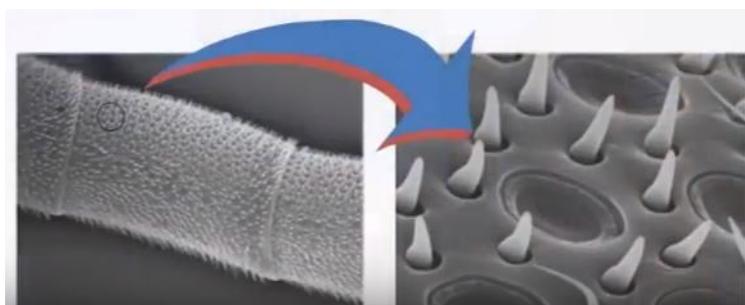


Photo 4 : Antenne vue microscopique

i. Le PER des insectes ou reflexe de Pavlov

Le réflexe d'extension du proboscis ou Proboscis Extension Reflex (PER) d'un insecte est un réflexe de stimulation antennaire qui se traduit par l'extension d'une sorte de trompe étirable (179), en réponse à une stimulation gustative.

C'est le cas pour une abeille ou une mouche qui sort « sa langue » en contact d'une solution de sucre.

ii. Avantages de l'utilisation des insectes en odorologie

Les insectes ont un niveau élevé de sensibilité et peuvent fournir une réponse instantanée à un stimuli. De plus, leur production de masse peut être rapide grâce à leur fort taux de reproduction.

L'avantage considérable est sans doute la rapidité de leur entraînement. Contrairement aux chiens, certains insectes étudiés, comme les abeilles, n'ont besoin que de quelques minutes pour s'entraîner et intégrer un exercice.

Le coût est là aussi un aspect plus avantageux chez les insectes en comparaison à l'utilisation des chiens. En effet, il n'y a ici pas de frais de soins vétérinaire ou de chenil.

c) Abeilles

Alors que les pesticides les menacent d'une disparition tragique, l'utilisation des abeilles, principalement les abeilles mellifères et les bourdons, comme sentinelles et biocapteurs est intéressante car elles sont capables d'identifier à 98% certaines molécules cancérigènes et de livrer un diagnostic en quelques instants.

Dotées d'un odorat inouï, elles sont également utilisées dans les aéroports pour repérer les explosifs (180).

Au cours des deux dernières décennies, de grands progrès ont été réalisés dans les méthodes et les instrumentations permettant d'étudier le comportement de recherche des abeilles et de comprendre leurs signaux chimiques de communication.

Les abeilles peuvent être formées pour la détection d'une multitude de produits chimiques, qui plus est, lorsqu'elles sont associées à de nouvelles technologies de suivi et de cartographie, créent un potentiel de recherche conséquent.

Plusieurs marchés potentiels :

- Diagnostic médical
- Application militaire / de sécurité
- Contrebande
- La qualité de la nourriture (la maturité, les saveurs off, les souillures)
- L'authenticité des produits de consommation, etc.

Les études en laboratoire ont confirmé que les abeilles sont au moins aussi bonnes que les chiens renifleurs, pour une large gamme de substances odorantes de l'ordre du partie par billion.

i. Particularités

Leur système olfactif est dix millions de fois plus intense que celui d'un humain. La recherche scientifique a démontré que les abeilles ont un sens de l'odorat extraordinairement aigu.

Dans leur environnement naturel, les abeilles utilisent la reconnaissance des odeurs pour communiquer, percevoir les phéromones, les toxines.

ii. Danse des abeilles

La danse des abeilles est un terme utilisé en apiculture et en éthologie pour désigner un système de communication animale par lequel des abeilles butineuses ou exploratrices (en moyenne 5 à 25 % des butineuses qui sont les plus âgées, les plus expérimentées, les autres étant des réceptrices attendant le signal de l'éclaireuse) transmettent aux réceptrices restées dans la colonie la distance et la direction de la source de nourriture où elles peuvent obtenir le nectar et le pollen des fleurs nécessaires à la production de miel.

Au cours de ces danses, elles émettent avec les ailes un son particulier et transmettent l'odeur du nectar dont elles veulent communiquer leur position. Les réceptrices restent en contact avec la danseuse. Ces danses exécutées sur les rayons d'alvéoles sont d'autant plus vives, et de longue durée, que le nectar est abondant et riche en sucre, renseignant également sur les plantes qui cessent d'être productives et sur celles qui le deviennent. Alertées, les abeilles jusque-là inactives s'envolent à la recherche de cette nourriture.

Grâce à ces mécanismes de communication, les colonies peuvent s'adapter et localiser efficacement les sources de nourriture disponibles.

iii. Avantages

Les abeilles sont l'une des plateformes de détection les plus sensibles de la nature,

Elles sont peu coûteuses en termes d'élevage (pas de chenils coûteux, ni de frais de vétérinaire), d'entraînement, et se reproduisent de manière autonome.

L'abeille ne se laisse pas distraire ou ennuyer (contrairement aux chiens)

Réponse peut être vérifiée à tout moment.

Transmission des données : quand ils sortent à la recherche de la particularité associée à l'odeur de fleurs avec du nectar, dès leur retour à la ruche, ils peuvent former d'autres abeilles à cette odeur particulière.

C'est un outil peu coûteux pouvant être utilisé dans les pays en voie de développement, par exemple.

iv. Projet Inscentinel®

Inscentinel UK, est une société de biotechnologie spécialisée dans l'exploitation de la capacité olfactive des abeilles pour la détection de traces de molécules volatiles.

Le projet consiste en une série d'outils de diagnostic alternatifs qui utilisent les abeilles pour diagnostiquer avec précision à un stade précoce une grande variété de maladies.

La recherche scientifique a démontré que les abeilles peuvent être entraînées à effectuer des contrôles de santé en détectant une odeur spécifique dans la respiration des gens.

Dans une étude menée avec la London School of Hygiène and Tropical Médecine, il a été montré que les abeilles ont le potentiel d'être utilisées comme outil de diagnostic efficaces de maladies.

v. Protocole d'entraînement

L'entraînement consiste à les dérouter avec une odeur spécifique puis à les nourrir d'une solution d'eau et de sucre (Photo 5). Ainsi, elles associent l'odeur à la récompense alimentaire.

Les abeilles peuvent être entraînées en 10 minutes en utilisant le réflexe de Pavlov et cibler un large éventail de produits chimiques et d'odeurs naturels et artificiels, y compris les biomarqueurs associés à certaines maladies.

Ainsi formées, elles sont transférées dans une bulle de verre pour être opérationnelles. Une fois le diagnostic établi, elles sont ensuite libérées et retournent à la ruche.

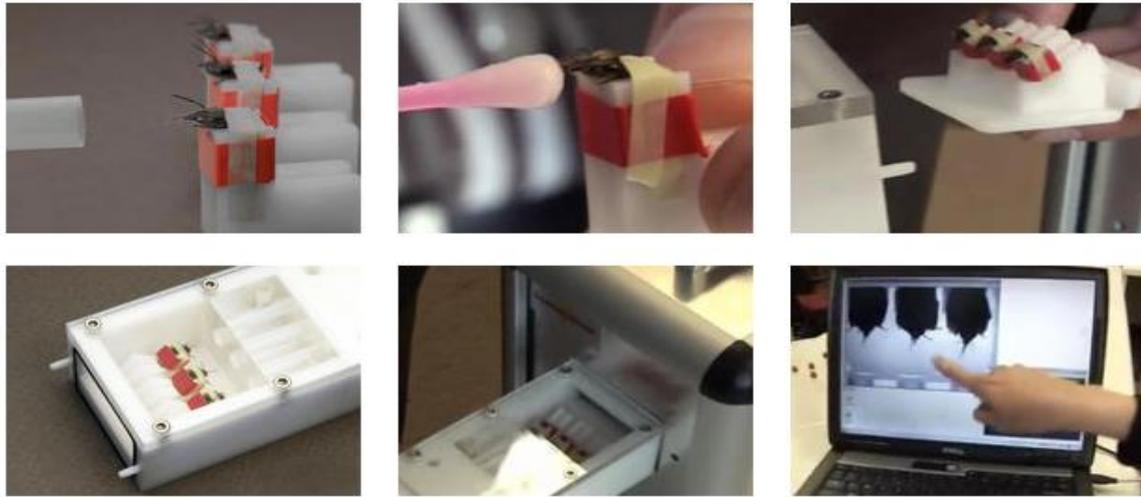


Photo 5 : Etapes d'intégration des abeilles pour lier une odeur à une récompense

Cliché 1 : Les abeilles sont ventilées avec de l'air parfumé des odeurs qu'elles devront cibler.

Cliché 2 : Pour déclencher le réflexe de Pavlov, les abeilles sont nourries avec une solution de sucre et d'eau.

Clichés 3 à 5 : Les abeilles formées sont ensuite gardées dans une boîte pour surveiller leur comportement.

Cliché 6 : Quand ils sont à nouveau ventilés avec de l'air parfumé qu'ils ont été entraînés à cibler, les abeilles tirent leur langue comme un réflexe. La réaction est visible dans un ordinateur à travers une caméra.

vi. Dispositifs utilisés

Le concept en verre est constitué de deux enceintes (Photo 6, Photo 7) : une petite chambre servant d'espace de diagnostic et une plus grande où les abeilles entraînées sont conservées le temps nécessaire à l'opération. Les patients soufflent dans la petite chambre. Les abeilles s'y précipitent seulement si elles détectent les odeurs sur lesquelles ont porté leur entraînement, les marqueurs olfactifs de maladie. La transparence du verre permet une visibilité immédiate du comportement des insectes.



Photo 6 : Dispositif de verre à deux enceintes utilisé pour la détection d'odeur par les abeilles.

Clichés 1 et 2 : le sujet expire à l'intérieur de la petite chambre.

Cliché 3 : en cas de diagnostic négatif, les abeilles ne détectent pas l'odeur pour laquelle elles avaient été entraîné, et restent dans la grande chambre.

Cliché 4 : en cas de diagnostic positif, les abeilles regagnent la petite chambre en verre et y sont piégés.



Photo 7 : Autre type de dispositif en verre à deux enceintes

Dans une autre version du dispositif, il existe un tube incurvé à l'extérieur de la bulle de verre, ce qui permet aux abeilles d'éviter de se retrouver accidentellement dans la chambre de diagnostic (Photo 8). Le résultat est de ce fait plus précis.

Les tubes reliés à la petite chambre créent de la condensation, de sorte que l'expiration soit visible.



Photo 8 : Autre type de dispositif à deux enceintes

Autre objet exploitant l'odorat des abeilles :

Dispositif en verre permettant la détection des produits chimiques dans l'aisselle (Photo 9).



Photo 9 : Dispositif de détection d'odeur par les abeilles, adapté pour les aisselles.

La région axillaire présente un intérêt particulier, car elle contient des agrégats denses de glandes eccrines, apocrines, apocrines et sébacées qui nourrissent diverses communautés de microbiotes susceptibles de jouer un rôle important dans la production d'odeurs individuelles (100).

Les recherches initiales ont démontré que les abeilles peuvent cibler les composés chimiques de la tuberculose, du diabète, du cancer des poumons, de la peau et du pancréas.

Les abeilles sont fiables de 90 à 98 %, mais d'autres recherches en laboratoire doivent être effectuées sur un échantillon plus large.

L'emploi des insectes ou des mammifères est prometteur pour aider à détecter certaines maladies, ces solutions méritent à l'évidence de continuer à être explorées.

Cependant, le choix de l'insecte conditionne les résultats, certains laboratoires ont employé des guêpes, mais leur comportement est plus agressif.

d) Les rats (rat Pouched Giant Southern ou rat géant Africain)

Une revue publiée en 2015 met en avant une dizaine d'études utilisant des rats renifleurs africains de type *Cricetomys gambianus*, dans le cadre de la détection de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* responsable de la tuberculose.

Ces études se justifient par la faible sensibilité de la microscopie des frottis d'expectoration pourtant utilisée en routine pour le diagnostic de la tuberculose (TB) dans les pays pauvres en ressources.

i. Particularités

La supériorité olfactive du rat par rapport à l'humain a été confirmée grâce à leur aptitude pour détecter l'odeur du 2,4,6-trinitrotoluène (TNT), l'explosif primaire dans la plupart des mines terrestres.

A travers des rapports historiques de médecins indiquant que l'haleine et l'expectoration des patients tuberculeux avaient souvent une odeur goudronneuse, le chercheur Weetjens a émis l'hypothèse que cette odeur pouvait être facilement détectée par des rats *Cricetomys*, et que les procédures de laboratoire approuvées dans l'entraînement de ces rats pour la détection du TNT pourraient être facilement adaptées pour leur apprendre à distinguer TB-positif (181).

ii. Projet APOPO

APOPO est une organisation non gouvernementale (ONG) belge dont le siège est à Morogoro, en Tanzanie, qui est largement reconnue pour son utilisation de rats géants africains (*Cricetomys gambianus*) pour détecter les mines terrestres .

Ces rats africains vont être également utilisés dans le cadre de la détection de la tuberculose, dans plusieurs études.

Bien que la tuberculose soit une maladie traitable et guérissable, elle cause d'immenses souffrances et de nombreux décès en Afrique, en partie à cause de l'absence d'une technique fiable et bon marché pour la détecter.

Dans l'une de ces études, 10 adultes *Cricetomys ont* évalué 910 échantillons d'expectorations prélevés chez des patients suspects de tuberculose. Les résultats ont montré une sensibilité de 68% et une spécificité de 87% (182).

Dans une seconde étude; 20 rats ont été étudié pour leur précision dans la détection de *Mycobacterium tuberculosis* dans les expectorations (183). Sur les 20 rats entraînés, 18 étaient capables de distinguer les échantillons positifs d'expectorations négatives, avec des sensibilités quotidiennes moyennes allant de 72% à 100%, et des faux positifs quotidiens moyens allant de 0,7% à 8,1%.

L'utilisation de rats multiples a significativement augmenté la sensibilité et la valeur prédictive négative.

iii. Protocole d'entraînement (proposé par Weetjens et al. dans le projet APOPO (184))

Les rats participants à ces études portent le nom d'heroRAT.

La formation complète de ces Hero Rats prend environ neuf mois en moyenne, et est suivie par une série de tests d'accréditation.

Une fois formés, les rats peuvent travailler efficacement pendant environ quatre à cinq ans avant de prendre leur retraite.

Tous les rats sont élevés et formés dans un centre d'élevage et de formation de Morogoro avant d'être déployés dans les pays d'opération.

La formation commence à l'âge de 5-6 semaines, avec la socialisation. Les rats sont exposés à divers stimuli (tels que les images, les sons et les personnes), puis formés selon les principes du conditionnement opérant. Après deux semaines, ils apprennent à associer un son « clic » avec une récompense alimentaire - banane ou cacahuètes.

Une fois qu'ils savent que "clic" signifie la nourriture, les rats sont prêts à être formés sur un parfum cible et se spécialiser dans TNT pour détecter les mines terrestres ou la tuberculose pour détecter les échantillons d'expectoration humaine TB-positif. La complexité de leurs tâches augmente progressivement jusqu'à ce qu'ils atteignent l'étape finale de la formation où ils doivent faire un test à l'aveugle pour être accrédités. Une fois accrédités, les HeroRAT sont prêts à travailler dans un champ de mines ou dans le laboratoire de recherche pour la détection

de la tuberculose ou de la détection d'odeurs à distance (RST). Les rats qui échouent à l'exercice d'accréditation bénéficient d'une retraite anticipée et sont soignés toute leur vie.

Dans un exemple d'étude menée dans la détection des échantillons positifs à la tuberculose, les rats ont été entraînés dans une cage rectiligne pour renifler chacun des 10 trous situés le long de la ligne centrale du plancher de la cage. Un petit pot contenant un échantillon d'expectoration prélevé sur un patient a été placé immédiatement en dessous de chaque trou (Photo 10) (184).



Photo 10 : Cage de détection des échantillons de tuberculose par des rats entraînés.

Les rats ont été entraînés par un conditionnement opérant à faire une pause pendant au moins 5 secondes dans des trous où l'échantillon d'expectoration était positif à la tuberculose (confirmé par microscopie), mais pas dans des trous où l'échantillon d'expectoration était TB négatif.

En résumé, la procédure d'entraînement impliquait un renforcement différentiel, de sorte que les rats (qui étaient légèrement privés de nourriture) recevaient de la nourriture seulement lorsqu'ils faisaient une pause pendant le temps requis (5 s) dans les trous au-dessus des échantillons TB positifs. Lorsque la discrimination a été établie, les formateurs étaient au courant des échantillons TB-positifs et TB-négatifs, afin qu'ils puissent organiser des récompenses de manière appropriée.

iv. Avantages

Il s'agit d'un animal intelligent, relativement calme et facile à entraîner.

De plus, les rats sont moins coûteux à former que les chiens détecteurs de mines (185).

Il s'est avéré que les rats peuvent détecter ces bactéries dans les échantillons d'expectations avec un précision de 74% en moyenne et traiter jusqu'à 1680 échantillons par jour, alors qu'un clinicien de laboratoire a une capacité limitée de 40 échantillons par jour.

v. Inconvénients

Malgré la capacité des rats à évaluer les échantillons d'expectorations de façon très rapidement, il faut beaucoup de temps pour préparer les échantillons mis à disposition pour les rats.

Des études récentes ont évalué des stratégies possibles pour réduire le temps requis pour traiter les échantillons.

Une étude, menée par Mahoney et al. en 2012, (183) a exploré si ces rats pouvaient détecter avec précision la tuberculose active en reniflant directement des lames de microscope fixes. En effet, étant donné que ces lames sont préparées pour chaque échantillon dans les centres, cela ne nécessiterait pas de traitement supplémentaire avant leur présentation aux rats, ainsi leur utilisation accélérerait considérablement l'évaluation des échantillons par les rats.

Ces résultats suggèrent que les rats peuvent détecter la tuberculose dans des lames préparées, mais que leur précision est nettement inférieure à leur précision dans la détection de la TB dans les expectorations.

Cette méthode pourrait donc convenir à la recherche active de cas, en particulier lorsque de grands nombres d'échantillons doivent être analysés dans des contextes à ressources limitées, pour compléter les techniques de diagnostic existantes.

APOPO a amélioré le suivi des patients en réduisant le processus de détection de la tuberculose d'un calendrier de diagnostic de 4 à 5 jours à un calendrier de 12 heures. Cela a augmenté le nombre de patients nouvellement diagnostiqués commençant le traitement (186).

2.4.2.3. *Utilisation d'outils technologiques de détection de formes gazeuses et de COV*

Les tentatives d'imiter le système olfactif biologique des animaux, ont nécessité l'identification au préalable des étapes clés du fonctionnement de l'odorat par les chercheurs, et ont abouties au développement d'un premier détecteur d'odeur en 1982 (187).

Après cet évènement, des recherches ont été menées pour mettre au point des méthodes de chromatographies gazeuse, couplées ou non à de la spectrométrie de masse, intégrant une analyse électronique *via* des réseaux de capteurs de gaz à base de nanomatériaux, notamment en raison de leur capacité à développer des systèmes de détection très sensibles et leur faible coût de fabrication.

L'hypothèse que ces dispositifs pourraient être utilisés pour identifier les composés organiques volatils (COV) associés aux cancers à un stade précoce, et en faire des outils de diagnostic non invasifs et peu coûteux, a rapidement suscité une attention particulière dans la recherche médicale.

C'est ainsi, qu'au cours des trois dernières décennies, les technologies de « détection électronique » ont connu des évolutions importantes et sont maintenant utilisées pour diverses applications, allant du contrôle qualité dans l'agroalimentaire au diagnostic médical, en passant par des orientations militaires avec la recherche d'explosif.

Cependant, leur applicabilité dans un cadre clinique est limitée et ce pour plusieurs raisons. En effet, plusieurs facteurs limitants peuvent potentiellement interférer l'analyse, comme par exemple la consommation de tabac avant le prélèvement d'haleine, la collecte d'échantillons qui doit être rigoureuse, le temps d'analyse qui peut être parfois long.

Un domaine particulier d'intérêt de dispositifs portatifs est centré autour des nez électroniques, visant à reproduire le système olfactif biologique pour l'analyse de gaz et ainsi produire des empreintes olfactives.

En outre, des travaux récents ont montré qu'il est possible d'améliorer la performance, augmenter la tolérance à des facteurs tels que les interférences à la vapeur d'eau qui laissent souvent le système de capteur non sensibles aux biomarqueurs gazeux, et d'améliorer la sélectivité des dispositifs en modifiant les matériaux de base.

a) Les nez électroniques (eNoses)

Les "nez électroniques" sont des détecteurs de molécules de gaz dont l'utilisation semble prometteuse notamment pour la détection de gaz dangereux ou le dépistage précoce de maladies telles que le cancer.

La recherche mondiale porte principalement sur l'intégration des nanotechnologies dans les dispositifs "nez électroniques" car celles-ci permettraient non seulement d'atteindre des seuils de sensibilité extrêmement bas et une sélectivité très importante mais également une diminution des coûts de production et de consommation énergétique ainsi qu'une amélioration de la stabilité du dispositif (188).

Les nez électroniques sont composés de multiples capteurs, chacun spécifique de certain gaz, dont le but est de déterminer la concentration des gaz.

Un eNose est constitué de trois parties :

- Un collecteur d'échantillon,
- Des capteurs de gaz
- Un système de traitement du signal.

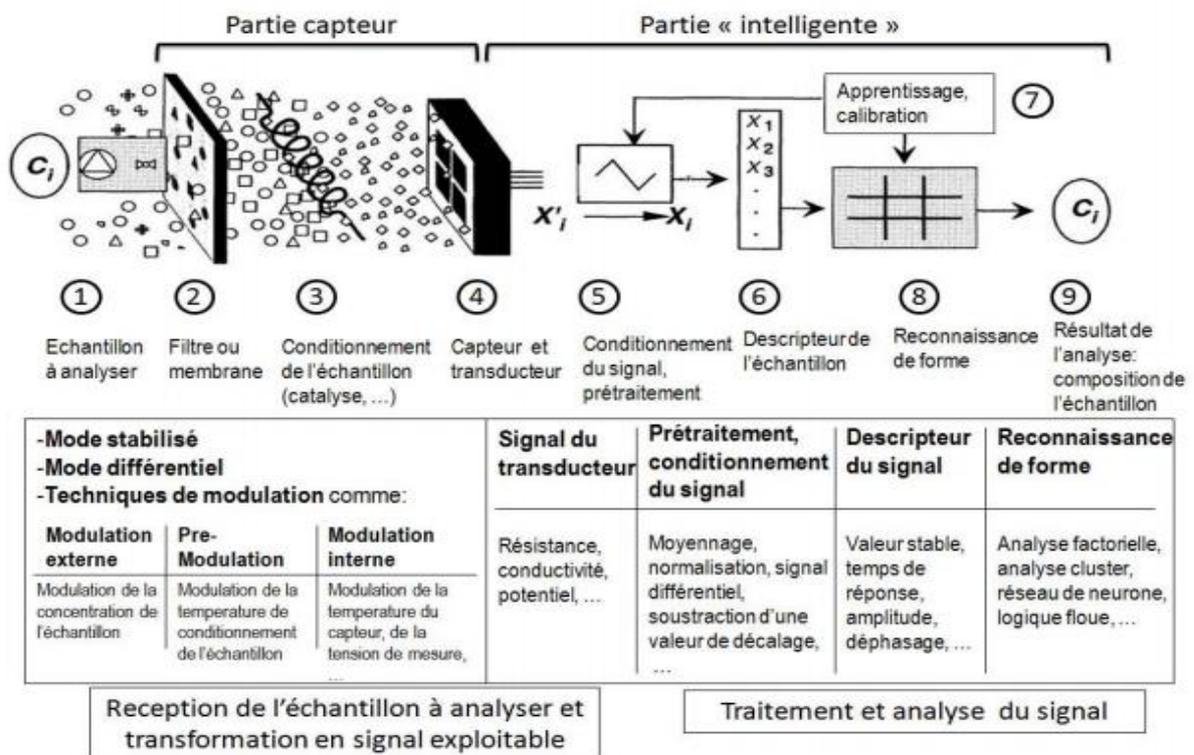


Figure 21 : Illustration d'une chaîne complète d'un système de détection chimique (détection de molécules en phase gazeuse ou liquide)(189).

A partir des mesures effectuées par le(s) capteur(s), la partie « intelligente » doit permettre d'identifier la nature d'un gaz (aspect qualitatif) voire sa concentration (aspect quantitatif). Il faut tout d'abord définir un descripteur de la mesure, c'est-à-dire un vecteur de données qui décrit la réponse du capteur.

Ce descripteur est ensuite utilisé dans une étape de traitement des données pour l'analyser ou le classer (principe de reconnaissance de formes). Cette étape est cruciale, car en général, à la sortie des eNoses il s'agit d'un profil de COV qui est expiré, appelé « smellprint » ou « breathprint », et non des COV individuels. Les breathprints peuvent être ensuite analysées par des algorithmes de reconnaissance des formes permettant de distinguer différents mélanges de COV et de ce fait potentiellement les maladies et les phénotypes de la maladie.

Cette partie décisionnelle est une façon de rendre le système « intelligent » et de prendre en compte les effets des paramètres d'influence comme les variations de l'humidité, de la température ambiante mais aussi les effets de dérive.

La clé de l'appareil est bien entendu le choix du capteur utilisé.

i. Les capteurs

Le capteur chimique est un dispositif qui transforme une information chimique, comme la concentration ou la composition d'un échantillon à analyser, en un signal exploitable (électrique ou optique). L'information chimique peut naître d'une réaction chimique de l'échantillon analysé ou d'une propriété physique du système étudié.

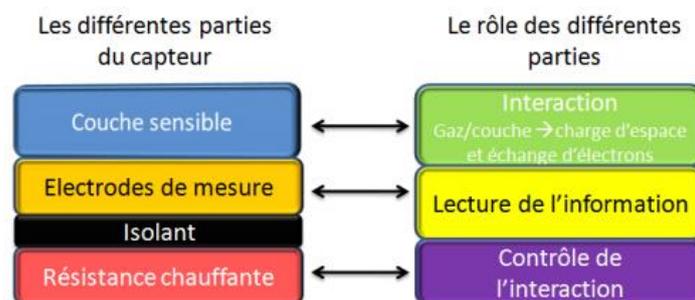


Figure 22 : les différentes parties du capteur et leurs rôles.

Un capteur chimique n'est pas un système autonome mais représente une des composantes essentielles d'un analyseur.

Ces détecteurs sont installés en réseau pour pouvoir obtenir des surfaces de reconnaissance plus importante, permettant ainsi d'augmenter la sélectivité.

Bien que la variété de capteurs disponibles soit grande et offre des sensibilités extrêmement élevées, seules une poignée d'approche de reconnaissance moléculaire est applicables, en particulier pour la détection de phase gazeuse. Cette pénurie résulte principalement de la complexité des adsorbants spécifiques sur les interfaces solide/gaz sans nuire à leur fonctionnalité.

Il en existe de différents types : polymères conducteurs, oxydes métalliques semi-conducteurs, fluorescences optiques, etc...

Les détecteurs fonctionnent en liant les molécules à leurs surfaces par un ou plusieurs mécanismes :

- Chimisorption, permet une grande sélectivité mais une faible réversibilité
- Adsorption
- Absorption

Le mécanisme de liaison doit être choisi en lien avec l'application.

Le détecteur parfait n'existe pas, tout est affaire de compromis.

Les performances d'un capteur de gaz s'évaluent grâce à ses six principales caractéristiques : les 3 « S » : Sensibilité, Sélectivité et Stabilité mais aussi la réversibilité, le temps de réponse et la reproductibilité. Ce sont ces performances que la recherche et le développement d'outils sophistiqués tente d'atteindre même si les 3 « S » seront toujours les plus importantes dans un premier temps (Tableau 20) (190).

D'après ce tableau simplifié, nous pouvons d'ores et déjà constater qu'il n'y a pas de technologie « révolutionnaire » possédant toutes les caractéristiques positives.

Tableau 20 : Comparaison des performances de différents types de capteurs de gaz (191)

Principales Caractéristiques	Familles de capteurs de gaz						
	Semi conducteur (MOX, FET)	Combustion catalytique (Pellistors CC)	Piézoélect. (SAW, BAW, QMB)	Electro chimique	Conduct. thermique (Pellistors CT)	Absorption infrarouge (IR, NDIR)	Photo ionisation (PID)
Sensibilité	++	+	+++	+	--	+++	++
Précision	+	+	++	+	+	+++	++
Sélectivité	-	--	-	+	--	++	-
Temps de réponse	++	+	+	-	+	-	+
Stabilité	-	-	+	--	-	+	+
Robustesse	+	+	-	--	+	++	+
Consommation énergie	++	-	-	-	-	--	--
Coût	++	++	-	+	+	--	-
Intégrabilité (pour un système portable)	++	+	+	-	+	--	++

-- Performance Très Faible ; - Faible ; + Bonne ; ++ Très Bonne

Exemple de capteurs de COV :

- Les microréacteurs au silicium (70).
- Les capteurs nanoporeux à grande surface spécifique ont été préparés par voie sol-gel (xérogels)
- Cyanose C320, basé sur plusieurs conducteurs technologie de capteur polymère, présente l'avantage de ne pas être influencé par la présence d'humidité.
- Les capteurs de mesure d'oxyde d'azote / dioxyde (Photo 11) : système utilisé pour la reconnaissance de mélanges complexes de COV provenant de patients souffrant d'asthme

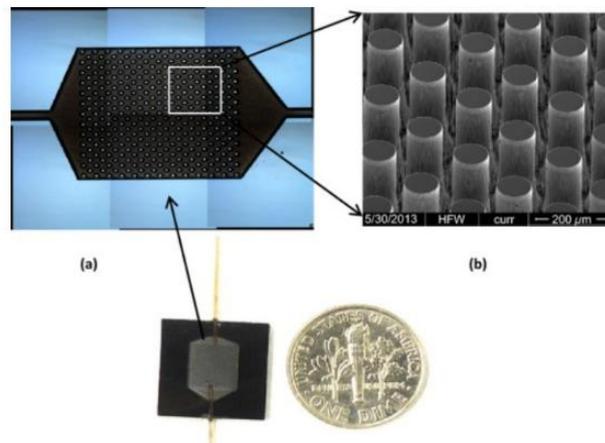


Photo 11 : Capteur de mesure à l'oxyde d'azote/dioxyde

ii. Avantages des nez électroniques

Coût :

Généralement, les nez électroniques sont peu onéreux en termes de fabrication,

Praticité :

La miniaturisation de systèmes optiques et physiques performants (capteurs Infra-rouge, micro-colonne chromatographique) les rend portatifs et l'administration du test est facile, elle peut se faire au chevet du patient ou dans un lieu de dépistage organisé.

Rapidité :

Plus rapides que les autres techniques standard, ils peuvent analyser un échantillon en moins de 30 minutes.

iii. Limites

Sensibilité en cas d'interférences : diminution de la sensibilité en présence de vapeur d'eau ou d'une forte concentration d'un des composants.

Durée de vie : courte vie de certains capteurs.

Travail en amont plus important : la mise au point de méthodes d'analyse exige un travail considérable.

Les recherches sont focalisées sur les trois performances de base que sont la sensibilité, la sélectivité et la stabilité en agissant sur le capteur lui-même en modifiant les techniques physiques d'élaboration (technologie, morphologie, dopage, filtre, température) ou en agissant mathématiquement sur les données issues du capteur (traitement du signal, reconnaissance de forme), ou encore sur l'association des deux (192) (Tableau 21).

Tableau 21 : Paramètres d'influence sur les critères de performances des capteurs de gaz à oxyde métallique (189).

Caractéristiques Capteur	Paramètres d'influence intrinsèques	Paramètres externes
Sensibilité au gaz	Couche sensible : - matériau - structure (porosité, organisation cristalline, ...) - dopage Température de fonctionnement	-Température et humidité ambiante - Gaz interférents, flux - Packaging - Système de pré-concentrateur
Sélectivité	- Matériau sensible - Dopage - Mode opératoire (T variable)	Filtrage passif ou actif
Stabilité	Maitrise de la technologie : - plateforme chauffante (dérives thermo mécaniques de la structure globale à hautes temp.) - stabilité de la structure du matériau sensible (évolution morphologique)	Conditions de mesure (influence des variations de flux, de température et humidité ambiante)
Réversibilité	Nature du matériau sensible vis-à-vis du gaz à détecter Structure, morphologie Température de fonctionnement et de désorption	Problème d'empoisonnement de la surface du capteur (carbonates de surface, Packaging, Colles, environnement)
Temps de Réponse et de recouvrement	Technologie : - inertie thermique du capteur - structure, morphologie, épaisseur de la couche sensible	Packaging, choix du positionnement du capteur, volume de la cellule de mesure
Reproductibilité	Réponse capteur : - stabilité du matériau sensible -Température de fonctionnement et de désorption Capteur à capteur : - Incertitude technologique - méthode de dépôt de couche sensible	Variabilité des conditions de mesures

iv. Types de nez électroniques

Le Na-Nose

Dispositif mis au point par Hossam Haick, un des chercheurs vedette de Technion à Haïfa, l'institut de technologie d'Israël. Le Na-Nose, est un « nez » composé de capteurs nanométriques, capable de détecter dans l'haleine humaine des maladies graves, comme des cancers (poumon, sein, estomac, colon, prostate...) ou des maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, sclérose en plaques).

Il s'agit d'un véritable système olfactif artificiel basé sur un ensemble de capteurs de gaz hautement réactifs permettant d'identifier et de séparer différentes odeurs, et ceux même à de très faibles concentrations (124).

Les capteurs NA-NOSE ont été conçus pour montrer une très faible sensibilité aux biomarqueurs volatils provenant de facteurs confondants tels que l'âge, le sexe, les médicaments, le tabagisme et les effets environnementaux.

Cette invention révolutionnaire implique 42 chercheurs et 22 laboratoires à travers le monde (dont l'INSREM, l'institut national de la santé et de la recherche médicale) et en cours de test à grande échelle afin de confirmer son efficacité à 95 % sur les cancers (193).

Le BreathLink

Dans le cadre de la recherche sur le dépistage du cancer du sein, une alternative moins contraignante à la mammographie, a été mis au point par le Dr Michael Phillips, sous le nom de « BreathLink ».

Après commercialisation en Europe, les résultats portant sur 250 femmes sont plutôt concluants. Il présente notamment une bonne valeur prédictive négative, avec 99,9% de femme non atteintes du cancer du sein lorsque le test est négatif (193). Cependant, une validation par mammographie est nécessaire en cas de résultat positif pour établir un diagnostic avec certitude.

L'élaboration d'un tel outil a été possible grâce à la technologie FAIMS, brevetée par la compagnie Owlstone Medical, permettant de surveiller rapidement une large gamme de biomarqueurs COV à partir de la respiration, de l'urine et d'autres fluides corporels avec une sensibilité et une sélectivité élevées (194).

Des études de plus grande envergure sont attendues pour attester une éventuelle utilisation en routine médicale.

Applications smartphones

Dans l'idée que les smartphones intègrent déjà de nombreux capteurs (gyroscopes, accéléromètres, capteurs GPS ou encore boussoles électroniques), de nouveaux capteurs pouvant identifier toutes sortes d'odeurs, les polluants, les explosifs et des états pathologiques, sont en cours de développement.

Cette idée semble insolite au premier abord, mais en admettant que les ordinateurs, les tablettes et les smartphones aient déjà la capacité de « voir », grâce aux caméras, et « d'entendre », grâce aux micros, cela paraît envisageable dans un futur proche.

Les déploiements autour des « nez électroniques » portables entrevoient la potentialité d'ajouter le sens de l'odorat aux terminaux mobiles.

Ethylotests

Partant de ce constat, plusieurs éthylotests, détectant les molécules volatiles émises après la consommation d'alcool, ont été développés pour une utilisation via smartphone :

- Breathometer :

Mis au point par une start-up américaine ; il s'agit d'un boîtier de la taille d'une boîte d'allumettes qui transforme le smartphone en éthylotest. Le boîtier utilise pour se connecter la sortie audio du smartphone. Le capteur intégré au boîtier analyse l'haleine de l'utilisateur : l'application mobile associée au capteur affiche alors le degré d'alcoolémie. En cas de test positif, l'application suggère à l'automobiliste des moyens de déplacement : elle pourra par exemple le mettre en contact avec des sociétés de taxis.

Ce dispositif a été homologué par les autorités américaines de santé (FDA) (195).

- Floome :

Développé par une société italienne, 2045Tech. L'appareil, qui se connecte également à la prise jack du smartphone, utilise une technologie de détection brevetée, similaire à celle des éthylotests professionnels utilisés par les forces de l'ordre. L'application Floome indique aussi le temps estimé pour que l'alcoolémie de l'utilisateur redescende à un niveau sûr.

La batterie de l'alcootest ne nécessite pas de charge et est hygiénique car elle possède un bouchon amovible et nettoyable. Il calcule le « temps de récupération » en fonction de votre taille, poids et sexe.

Autres éthylotests :

- Alcohoot
- BACtrack
- MobileBreathalyzer

Le B-test



Photo 12 : Dispositif B-Test®

La société française AndroMC Systems avait mis au point en juillet 2012 un dispositif, le B-Test (Photo 12). Celui-ci est en est en cours d'homologation et devrait recevoir le label de conformité à la norme NF(195).

Test du « KAIST »

En Asie, une équipe de scientifiques du KAIST (Korea Advanced Institute of Science and Technology), présente dans un article publié par la revue allemande Angewandte Chemie une utilisation nouvelle de l'écran tactile des smartphones, comme outil pour effectuer des analyses biomoléculaires.

Des expériences auraient démontré que les écrans des smartphones qui fonctionnent sur la détection de charge électrique seraient capables de reconnaître la présence de certaines molécules et leur taux de concentration grâce à un simple toucher, avec une précision aussi bonne que lors de tests médicaux classiques. Il serait notamment possible de mesurer la présence de certaines protéines, par exemple celles utilisées pour diagnostiquer le cancer du foie (193).

Le Sniffphone

En mars 2017, lors de son congrès annuel, la Société internationale pour l'olfaction et la chimie (ISOCS), organise une démonstration du nouveau prototype de téléphone intelligent capable de détecter une maladie à partir d'un souffle, le SniffPhone (Photo 13) (196).

Le projet SniffPhone est financé par le programme Horizon 2020 de l'Union européenne pour la recherche, le développement technologique et la démonstration dans le cadre de la convention de subvention n ° 644031.

Conception :

Le SniffPhone intègre des micro- et nanotechnologies hétérogènes dans un système intelligent autonome pouvant être attaché à un téléphone mobile et analyser les marqueurs de maladies à partir de l'air expiré. Il s'agit d'un ensemble miniaturisé de capteurs chimiques à base de nanomatériaux hautement sensibles capables de réagir avec la respiration d'un patient. Les résultats sont stockés et prétraités par micro fluidique intégrée sur puce intégrée et électronique.



Photo 13 : Le SniffPhone : petit module enfichable pour smartphone (124)

Dans cette approche, une interaction entre un échantillon d'haleine et les capteurs chimiques est enregistrée, puis analysée.

Les résultats intégrés sur puce électronique sont transférés sans fil via l'Internet du téléphone mobile à un serveur externe. Si les données montrent des signes de maladie, le médecin est alerté.

Le fait qu'un patient soit capable de prendre d'innombrables mesures diagnostiques à différents moments de la journée d'une manière pratiquement sans effort et de façon inconsciente, représente une grande révolution en matière de dépistage. De plus, la richesse des données générées par ces tests peut être automatiquement traitée et analysée pour générer un rapport de surveillance continu et complet qui sera évalué périodiquement par le médecin traitant.

C'est pourquoi, le projet SniffPhone représente un nouveau concept à fort potentiel. En effet, il peut constituer une plus-value inestimable dans les vastes efforts de dépistage du cancer. Ce

test de dépistage semble idéal et paraît répondre à plusieurs critères attendus pour un test de dépistage : précis - faible coût - facile à utiliser - confortable pour le patient - facilement reproductible.

Outre les unités de recherche et développement au sien de laboratoires et cliniques, le projet SniffPhone impliquera quatre PME européennes et une grande entreprise industrielle, plaçant ainsi l'Europe dans la compétition pour la conception et la commercialisation de systèmes intelligents miniaturisés innovants (Figure 23).

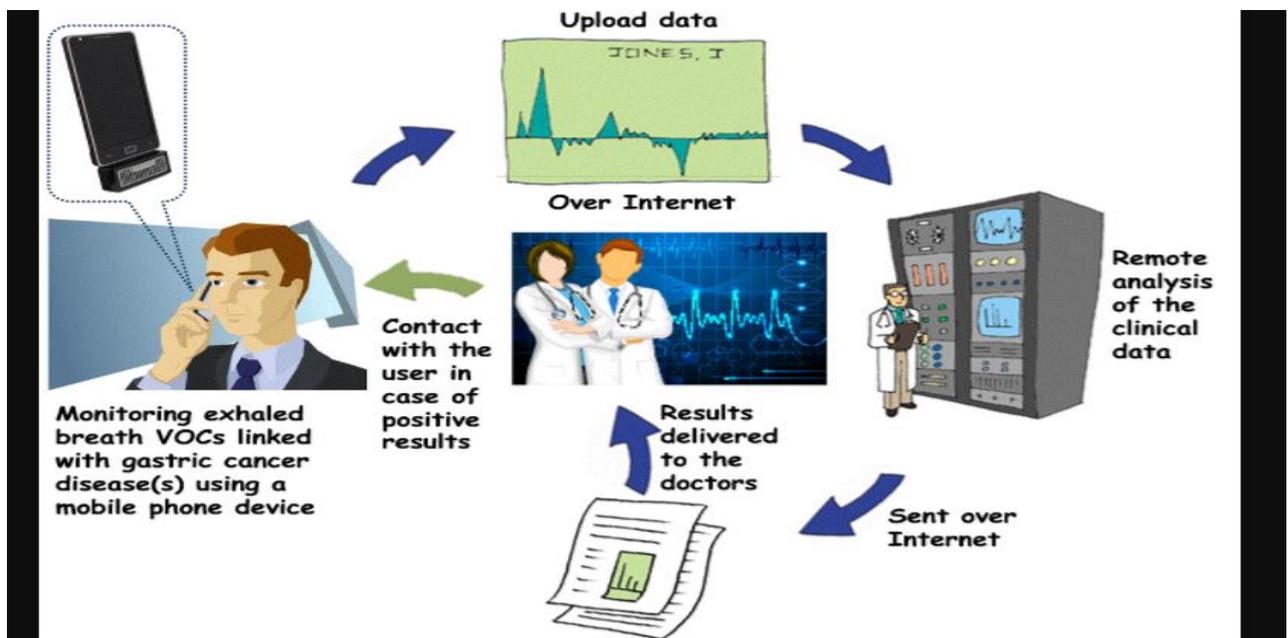


Figure 23 : Principes d'utilisation du Sniffphone® (197)

Test Adamant

La société californienne Adamant Technologies travaille quant à elle à la mise au point d'une puce capable d'analyser la composition chimique des odeurs.

Cette puce compte environ 2000 capteurs, soit presque autant que le système olfactif canin. Elle serait capable, à terme, d'évaluer en temps réel des fonctions métaboliques, de mesurer la glycémie ou encore de réaliser des tests d'alcoolémie.

Test Alpha MOS

La société toulousaine Alpha MOS développe des microcapteurs capables de mesurer les composés volatils présents dans l'atmosphère ou se dégageant de produits solides, comme les aliments.

Jusqu'ici, les nez électroniques qu'elle concevait avaient des usages industriels : elles permettent aux firmes agroalimentaires de contrôler la qualité de leurs produits, aux fabricants de déodorants d'en vérifier l'efficacité, aux usines de traitement d'eaux usées ou aux équarrisseurs de limiter l'impact sur le voisinage, ou encore aux militaires de détecter la présence de gaz de combat.

Alpha MOS a conclu récemment un accord de développement avec le Chinois Haier qui vise le développement d'un nez électronique miniaturisé. Alpha Mos envisage également l'intégration de ses microcapteurs dans des smartphones. Elle imagine des applications comme « sentir » la qualité de l'air en ville, déterminer l'état des sols en agriculture. Ils considèrent également que l'analyse de l'haleine, outre la mise au point d'un éthylotest, pourrait ouvrir la voie à de nouvelles modalités de diagnostic médical (concernant le diabète ou encore certaines formes de cancer) grâce à l'analyse de marqueurs contenus dans l'air expiré.

Test Aryballe

Une autre start'up française, Aryballe Technologies, fondée en 2014, a mis au point NeOSe, le premier capteur d'odeurs universel qui imite les récepteurs olfactifs humains.

Le dispositif portatif tient dans la main. Il aspire les odeurs *via* un ventilateur. Les molécules vont ensuite venir se fixer, par affinité, à la surface de nano-capteurs embarqués. Ce sont ces nano-capteurs qui imitent les récepteurs olfactifs humains. Une fois les molécules odorantes fixées, une photo sera saisie de manière à transformer l'odeur en signature visuelle sous forme d'un code barre. Les informations collectées sont alors envoyées, grâce à une puce microélectronique, vers la base d'odeurs d'Aryballe puis analysées pour retrouver l'odeur associée à la signature visuelle.

En ce sens, la société a d'ores et déjà conclu un partenariat dans le domaine médical, notamment en vue du développement de la détection de certaines maladies associées à des odeurs caractéristiques et qui pourraient ainsi être décelées à un stade précoce.

Le MasSpec Pen®

En 2017, L'équipe de Zhang et al (198), a développé un dispositif , nommé MasSpec Pen. Il s'agit d'un appareil de spectrométrie de masse portatif automatisé et biocompatible pour le diagnostic rapide et non destructif des tissus cancéreux humains.

Cet outil technologique a été conçu dans un contexte où les méthodes conventionnelles de diagnostic histopathologique des tissus nécessitent beaucoup de temps et de travail et peuvent retarder la prise de décision au cours des procédures diagnostiques et thérapeutiques. Au cours d'une chirurgie d'ablation d'une tumeur, le but du chirurgien est d'éliminer complètement les cellules cancéreuses, cependant, dans la pratique il est très difficile d'obtenir des bords externes complètement dépourvue de cellules cancéreuses.

Le MasSpec Pen, est appliqué pendant 3 secondes sur une zone de la peau, permettant ainsi la ponction d'une goutte d'eau de $10 \mu\text{l}$ – soit un cinquième d'une goutte d'eau, à la surface du tissu pour une extraction de biomolécules (figure 24).

La goutte est ensuite acheminée par un tube souple vers un spectromètre, qui va l'analyser et calculer les différentes masses moléculaires des molécules présentes. Ceci permet de déterminer la présence ou non de cellules cancéreuses dans le tissu analysé.

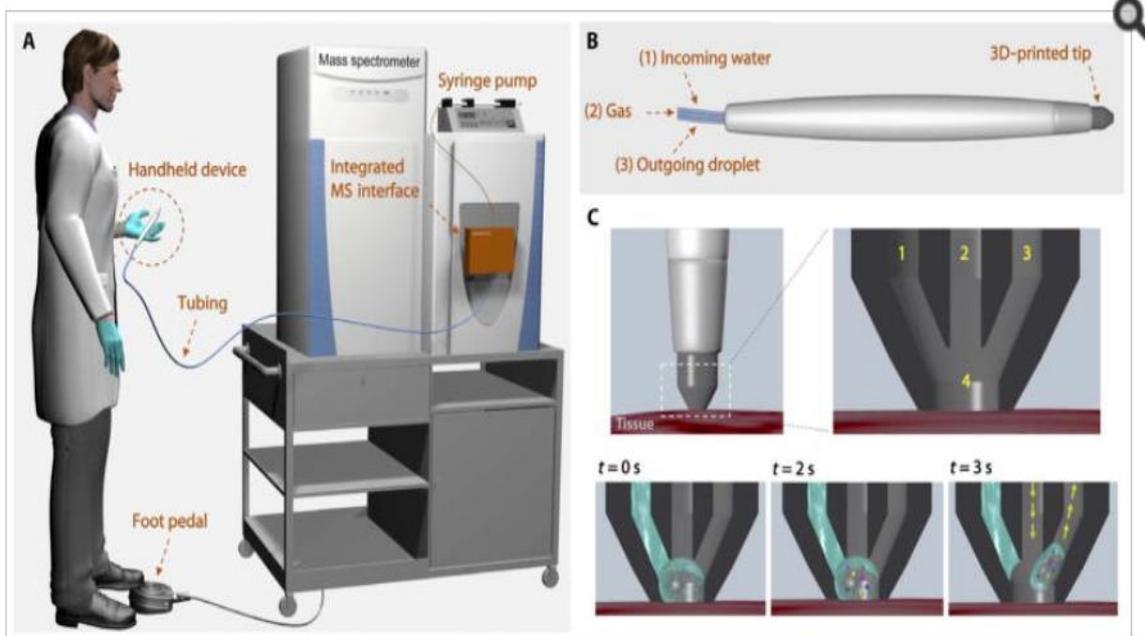


Figure 24 : Représentation schématique du système MasSpec et des étapes opérationnelles (198)

Par ailleurs, l'étude a permis un diagnostic précis du cancer dans les régions tumorales marginales qui présentait une composition histologique mixte.

Dans cette étude, les spectres de masse obtenus présentaient des profils moléculaires caractérisés par une variété de biomarqueurs de différentes natures, comme des métabolites, des lipides, et des protéines.

Au préalable, les chercheurs ont analysé 253 échantillons de tissus de personnes atteintes de cancer du poumon, du sein, de la thyroïde ou d'un cancer ovarien. Cela a permis d'établir les quatre "profils moléculaires" du tissu pour chaque type de cancer. C'est à partir de ces informations histologiques qu'une base de données moléculaires a pu être validée.

Les résultats statistiques, construits à partir de cette base de données, ont permis la prédiction du cancer avec une sensibilité de 96,4%, une spécificité de 96,2% et une précision globale de 96,3%, dans la prédiction des tumeurs thyroïdiennes bénignes et malignes et des différents sous-types histologiques de cancer pulmonaires.

Les résultats obtenus sont encourageants et fournissent la preuve que le MasSpec Pen pourrait potentiellement être utilisé comme une technologie clinique et peropératoire pour le diagnostic du cancer ex vivo et in vivo.

Ce nouvel outil de diagnostic en temps réel, ressemblant à un stylo, permettant d'identifier le profil moléculaire des tissus et ainsi de distinguer rapidement une tumeur d'un tissu sain au cours d'une intervention chirurgicale, grâce à une analyse de spectrométrie de masse, sans que cela nécessite de marquage ou d'imagerie spécifique et sans destruction tissulaire inutile.

L'avantage de ce dispositif est sans conteste le fait qu'il n'endommage en rien les tissus et les cellules alentours. C'est particulièrement important pour des cancers situés dans des zones très sensibles, comme les tumeurs cérébrales : endommager des tissus et des cellules peut conduire à des lésions et handicaps irréversibles. En aspirant une minuscule goutte d'eau, le "stylo" sondeur ôte ce risque.

Le Reciva® Breath Sampler

Le Sampler Breath Reciva a été nommé invention de l'année en 2017 au Prix de la santé numérique (199).



Photo 14 : Collecteur Reciva® (200)

Il s'agit d'un collecteur d'échantillon de souffle prêt à l'emploi, permettant de capturer de manière fiable et reproductible des échantillons d'haleine pour analyse (Photo 14) (200).

Ce dispositif mis au point par la société britannique Owlstone Medical, est en cours d'utilisation dans l'essai clinique pour la détection du cancer du poumon, LuCID (200).

Le dispositif est composé de capteurs de pression et de CO₂ permettant une surveillance en temps réel du rythme respiratoire du patient, ce qui permet de sélectionner les fractions pertinentes.

De plus, cet échantillonneur est construit avec des matériaux inertes pour minimiser la contamination de l'échantillon d'haleine par des COV exogènes, et muni de cartouche pouvant stocker la fraction d'haleine, qui sera ensuite analysée comme une biopsie respiratoire.

Les COV recueillis sur les tubes sorbants sont ensuite transportés au laboratoire fournissant le Reciva®, le Breath Biopsy de Owlstone médicale, ou dans un autre laboratoire disposant de plates-formes analytiques telle qu'une GC-FAIMS ou GC-MS pour analyse des échantillons.

La contamination croisée entre patient est évitée grâce à l'utilisation d'un masque à usage unique et de filtre jetable. Les masques sont disponibles également au format pédiatrique.

Une particularité de ce dispositif est qu'il permet une démarche de collecte d'échantillon accessible à tous via son système de location, puis les cartouches utilisées sont envoyées au laboratoire pour analyse (Figure 25).



Figure 25 : Système de location, d'envoi des cartouches et d'analyse via le Reciva® (199)

Ce dispositif a été homologué CE et est utilisé dans plus de 90 groupes de recherche académique et de laboratoires à travers le monde.

Cela permet aux chercheurs de concentrer leurs efforts sur l'analyse du souffle capturé et moins sur la méthode de capture.

iKnife

En 2013, des chercheurs de l'University College de Londres développent le iKnife, un scalpel chirurgical. Egalement appelé Onkoknife¹, ou scalpel intelligent

L'iKnife cautérise une plaie tout en découpant des tissus, puis aspire la fumée émise par le tissu pour l'incorporer dans un spectromètre de masse, qui indique ensuite si le tissu coupé est cancéreux ou sain (Figure 26).

Les chirurgiens pourraient utiliser l'iKnife pour déterminer si les cellules sont saines ou cancéreuses en quelques secondes, alors qu'auparavant il fallait retirer le tissu cancéreux et l'analyser en utilisant un spectromètre de masse.

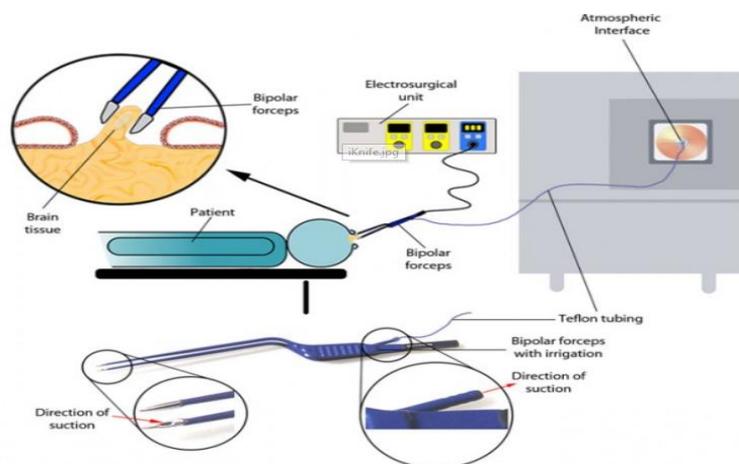


Figure 26 : Procédé du iKnife® (201).

D'autres outils se basent, eux, sur les lasers ultraviolets pour analyser les tissus. Sans outil, la méthode de prélèvement consiste à couper de petits échantillons, à les congeler avant de les analyser. Par ailleurs, ce processus prend jusqu'à 30 minutes, et les résultats sont moins pertinents, car la congélation endommage les cellules.

PARTIE III

ASPECTS CLINIQUE DE L'ANALYSE DE L'AIR EXPIRÉ ET APPLICATION DES TESTS D'HALEINE

LIMITES ET DISCUSSION

III. ASPECT CLINIQUE DE L'ANALYSE DE LA RESPIRATION ET APPLICATION DES TESTS D'HALEINE

3.1. COV IDENTIFIES COMME BIOMARQUEURS DE CANCERS

Pour rappel, un biomarqueur moléculaire est défini comme étant une molécule pouvant refléter l'état pathologique de l'organisme, ou la réponse pharmacologique caractéristique d'une intervention thérapeutique.

En médecine clinique, plusieurs protéines sériques sont déjà utilisées en tant que biomarqueurs, comme par exemple :

- L'expression des récepteurs d'œstrogène (ER)
- Le récepteur de progestérone (PR)
- Le lymphome B-2 (Bcl-2)
- Croissance épidermique humaine les oncogènes du facteur 2 (HER-2 / neu)
- L'indice Ki-67 de l'activité proliférative

Nous l'avons vu précédemment, d'autres source de biomarqueurs peuvent aussi être exploitées. En cas de cancer, de maladies infectieuses (Annexes p225-229), ou de maladies métaboliques (Annexes p230-236), le métabolisme du patient est modifié. Il en résulte la production de composés métaboliques particuliers, notamment des métabolites volatils.

La composition des composés organiques volatils (COV) dans l'air expiré, dans les échantillons d'urine ou de selles peut donc être caractéristique d'une maladie particulière.

Ces dernières années, de nombreuses études ont été menées dans le but de déterminer des bases de données statistiques quantitatives et qualitatives quant aux COV libérés au cours d'une expiration, chez un individu sain ou atteint d'une maladie spécifique.

Certains troubles peuvent avoir en commun une perturbation sur le même biomarqueur. C'est le cas par exemple du Pentane, produit de la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés, qui est un marqueur de l'augmentation de l'activité des radicaux libres d'oxygène (ROS), survenant dans de nombreux troubles : les cancers, ainsi que plusieurs autres troubles détaillés en annexe : le rejet de greffe cardiaque, l'infarctus aigu du myocarde, la schizophrénie et l'arthrite rhumatoïde, etc. (60)

Il est rapporté que pendant la phase initiale du cancer (croissance tumorale), la cellule cancéreuse crée l'environnement acide qui permet à la membrane basale de se rompre et de permettre l'accès des COV à la circulation sanguine (202). L'environnement acide protège en même temps les cellules cancéreuses du système immunitaire pour développer des tumeurs. La croissance tumorale s'accompagne de modifications géniques conduisant à des COV spécifiques sécrétés dans le liquide sanguin qui peuvent être utilisés pour détecter un cancer spécifique (203).

La croissance tumorale s'accompagne également de changements de gènes et /ou de protéines qui peuvent conduire à la peroxydation des espèces de membranes cellulaires et, par conséquent, à l'émission de composés organiques volatils spécifiques (203). Les allèles individuels peuvent alors créer un profil de COV unique qui sera ensuite sécrété dans les fluides corporels.

Les études relevées dans la littérature depuis deux décennies, révèlent plusieurs biomarqueurs, provenant du souffle, impliqués dans plusieurs cancers.

Une récente revue, publiée en juin 2016, a établi une liste de 115 COV validés comme étant liés à des cancers et classés en fonction de leurs coefficients de partage «graisse-sang» et «sang-air» (117). Ces coefficients de partage fournissent une estimation des concentrations relatives de COV dans la respiration alvéolaire, dans le sang et dans les compartiments graisseux du corps humain.

Le tableau ci-dessous donne un aperçu des biomarqueurs les plus étudiés et les cancers pour lesquels ils ont été associés (Tableau 22).

Tableau 22. Composés organiques volatils reconnus comme biomarqueurs de cancer

Composé organique volatil	Type de cancer étudié	Technique d'analyse	Niveau de concentration	Réf.
Isoprène	Poumon	SPME-GC/MS	[ppb/ppt]	(204,205)
		SPME-GC/FID	[ppm]	
Pentane	Poumon	SPME-GC/MS	[ppb/ppt]	(204)
Octane	Poumon	SPME-GC/MS	[ppb/ppt]	(204)
Décane	Poumon	SPME-GC/MS	[ppb/ppt]	(204,205)
		SPME-GC/FID	[ppm]	
Undécane	Poumon	SPME-GC/FID	[ppm]	(205)
Méthyl cyclopentane	Poumon	SPME-GC/FID	[ppm]	(205)
Formaldéhyde	Poumon, prostate, vessie	PTRS-MS	[ppb]	(92,206)
Heptane	Poumon, sein	SPME-GC/FID	[ppm]	(92,205)
		SPME-GC/MS	[ppb/ppt]	
		TD-GC/MS	[ppt]	
Hexanal	Poumon, sein	SPME-GC/FID	[ppm]	(92,205)
		SPME-GC/MS	[ppb/ppt]	
		TD-GC/MS	[ppt]	
Acétone	Poumon	TD-GC/MS	[ppt]	
2-propanol	Sein	TD-GC/MS	[ppt]	
Benzène	Poumon	SPME-GC/MS	[ppb/ppt]	(57,204,205)
		SPME-GC/FID	[ppm]	
Toluène	Poumon	SPME-GC/MS	[ppb/ppt]	(204)
Xylène isomères	Poumon	SPME-GC/MS TD-GC/MS	[ppb/ppt] [ppt]	(204)
Ethylbenzène	Poumon	SPME-GC/MS	[ppb/ppt]	(204)

3.1.1. Cancer du poumon

Le pronostic du cancer du poumon dépend largement de précocité de la découverte de la maladie. Malheureusement, ce cancer évolue durant un certain temps de façon asymptomatique et par conséquent sa détection est souvent fortuite.

Pour cette raison, le cancer du poumon est le plus étudié dans la recherche d'analyse des biomarqueurs de la respiration.

Parmi les biomarqueurs qui lui sont attribués, on retrouve dans la littérature scientifique des COV carbonylés, tels que :

- 2-butanone
- 2-hydroxy acétaldéhyde
- 3-hydroxy-2-butanone
- 4-hydroxyhexenal

Les taux de ces derniers ont été mesuré par un groupe de chercheurs et sont significativement plus élevés dans les échantillons respiratoires exhalés des patients atteints de cancer du poumon par rapport au groupe témoin (140).

D'autres chercheurs, comme Chen et al. (2007), ont cultivé différentes cellules dont des cellules cancéreuses du poumon (carcinomes épidermoïdes, adénocarcinomes, carcinomes bronchiolo-alvéolaires, carcinomes non à petites cellules, des cellules épithéliales normales des voies aériennes, des cellules de bourgeons gustatifs de rat, des cellules ostéogéniques et des adipocytes), afin de déterminer les natures des composés organiques volatiles dégagés par ces cellules (57).

Les cellules tumorales ont été cultivées à partir de tissus humains obtenus par résection de cancer du poumon. Les mêmes patients ont aussi fourni des échantillons d'haleine avant l'opération. Ils ont trouvé 11 composés volatils organiques présents en quantité plus importantes chez les patients atteints de cancer du poumon que chez les sujets sains. Les COV trouvés dans les milieux de culture de ces cellules sont, selon eux, les produits métaboliques des cellules cancéreuses et peuvent être utilisés comme biomarqueurs de la maladie. Cela a permis de mettre en évidence un profil type de COV pour le cancer dans

les échantillons de tissus de poumons d'apparence normale mais qui se sont révélés contenir des cellules cancérigènes après 10 jours de culture cellulaire (Figure 27). Ainsi, ils ont suggéré que de profonds changements se réalisaient au niveau du microenvironnement tumoral aux stades les plus précoces de la carcinogénèse.

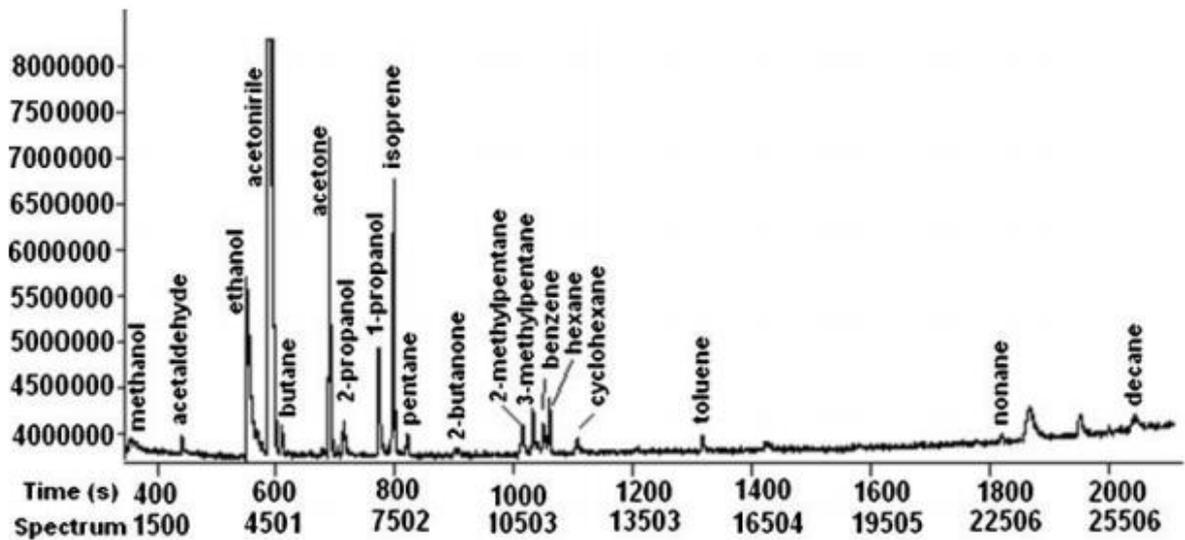


Figure 27 : chromatogramme obtenu après GC-TOF de l'air exhalé d'un patient atteint de cancer du poumon (122)

De très bons résultats ont été observés dans la détection de cancer du poumon dans des échantillons d'haleine, effectuée par des chiens dressés.

De nombreux rapports qui étudient les COV présents dans le cancer du poumon ont fait leur apparition, montrant une sensibilité globale juste (71-85%) et une bonne spécificité (92-100%) (161).

Récemment, dans l'une des plus grandes études de détection d'odeur par des animaux à ce jour, des échantillons d'haleine de 220 participants ont été exploités (164). Parmi les participants, on pouvait recenser des personnes en bonne santé, des patients atteints d'un cancer du poumon, et des patients atteints de broncho-pneumopathie chronique obstructive – BPCO.

Les échantillons ont été présentés aux chiens renifleurs.

Le cancer du poumon a été identifié avec une sensibilité de 71% et une spécificité de 93%, indépendamment de la présence de la BPCO ou la fumée de tabac.

Depuis 1971, des études font appel aux techniques de nez électronique (eNose) pour l'analyse du souffle expiré (1), avec également de bons résultats.

De plus, les chiens et les eNoses sont capables de distinguer entre le cancer du poumon et de la BPCO (164,207).

L'acétone est l'un des composés les plus abondants dans l'haleine et un marqueur métabolique important dans le souffle. Il a été reconnu par Phillips et al comme étant un marqueur potentiel du cancer du poumon. Il en est de même concernant, l'isoprène (2-méthyl-1,3-butadiène), hydrocarbure toujours présent dans le souffle et sous-produit de la synthèse du cholestérol, détecté par Poli *et al* (208) en plus grande concentration chez les patients ayant le cancer du poumon en comparaison à un groupe témoin.

3.1.2. Cancer de l'œsophage

Bien que le diagnostic de ce cancer à un stade traitable soit associé à un bénéfice significatif de survie, l'absence de symptômes « d'alarme », jusqu'à ce que la maladie soit à un stade plus avancé, contribue aux mauvaises statistiques du cancer de l'œsophage.

En effet, le traitement de l'adénocarcinome précoce de l'œsophage a rapporté un taux global de survie à 5 ans de 83% à 96%.

La première étude d'analyse de souffle pour définir les COV respiratoires dans le cancer de l'œsophage a identifié les marqueurs suivants :

- Phénol
- Phényl phénol
- Ethylphénol
- Acide hexanoïque

Ces composés présentaient des taux significativement plus élevés chez les sujets atteints de cancer de l'œsophage comparé aux témoins sains (209).

Cette observation a été confirmée dans l'étude de Kumar et al (157), la plus complète à ce jour concernant les COV respiratoires présent dans différentes formes de cancer de l'œsophage : le carcinome épidermoïde œsophagien, l'adénocarcinome œsophagien, l'œsophage de Barrett, les affections bénignes et l'adénocarcinome gastrique.

Ils ont été comparés aux témoins sains et un total de 12 COV (Tableau 23), étaient présents à des concentrations significativement plus élevées ($P < 0,05$) dans les groupes cancéreux que dans les témoins non cancéreux.

Ces composés de phénols, d'aldéhydes et d'acides gras, ont été identifiés comme étant discriminatoires pour le cancer de l'œsophage et le cancer gastrique par rapport au tractus gastro-intestinal normal (157).

Tableau 23 Composés organiques volatils caractéristiques du cancer de l'œsophage, selon Kumar et al. (157)

Phénol	Acide hexanoïque	Pentanal,	Octanal
Méthylphénol	Acide pentanoïque	Hexanal	Nonanal
Ethylphénol	Butanal	Heptanal	Décanal

3.1.3. Cancer des ovaires

Le carcinome de l'ovaire représente environ 4% des cancers diagnostiqués chez les femmes dans le monde entier.

Le taux de mortalité est élevé, supérieur à 50%, principalement en raison d'un diagnostic tardif.

Actuellement, il n'existe pas de techniques de dépistage convenables. Pourtant le cancer de l'ovaire fait partie du groupe de tumeurs malignes pour lesquelles la mortalité pourrait être considérablement réduite par un diagnostic précoce.

Horvath et al. (2008) ont démontré l'existence d'une odeur spécifique émise par les carcinomes ovariens et détectable par un chien entraîné. Cette odeur est émise aussi bien durant les stades précoces et peu avancés de carcinomes ovariens que dans les stades très avancés.

En outre, il apparaît dans cette étude que l'odeur des carcinomes ovariens semble différer de celles des autres tumeurs gynécologiques telles que celles du col de l'utérus, de l'endomètre et des cancers de la vulve.

Les biomarqueurs volatils responsables de cette odeur spécifique qui ont été mis en évidence au cours de ces études sont les suivants :

- Androstenedione
- 1-méthyl-adenosine
- 3-méthyluridine

Leurs concentrations dans les échantillons cancéreux présentaient des taux significativement augmentés.

Les chiens entraînés se sont révélés très performants en identification du cancer de l'ovaire. A travers des échantillons de sang et de tissus, ils ont présenté les résultats spectaculaires : les tests tissulaires ont montré une sensibilité de 100% et une spécificité de 95%, tandis que les tests sanguins ont montré une sensibilité de 100% et une spécificité de 98% (98).

Le même groupe de recherche a testé un « nez électronique » pour la détection du cancer de l'ovaire dans des échantillons de tissus. Conformément à la faible sensibilité de eNoses par rapport au nez du chien, l'étude Enose a suggéré une sensibilité globale un peu plus faible et la spécificité, de 84% et 87% respectivement, par rapport à la performance du chien (210).

Bien que l'étude fût petite, les résultats suggèrent qu'une détection électronique précoce du carcinome de l'ovaire peut être possible.

3.1.4. Cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus répandu chez les femmes dans le monde occidental, et le principal responsable de décès par cancer dans le monde entier, avec le cancer du poumon. Des travaux exploratoires antérieurs ont montré que des profils de marqueurs biochimiques ont été trouvés dans la respiration exhalée de patients atteints de cancers du poumon et du sein qui se distinguent de ceux des témoins

Les chiens et eNoses ont été testés pour la détection des composés organiques volatils spécifiques du cancer du sein dans des échantillons d'haleine.

Une étude au cours de laquelle les chiens de détection ont été utilisés, montrait des résultats très positifs, avec une sensibilité et une spécificité respectives de 88% et 98% (173).

Une étude plus récente, en 2010, a analysé 258 échantillons d'haleine à l'aide d'un eNose et a trouvé une sensibilité de 75% et une spécificité de 85% (211), ce qui confirme l'idée que les eNoses ne parviennent pas à la même précision que les chiens de diagnostic.

Cette dernière a permis d'identifier cinq composés organiques volatils (COV), dans l'air expiré, pouvant dépister la présence ou non de cancer du sein (212) :

- Des alcanes en C4-C20
- Des alcanes monométhylés
- Heptanal
- L'hexanal

3.1.5. Cancer de la prostate

Il s'agit du type de cancer le plus courant chez les hommes.

Actuellement l'antigène prostatique spécifique (PSA) constitue le biomarqueur sanguin le plus utilisé du cancer de la prostate. Bien que ce marqueur soit couramment utilisé, il ne peut être détecté que dans les stades avancés du cancer. La faible spécificité du test PSA dans la détection de cancer de la prostate a fait l'objet de polémiques au cours de la dernière décennie.

Ceci a conduit à rechercher un biomarqueur mieux adapté au dépistage du cancer de la prostate.

Un biomarqueur volatil a été retrouvé dans le surnageant urinaire : la sarcosine.

En effet, les composés organiques volatils (COV) se retrouvent sous forme de gaz dans la respiration humaine mais également détectés dans l'urine.

Sreekumar et son équipe ont réalisé, en 2009, le métabolome du cancer de la prostate, en utilisant la chromatographie haute performance en phase liquide et gaz, couplée la spectrométrie de masse, associée à de puissants outils bio-informatiques d'analyse (213). Ils ont ainsi pu identifier, parmi d'autres molécules présentes en quantité augmentée dans les urines, la sarcosine comme étant un métabolite essentiel dans les cancers métastatiques

de la prostate. Les individus atteints de cancer de la prostate métastatique présentaient une très forte élévation de la concentration en sarcosine, tandis que le taux de sarcosine chez les patients en bonne santé est seulement négligeable (Figure 28).

Cependant, aucun biomarqueur volatil émanant de la respiration n'a encore été associé à ce cancer.

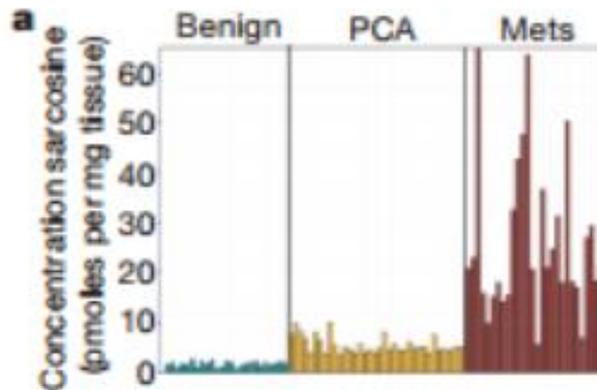


Figure 28 : Graphique représentant la concentration en sarcosine en fonction de différents tissus

3.1.6. Cancer de la vessie

Le cancer de la vessie fût le premier cancer ayant fait l'objet d'une étude mettant en évidence la capacité olfactive animale, comme outil de diagnostic. Dans des études préliminaires, les chiens ont été formés pour reconnaître le cancer de la vessie dans des échantillons d'urine ; l'étude d'évaluation formelle ultérieure a montré un taux de réussite de diagnostic de 41%, alors que sur la base d'un facteur chance un taux de réussite de seulement 14% était prévu. Une autre étude a révélé qu'un Enose a également été en mesure de distinguer les échantillons d'urine de patients sains de ceux des patients atteints d'un cancer de la vessie, avec une précision diagnostique de 100% (214).

D'après Spanel et al, (205) le formaldéhyde est également un biomarqueur volatil potentiel du cancer de la vessie.

3.1.7. Cancer colorectal

A l'heure actuelle, la coloscopie est la norme pour le diagnostic du cancer colorectal, cependant son coût élevé empêche évidemment son utilisation pour un dépistage de masse.

En termes de dépistage, les tests basés sur les selles sont plus utilisés que l'endoscopie en France, parmi eux, le test Hemocult®, et le test sanguin immunochimique fécal (FIT). Ce dernier, représente un outil de choix, en raison de son caractère non invasif, et une assez bonne spécificité mais une forte variation de sensibilité (61-91%) (215).

Ces dépistages sont rentables, par rapport à l'absence de dépistage, mais ils sont encore beaucoup trop sous-utilisés et la participation atteint rarement 70% de la population cible, c'est pourquoi la recherche continue dans le domaine de l'analyse des COV, dans le but d'élaborer de nouveaux tests plus acceptables.

Les chiens ont également été formés pour identifier le cancer colorectal.

Dans une étude, 350 échantillons de selles et de l'haleine ont été collectés et examinés par des chiens entraînés. La précision du diagnostic des chiens était très élevée, avec une sensibilité de 91% dans l'haleine et 97% dans les échantillons de selles, et une spécificité de 99% pour les deux types d'échantillons.

En comparaison, la sensibilité du test de Hemocult® varie de 25 à 44%.

Une seule étude importante pour la détection du cancer colorectal au moyen d'un Enose a été réalisée. Les Enoses sont capables de discriminer des échantillons d'haleine de patients présentant un carcinome colorectal (n = 26) à partir des échantillons de témoins sains (n = 22) au moyen de motifs de COV caractéristiques, mais une analyse de précision de diagnostic n'a pas été inclus dans ce travail.

Parmi tous les COV signalés du cancer colorectal, on retrouve :

- Le cyclohexane
- Le méthylcyclohexane
- Le 1,3-diméthylbenzène
- Le décanal

Ces derniers sont les principaux marqueurs qui peuvent être utilisés comme signature pour le dépistage du cancer colo-rectal (CCR) (216).

Altomare et al. (217) ont identifié quinze COV comme biomarqueurs potentiels existant dans l'haleine des patients atteints de cancer colorectal utilisant des techniques GC-MS pouvant être utilisées pour cribler potentiellement le CCR avec une précision de 80%.

Une autre étude, réalisée par la même équipe, a été encore plus loin dans l'investigation, en suggérant une observation prospective pour évaluer si le profil de COV chez les patients atteint de cancer colorectal change après résection curative de la tumeur et si leur nouveau profil de COV se rapproche de celui des sujets normaux.

Les auteurs ont finalement sélectionné 11 COV pertinents, et communs aux 15 COV de leur précédente exploration, pouvant être caractéristiques des patients atteints de cancer colorectal avant et après la chirurgie.

Les 11 COV commun avec leur étude précédente sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Analytes	Chemical Class
1,2-pentadiene	Alkenes
2-methylbutane	Alkanes
3-methylpentane	Alkanes
methylcyclopentane	Alkanes
cyclohexane	Alkanes
decanal	Aldehydes
nonanal	Aldehydes
methylcyclohexane	Alkanes
4-methyl-2-pentanone	Ketons
1,4-dimethylbenzene	Aromatics
1,3-dimethylbenzene	Aromatics

3.1.8. Mélanome

La détection olfactive canine de la malignité humaine est un phénomène bien documenté. Williams et Pembroke ont rapporté le premier cas de détection olfactive canine sur un mélanome malin en 1989 (163). Le chien d'une patiente, un croisement Border Collie-Doberman, reniflait à plusieurs reprises la lésion de la patiente, même à travers les vêtements. Ce comportement a incité sa propriétaire à consulter un dermatologue. Ce dernier a diagnostiqué un mélanome malin disséminé superficiel, par chance, encore au stade curable. Les auteurs ont supposé que ce phénomène caractérisée une origine olfactive intrigante et singulière.

Un autre cas, concernant un homme de 75 ans dont le chien de compagnie léchait de façon persistante une lésion asymptomatique derrière son oreille droite. Le patient en ignorait même l'existence. Le chien, dont l'histoire et l'âge exact étaient inconnus, avait été acquis dans un centre de secours 4 ans auparavant (218).

A la suite de ces épisodes anecdotiques, fût réalisée une étude avec un chien comme moyen de diagnostic pour ce type de cancer. Ce fut la première étude où les chiens avaient été formés pour renifler de façon directe des patients dans une clinique, au lieu d'un échantillon de matrice (matières fécales, l'urine, la respiration, etc.) (219). Des échantillons de mélanome ont été cachés dans des bandages sur les bénévoles et les chiens ont eu raison de leur évaluation dans 75-86% des cas.

Trois ans plus tard, une étude a abordé la détection du mélanome dans des échantillons de tissus (n = 57), à l'aide d'un « nez électronique » et a trouvé une sensibilité et une spécificité de 70% et 90%, respectivement.

Cet article a permis de démontrer qu'il existe une preuve d'une signature métabolique du mélanome grâce à une combinaison HS-SPME avec GC / MS. Bien que la plupart des substances volatiles présentes dans le nœvi (tissus sain) ont été également retrouvées dans le groupe mélanome, 21 d'entre eux présentaient un taux de concentration significativement différent de substances volatiles (Tableau 24).

Parmi les composés détectés dans les deux échantillons, huit ont plus que doublé en 24 heures. Ces composés étaient :

- 1-hexanol 2-éthyl-;
- Le 3-méthylbenzothiophène;
- Ester butylique d'acide acétique;
- Phtalate de diéthyle; Hexane 3,3-diméthyl-;
- Limonène;
- Oxime- méthoxy-phényl-1 et
- phénol 2,4-bis (1-méthyléthyl) -acétate.

En résumé, la présence augmentée d'alcane méthylés et de benzènes peut indiquer un processus de méthylation accru dans le mélanome, ainsi que de métabolites secondaires à la peroxydation lipidique membranaire, comme des alcanes (nonane, décane, undécane, dodécane, tridécane), des alcènes (décène, tridécène), des aldéhydes (propanal, butanal), peut être un indicateur de stress oxydatif.

Tableau 24 Liste des 21 COV détectés dans les échantillons de mélanome en quantité anormalement élevée en comparaison aux tissus sains (Abaffy 2010)

Groupes	Composés
Hydrocarbures aliphatiques saturés	Nonane 4-méthyldécane 1-Tridecene
Hydrocarbures monocycliques insaturés	Cyclohexène, 3-methyl-6-(1-methylethenyl)-, (3R-trans)- (E-isolimonene)
Hydrocarbures aromatiques	Cumène (isopropylbenzène) 1,2,3-Trimethylbenzène Triméthyl-1,2,4benzène 1ethyl-2-methylbenzène (ethyltoluène) 1-ethyl-3methylbenzène 1-ethyl-4-methylbenzène Styrène (vinyl benzène)
Ester	Phthalate de Benzyle et de Butyle
Aldéhydes	Butanal
Sulfones	Diméthylsulfone
Hétérocycles nitrogènes	Indole
Amines	2-méthylaziridine(éthylènimine)
Alcools	Dodécanol Hexadécanol 1-Tridécanol 1-Pentadecanol

3.2. ANALYSE DE LA RESPIRATION EN PRATIQUE CLINIQUE

3.2.1. Les tests d'haleine

Malgré l'avancée scientifique au cours de ces trois dernières décennies concernant la recherche de nouveaux biomarqueurs issus de l'haleine, peu de tests respiratoires ont fait la transition de la recherche vers la pratique clinique.

Plusieurs raisons expliquent ce bilan. Parmi elles, le manque de standardisation des techniques mis en œuvre pour la détection de traces de COV paraît être un facteur majeur.

L'autorisation de mise sous le marché de tests d'haleine supplémentaires utilisables en médecine clinique attirera et motivera plus de chercheurs à persévérer dans cette voie de recherche.

3.2.1.1. Tests disponibles à l'étranger

Aux Etats-Unis, la Food and Drug Administration (FDA) a approuvé six tests relatifs à la recherche de marqueurs spécifiques à diverses affections et à l'identification des déficiences enzymatiques du métabolisme des médicaments (Tableau 25) :

- Test respiratoire à l'oxyde nitrique (NO) expiré dans le suivi de l'asthme
- Test de Heartsbreath® pour le rejet de greffe cardiaque (220)
- Test respiratoire à l'urée-13C pour le diagnostic de l'infection à *Helicobacter pylori*
- Capnographie dans le cadre du monitoring du CO₂
- Tests d'haleine d'hydrogène pour la prolifération bactérienne de l'intestin grêle
- Test de Diagnostic de vidange gastrique retardée GEBT 13-spiruline

Tableau 25 : Exemples de tests respiratoires approuvés par la FDA (58)

Molécules d'intérêt	Indication	Nom du produit	Technique	Fabricant	Date d'approbation de la FDA
¹³ CO ₂ / douze CO ₂	Infection à <i>H. pylori</i>	BreathTek UBT pour le kit <i>H. pylori</i> (kit BreathTek UBT) et l'application de calcul du taux d'hydrolyse de l'urée pédiatrique (pUHR-CA), version 1.0	Spectrophotométrie infrarouge	Otsuka America Pharmaceutical, Inc. (OAPI)	22 février 2012
NON	Asthme et inflammation des voies respiratoires	NIOX MINO	Capteur électrochimique	Aerocrine	3 mars 2008
CO	Empoisonnement au monoxyde de carbone	ToxCO	Capteur électrochimique	Bedfont Scientific Ltd	21 février 2008
H ₂	Malabsorption du lactose	Dispositif de surveillance de la respiration Micro H ₂ avec l'utilitaire logiciel Hydra	Capteur électrochimique	Micro Medical Ltd	19 mai 2004
Alcanes (C4-C20)	Rejet d'allogreffé cardiaque de grade 3	Heartsbreath	GC-MS	Menssana Research, Inc.	24 février 2004
NON	Asthme et inflammation des voies respiratoires	NIOX ^R	Chemiluminescence	Aerocrine	30 avril 2003

3.2.1.2. Tests disponibles en France

a) Capnographie

La capnographie est le tracé de la concentration de CO₂ dans l'air expiré par un patient au cours d'une respiration spontanée.

Le CO₂ reflète fidèlement la ventilation du patient, et sa mesure est indispensable au clinicien pour surveiller un patient qui hypo- ou hyperventile (221).

Cet examen est indiqué dans le cadre de :

- La surveillance du débit cardiaque

- La vérification du bon positionnement d'une intubation endotrachéale : la présence de CO₂ dans l'air expiré sur plusieurs respirations par un patient venant d'être intubé est une preuve fiable de la présence du tube endotrachéal dans la trachée.
- Le monitoring de l'état de conscience du patient lors d'une intoxication médicamenteuse aiguë
- Le diagnostic d'exclusion de l'embolie pulmonaire : il s'agit là d'une indication particulière où le CO₂ expiré est utilisé comme aide au diagnostic (222).

Une courbe de capnographie normale augmente rapidement en début d'expiration pour atteindre un plateau à environ 40 mmHg de CO₂. La courbe revient à une valeur de 0 mmHg à chaque inspiration, car il n'y a virtuellement pas de CO₂ dans l'air inspiré (131).

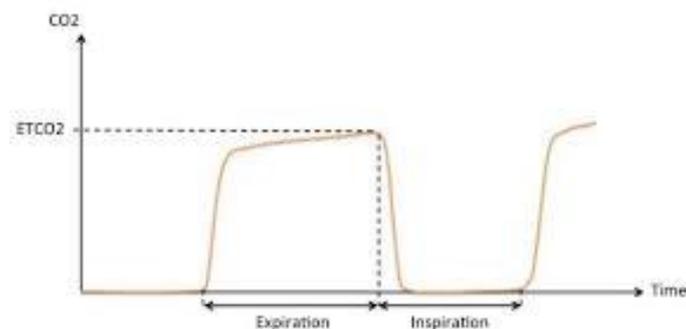


Figure 29 : Courbe de capnographie et ses différentes phases (221)

- Début expiration : élimination de l'espace mort anatomique ne contenant pas de CO₂
- Phase ascendante : fin de l'espace mort, début des gaz alvéolaires
- Phase de plateau : fin d'élimination des gaz alvéolaires
- Début inspiration : retour du CO₂ à 0

L'apport bénéfique de la capnographie en médecine préhospitalière est démontré que ce soit lors des procédures d'intubation, de la réanimation de l'arrêt cardiaque ou de l'optimisation de la ventilation du traumatisé crânien (221).

b) Mesure du NO expiré pour le suivi du contrôle de l'asthme

Des modifications de la production de NO sont observées au cours d'événements allergiques, d'une modification de traitement et en cas d'hyperréactivité bronchique ou anatomopathologiques (éosinophilie, marqueurs de remodelage bronchique) caractérisant les phénotypes atopiques (223).

Il a notamment été observé une augmentation de la concentration de NO dans le gaz expiré au cours de la maladie asthmatique et à l'inverse une diminution lors du traitement corticoïde (Tableau 26).

La mesure du NO expiré fait partie des technologies de santé diagnostiques visant à quantifier l'inflammation des voies respiratoires. En effet, l'inflammation pulmonaire entraîne une forte augmentation de la synthèse de NO par les cellules inflammatoires. Par sa nature gazeuse, le NO produit par les cellules pulmonaires est présent dans les volumes d'air parcourant les voies respiratoires, diffusant du milieu le plus concentré vers le milieu le moins concentré. Une forte production de NO par les cellules pulmonaires se traduit par une présence accrue de NO dans l'air expiré. De ce fait, une concentration élevée de NO dans l'air expiré est fréquente lors d'une inflammation, aiguë ou chronique, affectant les voies respiratoires (asthme, bronchites aiguës virales ou bactériennes, pneumopathies infectieuses, maladies systémiques auto-immunes avec une atteinte pulmonaire).

L'hypothèse de l'utilisation de la mesure du NO en tant qu'outil non invasif d'évaluation de l'atopie, notamment au cours de l'asthme allergique, a donc été envisagée.

Tableau 26 : Associations entre variations de NO expiré et caractéristiques de la maladie asthmatique.

Clinique	Inflammation allergique	Fonction respiratoire
Augmentation en cas de symptômes [27, 28, 33, 34]	Association avec les marqueurs atopiques IgE [35, 36], tests cutanés [37]	Corrélation avec la variabilité du débit expiratoire de pointe [21, 29]
Augmentation durant la crise aiguë [7, 38-40]	Augmentation durant l'exposition allergénique Acariens [36, 41], Pollens [42]	Corrélation avec le degré d'HRB [15, 26, 43, 44]
Diminution sous traitements corticoïdes oraux [7] corticoïdes inhalés [29, 45-47] antileucotriène [30, 48] intérêt dans l'adaptation du traitement [31]	Corrélation avec l'éosinophilie Expectoration [49], Biopsie bronchique [23, 50] Corrélation avec ECP et EPX [49] Corrélation avec remodelage [23]	Corrélation avec le trouble ventilatoire obstructif [23, 51]

Note : les valeurs de NO expiré ne sont pas reportées du fait de différences méthodologiques (choix du débit durant la mesure).

Des mesures séquentielles constituent probablement un moyen simple de monitoring individuel de la maladie et devraient aider le clinicien à repérer les phases nécessitant un ajustement thérapeutique ou au contraire autorisant l'essai d'une décroissance thérapeutique.

De nombreux arguments indiquent que la mesure du NO expiré est un outil descriptif performant du contrôle de la maladie asthmatique.

En mars 2015, la HAS a procédé à une analyse de la littérature, et considère que les données actuellement disponibles ne sont pas suffisamment probantes pour préconiser la prise en charge par la collectivité de la mesure du NO dans l'air expiré pour le diagnostic ou le suivi de l'asthme. En conséquence, la HAS donne un avis défavorable à l'inscription de la mesure de la fraction expirée du monoxyde d'azote (FeNO) sur la Liste des actes et prestations. Le service attendu de cet acte a été estimé insuffisant (224).

c) Test respiratoire à l'urée-13C pour le diagnostic de l'infection à *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori est une bactérie qui infecte la muqueuse gastrique et peut causer plusieurs maladies plus ou moins graves suivant les individus. Parmi elles, les ulcères gastriques et/ou duodénaux se traduisant par une douleur chronique ou une gêne dans le tractus gastro-intestinal supérieur.

Un test non invasif a été développé pour détecter cette bactérie dans un échantillon d'haleine : le test respiratoire à l'urée marquée au carbone 13 (UBT ¹³C), fondé sur une propriété de la bactérie qui, grâce à une enzyme très puissante, peut transformer l'urée en ammoniac et en gaz carbonique (CO₂), ce dernier passe ensuite dans le sang et est éliminé dans l'air expiré (225).

Il représente une alternative aux tests invasifs utilisés pour le diagnostic d'*Helicobacter pylori*, tels que l'endoscopie avec biopsie (culture, test rapide à l'uréase, histologie).

Il existe néanmoins d'autres tests moins invasifs pour le diagnostic d'HP, tel que le test sérologique, qui repose sur la détection d'anticorps dans le sang, et le test de détection de l'antigène dans les selles (226).

La plupart de ces tests (à part le test au carbone 13) perdent en sensibilité en cas d'hémorragie digestive d'origine gastrique ou duodénale (227). De même, le test au carbone 13 peut être faussé en cas de prise d'inhibiteurs de la pompe à protons qui doivent être arrêtés idéalement deux semaines avant le test (227).

Une revue portant sur l'analyse de 19 études utilisant le test au carbone 13 pour diagnostiquer *Helicobacter*, démontre une sensibilité et une spécificité assez élevée pour ce type de test, respectivement de 95,1% et de 98,1% (228).

Il existe à ce jour plusieurs spécialités ayant une AMM pour le diagnostic *in vivo* de l'ulcère gastrique et ou duodéal induit par une infection à *H. pylori* (Tableau 27).

Tableau 27 : Tests respiratoires à l'urée marquée au C^{13} ayant une AMM en France (229)

DCI	Spécialité	Forme pharmaceutique Voie d'administration	Commercialisation	Indication
Urée ^{13}C 75 mg	Helicobacter Test INFAL®	Poudre pour solution buvable Voie orale	Non	Helicobacter Test INFAL peut être utilisé pour le diagnostic <i>in vivo</i> d'infection gastroduodénale à <i>Helicobacter pylori</i>
Urée ^{13}C 100 mg	Pylobactell®	Comprimé soluble Voie orale	Non	Ce médicament est à usage diagnostique uniquement. Pour le diagnostic <i>in vivo</i> de l'infection gastro-intestinale induite par <i>Helicobacter pylori</i> .
Urée ^{13}C 100 mg	Ubit 100mg®	Granulés à dissoudre dans 100ml d'eau Voie orale	Non	Diagnostic <i>in vivo</i> de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i>

d) Tests d'haleine d'hydrogène pour la prolifération bactérienne de l'intestin grêle

Dans les années 1980, deux Américains en poste à la NASA, M.D. Levitt et J.H. Bond, effectuent des travaux à la recherche de moyens pouvant limiter les gaz intestinaux émis par les astronautes. Ces travaux ont permis de connaître la physiologie d'un gaz intestinal, l'hydrogène (H_2), et de développer les tests respiratoires à l'hydrogène (230).

Ces tests, également appelé tests de sensibilité au lactose, sont utilisés dans le diagnostic de la malabsorption des hydrates de carbone, de la prolifération bactérienne de l'intestin grêle, ainsi que pour mesurer le temps de transit oro-caecal.

La malabsorption des glucides est un déclencheur clé des symptômes de type syndrome du côlon irritable (SCI) tels que la diarrhée et / ou la constipation, les ballonnements, les flatulences, les maux de tête et le manque d'énergie (231).

Pour rappel, les molécules de sucre, non absorbés via le transporteur Glut-5-Transporter, sont d'abord décomposés en acides gras à chaîne courte (SCFA), en dioxyde de carbone (CO_2) et en l'hydrogène (Figure 30), dans le cadre d'une réaction de fermentation.

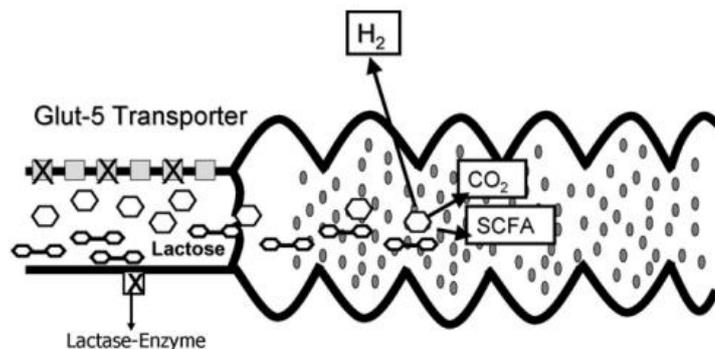


Figure 30 : Réaction de fermentation du lactose dans les intestins de sujets atteints de malabsorption du lactose

Une partie de l' H_2 produit dans le côlon sert à réduire le gaz carbonique (CO_2) pour produire un troisième gaz fermentaire, le méthane (CH_4).

H_2 et CH_4 , gaz produits par fermentation bactérienne des glucides intestinaux non absorbés, sont ensuite excrétés dans l'haleine.

En cas de malabsorption intestinale de ces sucres, une partie de la dose ingérée parvient dans le côlon et l'H₂ expiré augmente (Figure 31). La malabsorption intestinale du lactose (alactasie, déficit primitif congénital ou acquis en lactase, déficit secondaire à une maladie entérocytaire) est fréquente en France ; celle du saccharose (déficit congénital en sucrase-isomaltase) est exceptionnelle (230).

De plus, ces tests appuient leur fondement sur le fait physiologique que les humains en bonne santé à jeun et au repos n'exhalent pas d'hydrogène.

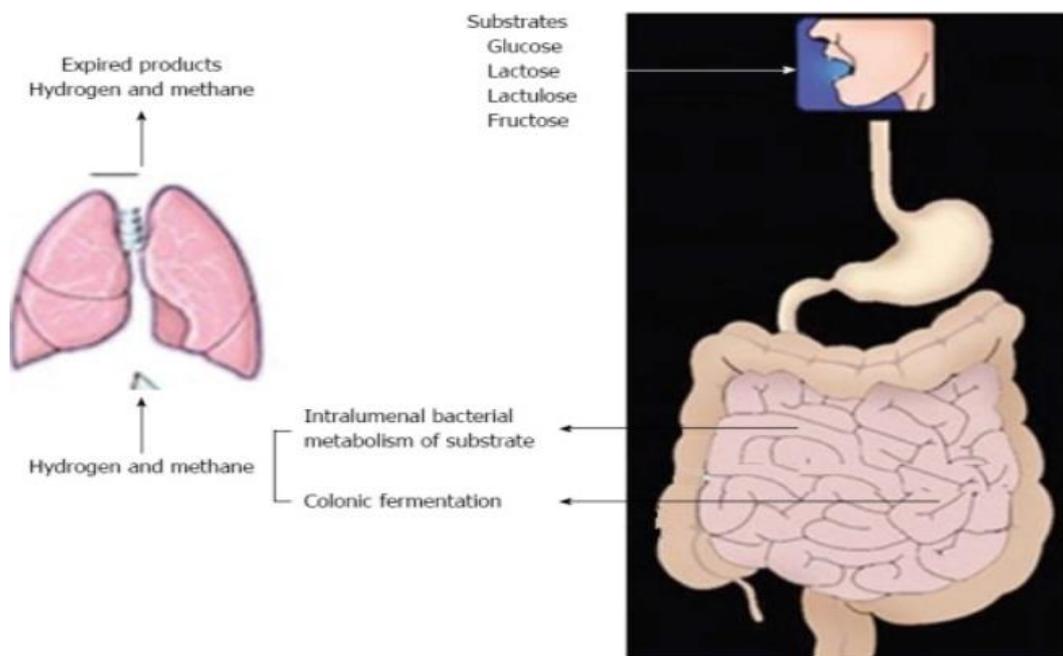


Figure 31 : Schématisation de la malabsorption des hydrates de carbones (231)

Les indications du test respiratoire à l'hydrogène sont :

- La recherche d'une malabsorption intestinale d'un glucide,
- La détermination du temps de transit oro-cæcal,
- La recherche d'une pullulation microbienne dans l'intestin grêle.

La sensibilité et la spécificité du test respiratoire sont excellentes, ainsi les dosages enzymatiques sur biopsies intestinales ne sont plus nécessaires, et les résultats du test suffisent à poser un diagnostic.

e) Test de Diagnostic de vidange gastrique retardée (GEBT)

Utilisé comme une aide dans le diagnostic de la vidange gastrique retardée (gastroparésie) chez les adultes symptomatiques. Les principales causes de gastroparésie sont la maladie diabétique et les séquelles de la chirurgie oeso-gastrique. Elle peut être post-infectieuse chez certains malades. La gastroparésie est fréquemment idiopathique (232)

Elle est habituellement diagnostiquée par examen scintigraphique. Néanmoins étant donnée l'invasivité de cet examen, une alternative est proposée par un test respiratoire à l'acide octanoïque marqué par un isotope stable, non radioactif, du carbone, le ^{13}C (10).

Pour ce faire, un repas test à base de jaune d'œuf, préparé comme un œuf brouillé, dans lequel a été introduit l'acide ^{13}C -octanoïque, ainsi qu'un deuxième marqueur, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ colloïde Tc-albumine, est ingéré par le patient.

Son principe implique une fixation stable de l'acide octanoïque au jaune d'œuf du repas test pour marquer la phase solide du repas. La dissociation de l'acide octanoïque du jaune d'œuf lors du passage dans le duodénum sous l'action de la lipase pancréatique conduit à une absorption duodénale puis une oxydation hépatique de l'acide octanoïque marqué qui conduit à une libération de $^{13}\text{CO}_2$ dans l'air expiré (Figure 32).

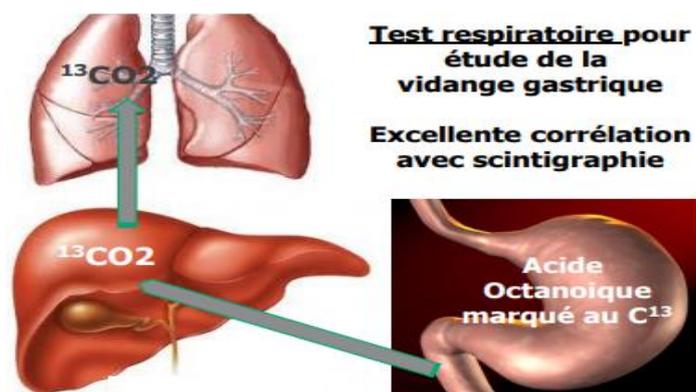


Figure 32 : Principe du test respiratoire pour le diagnostic de la gastroparésie

Dans une autre alternative, le repas-test standardisé comprend 100 mg de ^{13}C - *Spirulina platensis* et du colloïde de soufre $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (test GEBT 13-spiruline) (233).

Le résultat du test exprime la cinétique d'élimination du $^{13}\text{CO}_2$ dans les gaz expirés par voie respiratoire sur une période habituelle de 4 heures après la prise du repas test (234).

Ce test, validé par plusieurs équipes, permet de mesurer, avec une précision comparable à la scintigraphie, la vidange gastrique des solides ((235).

Une étude affirme que le GEBT (Gastric emptying breath test) est plus sûr que la scintigraphie parce qu'il n'implique aucune exposition aux rayonnements, ce qui est avantageux si des évaluations répétitives sont nécessaires à des fins de recherche ou cliniques, notamment chez les femmes enceintes ou allaitantes et chez les enfants (233).

f) Intoxication éthylique aiguë

L'imprégnation alcoolique est détectée dans air expiré à l'aide d'un alcootest (ou éthylotest).

Il permet d'évaluer l'alcoolémie en mesurant le taux d'alcool dans l'air expiré.

Ce test est effectué de façon systématique en cas d'infraction ou accident de la route impliquant un décès.

Il existe deux types d'éthylotest :

- Les éthylotests chimiques, les plus couramment utilisés, nécessitant de souffler dans un ballon, et composés d'un réactif changeant de couleur selon le taux d'alcool dans l'air expiré
- Les éthylotests électroniques qui comportent une sonde sensible au taux d'alcool dans l'air expiré

L'éthylotest électronique mesure le taux d'alcool contenu dans l'haleine humaine et affiche l'alcoolémie en g/l ou en ‰.

3.2.2. La recherche dans le diagnostic respiratoire

3.2.2.1. *Regard sur les groupes de recherche les plus actifs dans le diagnostic respiratoire*

Depuis l'émergence des connaissances du potentiel de l'analyse de la respiration, de nombreuses compagnies se sont lancées comme mission la conception d'outils technologiques dans le but de rendre l'analyse de la respiration accessible à une pratique clinique quotidienne.

La détection précoce des cancers qu'offre l'analyse des COV expirés dans l'haleine, a pour enjeux de réduire le recours des patients à des examens médicaux plus coûteux, invasifs, voire potentiellement risqués pour certains d'entre eux.

a) Menssana Research



Menssana Research est le principal développeur de nouveaux tests d'haleine avancés pour la détection de maladies humaines.

Fondée par un professeur de médecine clinique de New-York, le docteur Michael Phillips, pionnier en matière de recherche sur les tests respiratoires appliqués à la médecine ; il a d'ailleurs à son actif plus d'une cinquantaine de publications à ce sujet (236).

Depuis 2004, Menssana Research propose aux médecins un test de rejet de greffe cardiaque approuvé par la FDA, le test Heartsbreath MC® (237).

Plus récemment, la start-up a recueilli des fonds pour développer une méthode de collecte d'échantillons d'haleine qui peut être combinée à une analyse rapide en ambulatoire avec obtention de résultats instantanés, grâce à leur système BreathLink® et BreathBag®, facilitant ainsi la collecte d'échantillons en dehors des environnements cliniques (238).

Leur système de collecte des échantillons d'haleine, nommé BCA et le BreathLink™, sont tous deux largement utilisés en tant qu'appareil de prélèvement d'air portatif pour plusieurs études cliniques (239).

De nombreuses études multicentriques en aveugle, financées par une subvention de 2 millions de dollars par le National Cancer Institute, portant sur l'identification du cancer du sein, de la tuberculose pulmonaire, du cancer du poumon, du virus de la grippe, ou encore sur la recherche de radio-contamination thérapeutique, sont en cours.

L'approbation de la FDA de ces nombreux tests, ayant fait l'objet de plusieurs publications, est actuellement en cours d'évaluation.

b) Owlstone medical



Fondée en 2005 par un groupe de l'Université de Cambridge, Owlstone est une entreprise ayant développé le système FAIMS (Field Asymétrique Ion sur Mobilité Spectrometry), un détecteur sous forme de micro-puce.

Leur système permettant la détection chimique de composés volatils est actuellement vendu dans les domaines militaires et industriels à travers le monde entier, et pourrait s'étendre dans le domaine médical, afin de détecter les biomarqueurs de maladie dans la respiration.

En 2016, un financement de 31,5 millions de dollars leur a été attribué afin de développer leurs technologie FAIMS dans les applications de diagnostic médical. Ainsi, Owlstone Medical développe actuellement des tests pour identifier le cancer du poumon et colorectal, deux des cancers les plus diagnostiqués dans le monde, et pour le suivi du contrôle de la réponse thérapeutique de l'asthme.

La plate-forme Breath Biopsy® propose de remplacer la biopsie classique par la biopsie dite « respiratoire » (240).

A l'aide de leur plateforme, la société propose également des produits et services à des partenaires académiques, cliniques et pharmaceutiques, en mettant à disposition des kits de biopsie prêt à l'emploi (Figure 34), la location de l'échantillonneur Reciva® (Figure 33), ainsi que des services d'interprétation de données, en passant directement commande sur leur site Web (241). Plateforme sollicitée par des grands laboratoires, comme Astra Zenica ou GSK en 2018, pour utiliser ces outils au cours d'essais cliniques (242,243).



Figure 33 : Echantillonneur RECIVA



Figure 34 Kit de collecte de biopsie du souffle

Dans cette démarche, la société vise à introduire une nouvelle modalité diagnostique non invasifs via l'haleine.

D'autre part, leur technologie d'analyse et d'échantillonnage de l'haleine ReCIVA Breath Sampler a été primé invention de l'année dans le cadre des 50 meilleurs prix de la santé numérique en 2017 (244).

Le système est actuellement déployé dans le cadre de l'essai clinique LuCID d'Owlstone Medical pour la détection du cancer du poumon (245).

Projet en cours : étude LuCID (246)

Cette étude à grande échelle vise à développer un test respiratoire pour la détection précoce du cancer du poumon. LuCID est le plus important essai clinique au monde basé sur la respiration, avec 4 000 patients recrutés dans 26 hôpitaux en Europe.

Il s'agit d'un essai prospectif multicentrique pour le dépistage du cancer du poumon.

Financé par un contrat de développement du NHS, Owlstone Medical mène des recherches sur le diagnostic du cancer du poumon en mesurant les composés organiques volatils (COV) dans l'haleine expirée des patients. La phase I du projet est terminée et la phase II est en cours.

La technologie FAIMS utilisée dans cette étude peut détecter des biomarqueurs avec une sensibilité prometteuse (détection de concentrations seuil dix fois plus faibles que précédemment signalées). Une première analyse a identifié que l'introduction réussie d'un programme de dépistage du cancer du poumon utilisant ReCIVA et FAIMS pourrait sauver environ 3 200 vies par an et £ 82M dans les coûts de traitement au Royaume-Uni.

La deuxième phase de l'étude, financée par une subvention SBRI de £ 1,1 million du National Health Service du Royaume-Uni, vise à valider la détection de biomarqueur du cancer du poumon par FAIMS dans la pratique clinique. La phase finale de l'étude sera un essai de dépistage basé sur la population.

c) Breath diagnostic



Breath Diagnostics est une Compagnie américaine, fondée en 2014 par le Dr Bousamra, chirurgien thoracique et le Dr Nantz, ancien professeur de chimie.

Cette start-up a développé un appareil de diagnostic respiratoire pour le cancer du poumon.

Selon une étude menée par l'équipe scientifique de la société au titre d'essai préclinique, portant sur plus de 700 patients, leur outil de technologie breveté, nommé OneBreath®, démontre une sensibilité de détection du cancer des poumons de 93,6% et une spécificité de 77% pour distinguer les nodules pulmonaires bénins des tumeurs malignes, ce qui représente une meilleure précision que les technologies radiographiques actuelles (247).

Il a été de plus observé que les marqueurs du cancer de la respiration se sont normalisés après l'ablation chirurgicale de la tumeur, validant ainsi ces marqueurs comme indicateurs du cancer (248).

Le test est assez facile d'utilisation. Les patients respirent un litre d'air dans un sac en plastique qui est ensuite relié à une pompe à vide, puis analysé par spectrométrie de masse.

En avril 2016, leur test de diagnostic breveté, leur a valu de remporter le premier prix du concours JUICE GameChanger qui récompense les meilleurs nouveaux dispositifs (249).



OneBreath semble idéalement adapté pour la détection du cancer des poumons, pour différencier les nodules pulmonaires bénins des nodules malins, ainsi que pour surveiller la récurrence après résection chirurgicale.

C'est d'ailleurs le souhait de l'entreprise d'utiliser le test *OneBreath* pour le dépistage massif du cancer du poumon, à l'échelle mondiale (250). En attendant, les résultats des études de validation clinique, une demande d'approbation auprès de la FDA est en cours.

d) Fossil Ion Tech



Fossil Ion Tech est une start-up espagnole fondée en 2015, ayant développé un Spectromètre de masse surnommé le SUPER SESI (SESI pour ionisation par électro pulvérisation secondaire), qui utilise 11 technologies brevetées pour produire un nuage d'ions chargeant les molécules de vapeur au moment du contact.

La procédure est effectuée à haute température pour permettre une meilleure détection des espèces à faible volatilité qui ont une plus grande importance biologique (tous les COV ne restent pas en phase gazeuse à température ambiante) (251).

Cette compagnie met à disposition une série de « SUPER-SESI » pour les laboratoires et les instituts de recherche (exemple de SUPER SESI Figure 35).



Figure 35 : SUPER SESI marquage CE et sortie commerciale du premier modèle en 2017

Grâce au développement et à la commercialisation de leurs systèmes SESI et IMS, la compagnie espère étendre l'applicabilité de la spectrométrie de masse dans l'arène clinique. Dans ce sens, ils participent depuis 2015, au projet ACID à l'ETH-Zurich, dont l'objectif principal est de développer de nouvelles instrumentations pour la caractérisation d'analytes en phase gazeuse à haute sensibilité et en temps réel (252).

e) Breathtec Biomedical

Fondée en 2015, la société canadienne Breathtec Biomedical exploite la même technologie FAIMS qu'utilise Owlstone Medical. L'équipe a affiné cette méthode pour proposer un dispositif sensible, bon marché et portable (Figure 36).



Figure 36 : Dispositif BreathTec

La mission que s'est donnée Breathtec (253) est de développer un appareil portatif peu coûteux, non invasif, portatif, et d'en faire une des technologies qui utilisent les biomarqueurs respiratoires pour dépister les signes précoces de maladies telles que les cancers du poumon et du sein, les maladies infectieuses, le diabète, les maladies du foie, etc., destiné à être utilisés par les médecins en cabinet de ville, au chevet du patient ou en milieu hospitalier, ou par des agents de dépistage des maladies infectieuses aux points d'entrée frontaliers (aéroport, douane,...).

f) SYFT Technologies

SYFT Technologies, groupe développé à l'Université de Canterbury en Nouvelle-Zélande, constitué de chimistes, de physiciens, de mathématiciens et d'ingénieurs, a été créée, en 2002.

Leur système est fondé sur la spectrométrie de masse à tube à écoulement ionique (SIFT-MS). Il s'agit d'une forme de spectrométrie de masse directe qui analyse les composés organiques volatils (COV) dans l'air en appliquant une ionisation chimique douce avec des limites de détection faibles (parties par billion).

L'analyse quantitative est réalisée en temps réel, éliminant ainsi les étapes de préparation de l'échantillon, de pré-concentration et de chromatographie.



Figure 37 : Appareil « Voice200ultra »

La société détient une bibliothèque contenant les paramètres de détection et de quantification pour plus de 1000 composés.

g) Groupe de recherche LNBD



La recherche LNBD combine des connaissances provenant de divers domaines, dont la microélectronique, la nanotechnologie, la micro-fluidique, l'apprentissage automatique, la biochimie, la médecine et la génétique.

Grâce à cette multidisciplinarité, le laboratoire développe de nouveaux dispositifs / capteurs à l'état solide et flexibles, ainsi que des nanoréseaux sensoriels électroniques pour une application dans divers domaines (254).

Ce groupe de recherche exerçant au Technion, l'Institut de technologie d'Israël, se concentre principalement sur l'application de dispositifs à base de nanomatériaux aux besoins de la médecine clinique, sous forme de capteurs non invasifs, capables de détecter les maladies.

Ces efforts sont réalisés à partir de deux principaux domaines de recherche : les dispositifs à base de nanomatériaux et la volatolomique).

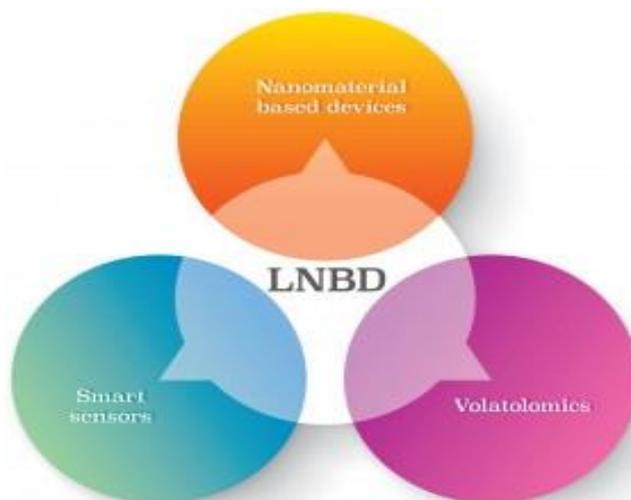


Figure 38 : Principe du groupe de recherche LNBD

Pour rappel, la volatolomique est l'étude scientifique à grande échelle des processus chimiques impliquant des composés organiques volatils. Le LNBD effectue des recherches fondamentales et appliquées dans des études de biomarqueurs volatils dans des domaines tels que la médecine, la sécurité et l'alimentation.

Ce groupe de recherche est présidé par un professeur de génie chimique reconnu dans le monde entier, le Pr Hossam Haick, (255).

Expert dans le domaine de la nanotechnologie appliquée au champ médical et du diagnostic des maladies non invasives, sa contribution au développement d'un nez nano-électronique (le Na-NOSE), lui a valu un grand nombre de subventions et récompenses prestigieuses (256), comme le prix d'excellence Marie Curie de l'Union européenne, le prix du Conseil Européen de la Recherche et le prix du *Discovery Program* de la Fondation Bill-et-Melinda-Gates, etc...

En 2008 Hossam Haick a été classé comme l'un des 35 innovateurs les plus prometteurs au monde par le *MIT Technology Review* (257). Il est également expert scientifique à la Commission européenne.

Auteur de plus de 170 publications dans le domaine de la nanotechnologie et des matériaux avancés appliqué au domaine médical (258), dont l'article le plus lu de l'ACS en 2017 : « *Diagnosis and classification of 17 diseases in 1404 subjects by the analysis of expired models of molecules* » (259). Il détient plus de 28 brevets pour ses inventions et participe à de nombreux projets interdisciplinaires et études cliniques (Tableau 28), dans l'avancé de l'analyse respiratoire.

Tableau 28 Exemples de projets du LNBD (259)

PROJET EN COURS	PRINCIPE
SNIFFPHONE	Connecteur pour téléphone pour la détection de la maladie à partir de souffle expiré
LLMASENSE	Test non invasif pour le suivi des patients avec des nodules pulmonaires détectés par scanner
GCE-II	Patch adhésif auto-administré pour la détection de la tuberculose
VOLGACORE	Biomarqueurs volatils pour la détection précoce et la caractérisation des néoplasmes gastriques et colorectaux
BIRAX	Test de diagnostic rapide de la maladie de Parkinson pour déterminer les mécanismes sous-jacents et les thérapies régénératives possibles
DIAG-CANCER	Diagnostic, dépistage et surveillance des maladies cancéreuses par souffle expiré à l'aide d'un réseau de nanocapteurs
NANOSE	Un nez artificiel à l'échelle nanométrique pour détecter facilement les biomarqueurs volatils aux stades précoces pour 17 cancers et maladies.

h) IABR



L'Association internationale de recherche sur la respiration (IABR), organise des réunions internationales annuelles sur les dernières innovations en matière d'analyse de la respiration. La conférence « Analyse du gaz respiratoire pour les diagnostics médicaux », fût la première conférence internationale traitant de l'analyse de l'haleine.

Fondée en 2004, par le professeur Anton Amann, chimiste Autrichien et professeur de chimie à l'Université médicale d'Innsbruck, il fût pendant de longues années à la tête de l'Institut de recherche respiratoire de l'Académie autrichienne des sciences.

En 2007, Anton lance le premier journal consacré uniquement à la recherche sur l'haleine en Europe et aux États-Unis, le Journal of Breath Research (JBR), diffusé par IOP Publishing. Il fût rédacteur en chef jusqu'à son décès en 2015.

Considéré comme pionnier dans la recherche sur l'analyse de la respiration, il est l'auteur de plus de 150 articles scientifiques.

Un numéro spécial du JBR lui a d'ailleurs été dédié suite à son décès, recueillant des articles sur les dernières avancées en matière de recherche sur l'haleine (260).

Pour réaliser ces programmes ambitieux et novateur, Anton équipe son laboratoire d'une gamme complète de spectromètres de masse de pointe (PTR-TOF MS, TD GC-TOF MS, SIFT-MS, IMS, etc.), offrant ainsi à son groupe de recherche la possibilité d'employer une variété d'instrumentation analytique pour étudier le volatilome humain (260)

Les objectifs de l'IABR sont les suivants :

- Organiser des réunions internationales de recherche sur l'haleine ;
- Accroître la coopération et la collaboration des groupes de recherche travaillant sur l'analyse de l'haleine à travers l'Europe et le monde ;
- Encourager et soutenir de jeunes chercheurs ou de nouveaux chercheurs dans le domaine de l'analyse de la respiration en leur offrant un prix : le prix d'Anton Amann ;
- Établir des efforts de collaboration pour comparer les résultats obtenus par différentes techniques analytiques utilisées par les groupes de recherche ;

- Fournir une base de données accessible sur Internet regroupant des substances volatiles, leurs propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques et leur intérêt dans des applications médicales.

L'IABR a encouragé le développement de nouvelles techniques d'analyse et d'instrumentation pour répondre aux caractéristiques uniques de l'haleine expirée, en particulier en ce qui concerne les mélanges organiques complexes et les métabolites réactifs.

Pour l'année 2018, le IABR Breath Summit a eu lieu à Maastricht, au Pays-Bas, du 17-20 Juin 2018. La conférence a rassemblé de nombreuses disciplines impliquées dans la recherche respiratoire, et dans le développement de technologies analytiques et de capteurs.

i) Groupe de recherche du projet KDOG

KDOG (Cancer Detect By DOG) est un programme de recherche initié par une infirmière de l'institut Marie Curie, et dédié à la détection du cancer du sein grâce aux capacités olfactives canines (171).

Le projet repose sur les travaux du Dr Isabelle Fromantin, 1^{ère} infirmière titulaire d'une thèse en sciences fondamentales.

Au cours de sa thèse, portant sur les composés odorants volatils des plaies chroniques du cancer du sein, sa collaboration avec des chimistes lui a permis de répondre à des questionnements : les composés organiques volatils émis par les bactéries peuplant les plaies chroniques sont-ils à l'origine de l'odeur malodorante des plaies ? Elle met alors en place une enquête de perception sensorielle pour le comprendre (172).

Ce projet multidisciplinaire, dont les chiens sont placés au cœur du processus de détection, réunit des chirurgiens, anatomopathologistes, infirmiers, chimistes, expert cynophile, vétérinaires, chercheurs, mais aussi éthologues (spécialiste du comportement animal) (261).

Dans un premier temps, des cliniciens et des pathologistes se chargent du recueil d'échantillons auprès des volontaires sains et malades. Ensuite deux malinois, Thor et Nykios (Photo 15), formés par des experts cynophiles sur la mémorisation olfactive à un seuil très faible de détection des cellules infectées sur des échantillons de tumeurs puis sur des lingettes, se mettent à contribution.



Photo 15 : Les deux malinois formés pour le projet KDOG

le 1er test grandeur nature affiche 100 % de réussite (262). Parmi les 130 échantillons, les deux chiens ont détecté les 79 tissus imbibés par la sueur de femmes souffrant d'un cancer du sein. Ainsi, Thor et Nykios, ont été en mesure de distinguer la « lingette tumeur » ayant été en contact préalable avec la poitrine d'une volontaire.

Enfin un partenariat avec les chimistes de l'ESPCI et de Chimie Paris Tech a permis d'identifier les molécules odorantes relarguées par les bactéries issues des plaies tumorales.

Ses recherches, basées sur une méthode fiable, reproductible, non invasive et peu coûteuse, offrent une alternative à la mammographie pratiquée en première intention en France, et pourraient être le point de départ de l'étendue de la détection canine à d'autres cancers.

3.3. LIMITES OBSERVEES DANS LES METHODOLOGIES

Les aspects attractifs de l'analyse respiratoire, mis en évidence tout le long de cette synthèse, justifient l'intérêt qu'elle suscite pour le diagnostic médical et le suivi des malades.

Cependant, les progrès analytiques en laboratoire vers une pratique clinique de routine sont lents, et ceci pour différentes raisons.

L'hétérogénéité des différentes méthodologies d'échantillonnage de l'haleine, et la difficulté qui en découle de comparer et de combiner les données, sont considérées comme un facteur majeur.

3.3.1. Hétérogénéité des méthodes

Beaucoup d'étapes sont encore à franchir avant l'adoption de l'analyse respiratoire en clinique, toutefois la standardisation de certaines approches d'échantillonnage et d'analyse de l'haleine sera incontestablement bénéfique pour amorcer le potentiel de l'analyse de la respiration au sein de la médecine clinique et pré-clinique.

La comparaison des résultats d'analyse respiratoire est nécessaire pour permettre la régularisation des données entre laboratoires et dans les études, ou pour étudier une intervention thérapeutique, c'est pourquoi il est important de normaliser les concentrations des molécules de l'haleine.

Le diagramme ci-après (Figure 39) illustre cette hétérogénéité, qui commence dès l'étape d'échantillonnage, schématisée dans la première section, avec les divers récipients d'échantillonnage, allant du sac de prélèvement de gaz, à l'échantillonneur Bio-VOCMC, à l'appareil de prélèvement de l'haleine (BCA), aux systèmes de masque avec échantillonnage intégré, etc.

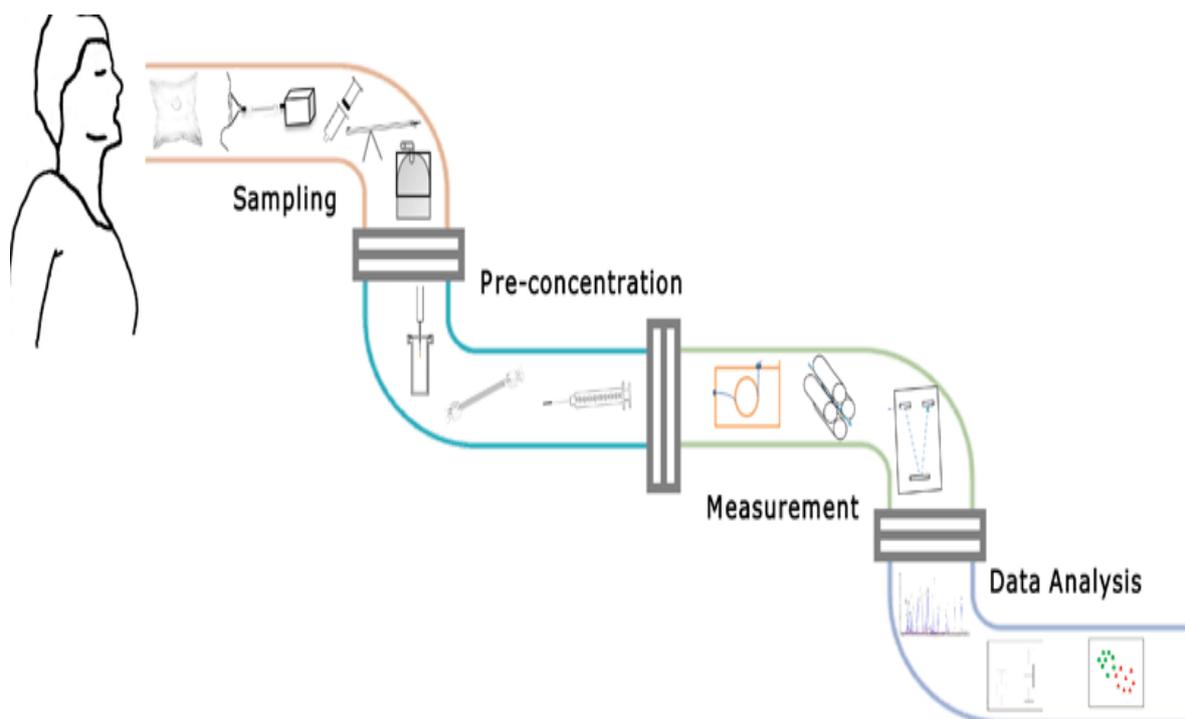


Figure 39 Schéma illustrant l'hétérogénéité des méthodes d'analyse de l'air expiré (133).

La deuxième section représente les méthodes de préconcentrations, avec les TD, SPME et les pièges à aiguilles, qui précèdent les méthodes de mesure (« Measurement »).

Bien qu'aucune des méthodes de mesure soit meilleure qu'une autre, la plupart des méthodes analytiques modernes basées sur la spectroscopie, la spectrométrie de masse, l'électrochimie et la chromatographie ont une vitesse, une sensibilité et une sélectivité suffisantes pour permettre des analyses respiratoires de qualité.

Enfin la dernière section représente le traitement des résultats (« Data Analysis »), tout aussi varié.

D'autant plus qu'une première étape dans le processus n'a pas été illustrée dans ce diagramme. En effet, l'étape d'échantillonnage est précédée par le choix du type de prélèvement d'air expiré (air expiré de fin de marée, mixte, ou total), ce qui ajoute des combinaisons supplémentaires dans le choix des méthodes.

Tableau 29 : Exemples de quelques études traduisant l'hétérogénéité des méthodes

REFERENCE DE L'ETUDE	TEMPS EXPIRATOIRE CHOISI	COLLECTEUR DE L'ECHANTILLON	PRE CONCENTRATION	MESURE ET D'ANALYSE	PRECAUTIONS PRISES
KNIPPE ET AL. (247)	Air expiratoire mixte	Sac Teldar®	Micro réacteur de silice	GC-SM	NR
WESTHOFF ET AL. (263)	Air alvéolaire	Tube en Teflon® avec valves électrique à 6 voies	Boucle d'échantillonnage avec gaz	Spectromètre à mobilité ionique (IMS)	NR
CHEN ET AL. (57)	Air mixte	Sac Teldar®	SPME	GC-FID	A jeun 2h avant le test
POLI ET AL. (208)	Air alvéolaire	Bio-VOC®	SPME	GC-SM	Recueil après 60min de repos
KING ET AL. (71)	Air de fin de marée	Prélèvement manuel avec seringue en verre étanche au gaz, à partir d'un septum en Teflon®	SPME	PTR-MS Puis GC-SM	Pas de tabac le jour du test. A jeun Repose 15 min avant le recueil.
IBRAHIM ET AL. (264)	Air mixte	Pompe d'échantillonnage à flux laminaire Escort ELF	Tubes d'adsorption remplis de Tenax TA / Carbotrap	GC-SM	A jeun 2h avant la collecte. Respiration d'air filtré via un masque ResMed®
MARKAR ET AL. (265)	Expiration complète	Sac en acier GastroCHECK + seringue Luer-Lock 1ml	NR	SIFT-MS	Repos de 20min avant le test. Min 6h de jeûne

3.3.2. Contaminants

Le risque majeur de l'analyse de la respiration est avant tout la confusion d'un composé volatil d'origine endogène avec ceux d'origine exogène. Il soulève un biais important et la distinction entre les deux est fondamentale pour exploiter ce type d'analyse.

3.3.2.1. COV d'origine alimentaire

Les arômes utilisés dans l'industrie agro-alimentaire, pour les aliments et les boissons, contiennent un grand nombre de COV de diverses classes chimiques, ce qui contribue considérablement à perturber le contenu des échantillons d'haleine si des précautions préalables ne sont pas prises.

De plus, les alcools, tels que l'éthanol, et les cétones sont des ingrédients alimentaires communément utilisés dans les boissons (bière, vin, rhum, whisky, café, thé), ainsi que dans de nombreux types d'aliments, en particulier les fruits, les légumes, le fromage, le lait, la viande et du pain. Les aldéhydes peuvent également être retrouvés sous forme d'aromatisant, tel que le benzaldéhyde, en particulier pour les arômes artificiels de cerise ou d'amande, mais aussi pour plusieurs autres aliments, comme les saucisses, les vins (75).

De nombreux composés volatils soufrés (CVS), tels que le sulfure de méthyle propyle ou le méthyl sulfure d'allyle, sont les constituants des huiles de poireaux et d'ail, et peuvent se retrouver dans les gaz respiratoires. De leur côté, le méthane thiol, le diméthylsulfure et le diméthylsulfure sont présents dans le fromage, le poisson, la viande, les produits de boulangerie et les boissons, comme le café, le vin, la bière et le lait. En outre, on sait depuis longtemps que les dérivés du furane se retrouvent dans les aliments traités thermiquement, comme les biscuits, la croûte de pain ou les grains de café torréfiés, ce qui contribue à leurs propriétés sensorielles. À cet égard, l'occurrence élevée de furanes dans les échantillons d'espace de tête d'urine peut ne pas refléter nécessairement l'habitude de fumer, mais également la consommation de boissons et de produits alimentaires.

3.3.2.2. COV liés au tabagisme

Divers aldéhydes volatils, tels que le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, le propanal, l'acroléine, le butanal et le crotonaldéhyde, sont des constituants de la fumée de cigarette.

D'autres COV, comme l'acétonitrile a été détecté dans la fumée d'une cigarette allumée et dans l'haleine des fumeurs ainsi que dans l'espace libre de l'urine des fumeurs (74).

Des concentrations d'acide acétique et d'acide propionique nettement plus élevées dans les échantillons d'haleine de fumeurs pour les non-fumeurs (51% et 26% respectivement) et que dans les échantillons d'air intérieur (moins de 3%) ce qui semble confirmer l'origine endogène de ces composés.

Le 2-méthylpentane est un composé qui semble être apparenté au tabac (81), avec des concentrations quatre fois plus élevées chez les fumeurs que chez les non-fumeurs.

3.3.2.3. COV environnementaux

Les composés aromatiques sont très présents en tant que contaminants environnementaux aussi bien dans l'air intérieur que dans l'air extérieur. Au cours des 20 dernières années, de nombreuses études ont porté sur l'analyse du benzène, le toluène, éthylbenzène et xylène (BTEX), dans le sang, l'urine ou l'air expiré. Ces composés ont pu être détectés dans presque tous les échantillons d'haleine et d'urine. Le benzène est toujours considéré comme une composante des produits de l'industrie pétrochimique, y compris l'essence, de sorte que l'inhalation est la voie d'exposition la plus courante. Cependant, il pénètre rapidement dans la peau et peut contaminer l'eau et les aliments, entraînant une exposition supplémentaire par voie cutanée et par ingestion. Le toluène est utilisé comme solvant dans l'industrie de la peinture ce qui augmente considérablement le risque d'exposition à cette substance chez certains employés.

Pour l'interprétation correcte de l'analyse de l'haleine, il est très important de tenir compte de l'émission d'aldéhydes provenant des matériaux de plancher, des meubles en bois et des plastifiants, qui peut entraîner un bruit de fond élevé. D'autres aldéhydes détectés souvent dans l'air exhalé, tels que l'acroléine et la méthacroléine, peuvent également être trouvés dans l'environnement en tant que plastifiants et agrégats dans l'approvisionnement en eau de certaines installations industrielles. En outre, l'élimination dans

l'environnement se produit lorsque des matières organiques comme les végétaux et les combustibles, tels que l'huile ou l'essence, sont brûlés.

De même, les alcools, tels que les isomères du propanol, sont des composés courants dans l'environnement intérieur comme, par exemple, les désinfectants ou les solvants ; par conséquent, leur niveau d'inspiration a été jugé plus élevé par rapport au niveau expiration.

Enfin, les composés soufrés volatils expirés peuvent être liés à l'exposition environnementale de sources naturelles (sols, marais) et de polluants. On sait que plusieurs procédés industriels produisent du disulfure de carbone en tant que sous-produit, y compris des hauts fourneaux de charbon et le raffinage du pétrole.

3.3.2.4. Correction des biais liés aux contaminants

Les limites résultant de l'alimentation ou de l'exposition à des polluants environnementaux sont les problèmes courants qui accompagnent l'analyse de la respiration en général et qui sont inévitables dans l'étude clinique, indépendamment de son objectif et de la méthode d'analyse appliquée. Ainsi, les niveaux élevés d'aldéhydes pourraient refléter l'exposition à des artefacts d'air intérieur au lieu du cancer du poumon, tandis que de fortes concentrations de CSV respiratoires pourraient être liées à un régime spécifique plutôt qu'à une infection pulmonaire bactérienne ou à un dysfonctionnement hépatique.

C'est pourquoi, la collecte et la manipulation de l'échantillon avant l'analyse sont de la plus haute importance.

Une solution simple serait d'avoir le souffle du patient pur, exempt de polluants issus de l'air ambiant pendant la collecte mais aucune méthodologie ne le permet, et encore moins dans un environnement non-contrôlé.

Les chercheurs ont réagi à ce dilemme en proposant diverses stratégies visant à discriminer les COV selon leur origine : 1 - Ignorer le problème : un certain nombre d'études publiées continuent de rapporter les concentrations de COV observées dans l'haleine seule. 2 - Fournir au sujet de l'air exempt de COV à respirer avant de prélever

l'échantillon d'haleine. Bien que cela ait été considéré comme une bonne méthode, elle n'a pas été suivie dans la plupart des études, car elle est pratiquement impossible à réaliser dans la pratique. L'air respirable « pur » de haute qualité provenant de sources commerciales fait apparaître habituellement un grand nombre de COV lorsqu'un essai avec une sensibilité pico molaire est utilisé. 3 - Utilisation d'un filtre COV à l'orifice d'inhalation de l'appareil collecteur d'haleine qui assure la capture des COV environnementaux avant que l'échantillon expiré ne soit prélevé (69). 4- Corriger le problème en soustrayant les COV de l'air ambiant des COV observés dans l'air expiré.

Ce dernier concept peut se faire via différentes approches :

a) Méthode « hors ligne »

Cette méthode sépare efficacement les COV endogènes de la respiration des COV exogènes et exclut l'entraînement nasal.

Un échantillon d'air ambiant est prélevé dans la pièce où le sujet sera étudié, cet air est analysé afin d'identifier les niveaux de COV ambiant et de permettre la comparaison des COV endogène versus COV exogène, dans le but de minimiser les éventuelles variations environnementales.

b) Soustraction et détermination d'un gradient alvéolaire

Phillips et al. ont proposé un calcul mathématique simple, qui consiste à soustraire les concentrations exogènes de l'air expiré.

Par la suite, la différence entre les concentrations ambiantes et les concentrations normalisées dans l'air expiré correspondraient au gradient alvéolaire. Cette mesure est adaptée pour déterminer l'origine d'un COV, externe ou métabolique (21).

L'abondance relative de chaque COV est ensuite classée selon son gradient alvéolaire, c'est-à-dire l'abondance en respiration moins l'abondance dans l'air ambiant.

Le principe du gradient alvéolaire est mieux compris dans le contexte historique de l'analyse des COV respiratoires. L'application la plus précoce et la plus largement utilisée de l'analyse des COV respiratoires est la surveillance de la concentration d'alcool dans le

sang. Puisque l'éthanol n'est normalement pas présent dans l'air ambiant, l'éthanol détecté dans la respiration est raisonnablement supposé provenir de l'intérieur du corps.

Seuls les COV les plus abondants, tels que l'éthanol, l'acétone et l'isoprène peuvent être détectés avec des dosages de respiration non concentrée ; cependant, comme les tests sont devenus plus sensibles, il est devenu évident que la respiration humaine normale contient un grand nombre de COV, et beaucoup d'entre eux peuvent également être détectés dans l'air ambiant normal (266).

i. Notion de gradient positif et négatif

Le gradient alvéolaire correspond à la quantité dans le souffle moins la quantité dans l'air.

Si le COV n'est ni synthétisé ni éliminé du corps, alors la quantité qui reste dans la respiration doit être égale à la quantité provenant de l'air inspiré, et le gradient alvéolaire sera nul.

Si le COV est synthétisé dans le corps mais n'est pas éliminé, il y a plus de quantité dans la respiration que ce qui est inspiré de l'air, et le gradient alvéolaire devient positif.

Inversement, si le COV est éliminé du corps mais n'est pas synthétisé, moins de quantité dans la respiration que ce qui est inspiré de l'air et le gradient alvéolaire devient négatif.

Si le gradient alvéolaire est positif, le taux de synthèse est supérieur au taux de clairance.

Inversement, si le gradient alvéolaire est négatif, alors la vitesse de clairance est supérieure à la vitesse de synthèse.

Bien que la plupart des modèles se rapportent aux COV qui sont produites de façon endogène, les COV exogènes détectés dans l'air expiré sont d'un grand intérêt principalement parce qu'ils se rapportent à l'exposition d'un individu à des agents potentiellement cancérigènes. Les COV exogènes sont généralement très réactifs, causant des dommages peroxydants à l'ADN, aux protéines et aux AGPI. L'impact négatif de ces processus s'accumule au cours des années et est supposé favoriser le cancer (267).

D'autre part, dans le cadre de l'analyse des COV, il paraît essentiel de pouvoir discriminer les COV respiratoires qui caractérisent les états sains et les états cancéreux.

3.4. DISCUSSION

En dépit des larges avantages exposés tout au long de cette synthèse, les tests, que ce soit à but diagnostic ou de dépistage, basés sur le profilage des COV issus de la respiration humaine ne sont pas encore largement utilisés en pratique clinique.

Et pour cause, les diverses difficultés rapportés dans les chapitres précédents, sont encore nombreuses.

La plupart d'entre elles sont plus ou moins surmontables, et tendent à disparaître au fur et à mesure de l'évolution de la recherche dans ce domaine, mais de façon encore trop lente.

En effet, plus de 30 ans après que Pauling et al.(1) ont décrit l'abondance des composés organiques volatils dans la respiration humaine, seul les éthylotests, mesurant l'éthanol dans un contexte toxicologique de la sécurité routière, et le test de diagnostic d'infection à *Helicobacter Pylori* sont utilisés en routine.

3.4.1. Manque d'harmonisation et des standardisations des méthodes

Un des problèmes majeurs recensé dans cette thèse, est le manque d'harmonisation et de standardisation des procédés d'analyse.

En effet, les techniques expérimentées au travers différentes études font apparaître une importante hétérogénéité aussi bien dans les méthodes d'échantillonnage, de prélèvements et de préconcentration des échantillons.

Les composés organiques volatils doivent continuer à être étudié dans le contexte du diagnostic moléculaire en oncologie pour une mise en place de test d'haleine en routine clinique, cependant il est nécessaire au préalable de régulariser les informations cliniques, de normaliser les normes méthodologiques afin d'assurer des résultats de qualité et comparables d'un laboratoire à l'autre.

3.4.2. Accessibilité des appareils de mesure

La faible teneur de la plupart des COV contenus dans l'haleine ne peut être détectée que par des instruments d'analyse de pointe, dotés d'une détection ultrasensible, adaptée à des concentrations de l'ordre du partie par billion en volume.

Néanmoins, en dehors d'un laboratoire de recherche, ce type d'instruments permettant de recueillir un échantillon de souffle et d'en analyser les COV, n'est que très peu répandu.

Or, l'introduction d'appareils d'analyse dont la taille et l'utilisation sera adaptée au personnel soignant est nécessaire pour une standardisation de l'analyse respiratoire dans la pratique clinique.

L'idéal serai des appareils d'analyse transportables, pouvant être amenés au chevet du patient tout en permettant la reproductivité en ambulatoire. Dans ce sens, le développement de méthodes analytiques spécifiques faciles à utiliser, telles que les nez électroniques munis de réseau de capteur, est hautement souhaitable.

3.4.3. Enjeux éthiques

Néanmoins, afin d'éviter tout risque de dérives que peut représenter un tel outil de dépistage, l'accessibilité et la facilité d'utilisation doivent être encadrées et limitées au personnel de santé, d'autant plus que certain prévois de détecter plusieurs maladies à l'aide du même appareil (NaNose™ du groupe de recherche de Technion en Israël(268)).

L'avancée exponentielle des connaissances sur les biomarqueurs respiratoires fait craindre une forte augmentation des (auto)tests commerciaux, notamment en vente libre sur internet par des sociétés extérieures au système de santé. Quelques tests déjà disponibles sur internet sous forme de kit de biopsie respiratoire sont proposés sans aucune intervention de professionnels de santé (200). Ce manquement constitue un risque de banalisation et de désinformation majeure sur les conséquences possibles des résultats.

Pour autant que ces tests soient fiables et commercialisés que dans le circuit pharmaceutique, il est important de bien mesurer l'impact d'une éventuelle découverte d'un cancer pour un patient et d'établir un accompagnement aussi bien pour lui que pour les autres membres de sa famille, eux aussi susceptibles d'être porteurs d'une prédisposition héréditaire.

Sans oublier les risques de discrimination professionnelle ou d'assurance santé qui pourraient résulter d'un usage incontrôlé de ce genre de test. Il faudra donc veiller à ce que l'utilisation des biomarqueurs se fasse dans un cadre médical et légal adéquat, afin de pouvoir protéger et accompagner au mieux les patients (269).

Des règles de bonne pratique devront accompagner l'utilisation de ces tests, de la même manière que ceux déjà appliqués aux tests génétiques prévues par la loi de bioéthique et recommandées par l'Agence de biomédecine et la Haute autorité de santé.

Pour plus de sécurité, ces tests devront toujours être effectués dans un cadre médical et une information claire devra être délivrée aux patients.

3.4.4. Manque de connaissance des COV respiratoires

Un autre problème non résolu est la mauvaise compréhension de l'origine, du comportement et du devenir métabolique des COV dans l'organisme humain. En effet, dans la plupart des cas, les informations sur les voies métaboliques conduisant à leur production ou leur dégradation sont manquantes.

Même après 30 ans de recul dans l'analyse des COV respiratoires, personne n'est en mesure de dire avec certitude lesquels sont normaux et lesquels sont anormaux. Si bien que la plupart des COV respiratoires ne sont même pas mentionnés dans les manuels modernes de médecine ou de biochimie.

En outre, le problème de la sélection des biomarqueurs relatif à un cancer donné est très complexe car ces composés sont généralement présents non seulement chez les patients cancéreux, mais aussi chez les témoins sains. La pertinence clinique est en général

démontrée au travers des différences de concentrations d'un même COV chez un individu sain versus un autre individu malade.

D'autre part, l'incertitude sur le nombre total de COV produits par les cellules humaines et la façon dont leur composition normale dans la respiration est modifiée qualitativement ou quantitativement par le stress, l'âge, l'heure, le sexe, l'activité, ou la maladie, et un autre inconvénient par rapport à d'autres biomarqueurs, comme les marqueurs à base d'acides nucléiques ou de protéines par exemple.

Pour ces raisons, il est crucial d'étudier la production de métabolites volatils au niveau cellulaire, en effectuant des expériences *in vitro* avec des tumeurs humaines et des lignées cellulaires humaines non transformées.

Pour certains métabolites prometteurs liés au cancer, leur application en tant que biomarqueur peut être limitée car ils proviennent également d'autres sources, souvent exogènes. Comme c'est le cas par exemple pour l'éthanol, produit par des tissus tumoraux pulmonaires, libéré dans l'espace libre des cellules cancéreuses pulmonaires non à petites cellules, exhalé par des patients atteints de cancer du poumon, mais également présent dans les aliments, les boissons, et produit par des bactéries intestinales telles que *Escherichia coli*.

3.4.5. Rôle des acteurs de santé

A travers ces recherches, nous avons constaté des lacunes en termes de pluridisciplinarité. En effet, il y a très peu d'étude rapportant une coordination ou des réunions de recherche en amont entre le domaine médical et le domaine électro-physique.

Un partenariat entre ces deux univers de recherche permettrait de développer des outils technologiques innovant, répondant à des besoins médicaux réels.

Une telle collaboration apparaît souvent qu'au stade de l'étude clinique, lorsque la conception d'un dispositif est déjà bien avancée.

En outre, combiner la science fondamentale et la science appliquée, en mettant au point de nouvelles méthodes d'analyses adaptées à une utilisation hospitalière quotidienne est un défi pouvant introduire l'analyse de l'haleine dans la pratique clinique.

Par ailleurs, à l'ère des nouvelles missions attribuées aux pharmaciens - notamment ceux exerçant en officine - et à l'allègement de la masse de travail des médecins, il serait judicieux de solliciter le pharmacien pour l'encadrement de programmes de dépistage à l'aide d'outils issus de la recherche sur les biomarqueurs de l'haleine.

Dans la pratique, le pharmacien est déjà très actif dans la prévention primaire, qui consiste à prodiguer des conseils d'hygiène générale, à accompagner, écouter, prévenir les conditions délétères, informer, répondre aux besoins, anticiper et aider dans les prises de décision (270).

Le dépistage *via* un test d'haleine, avec tous les avantages qu'il comporte (facilité d'utilisation, sécurité de manipulation, non invasivité, ...), représente un outil dont l'utilisation et la gestion peut être assumé par des acteurs de premier plan dans chaîne de prise en charge, tel que les pharmaciens d'officine.

Une telle contribution au dépistage paraît être une réelle opportunité pour les pharmaciens, dont les connaissances scientifiques, les qualités d'accompagnement, d'empathie et d'écoute, ainsi que l'accessibilité pour les patients, faciliterait l'adhésion à certains programmes de dépistage.

Ainsi, plusieurs études en France démontrent l'importance du rôle des pharmaciens d'officine et leur efficacité dans des programmes de dépistage, comme par exemple une étude de 2009 rapportant les résultats d'une expérience de dépistage de la rétinopathie diabétique (RD) à l'aide d'un rétinographe itinérant dans des pharmacies situées dans des communes sous-médicalisées(271). Basée sur le volontariat, 42 pharmaciens y ont participé, et ont permis de recenser 23 cas de rétinopathies ignorées et confirmées par l'ophtalmologiste soit (7,3 %).

Fait intéressant, sur les 397 diabétiques examinés, 36% d'entre eux n'avaient jamais réalisé de fond d'œil auparavant, malgré un diabète de plus de 10 ans en moyenne, ce qui contribue à penser que la mise en place des structures de dépistages itinérants, délégué par les pharmaciens d'officine sera d'une utilité de santé publique évidente.

Une seconde étude portant sur le dépistage de patients atteints de diabète et/ou de maladie rénale, réalisée en 2008, a permis de détecter 12,3% de diabétiques méconnus grâce à une glycémie capillaire, et 12,7% de patients présentant une protéinurie ou hématurie à l'aide d'un test sur bandelettes urinaires (272).

Ces résultats prometteurs confirment la possibilité d'associer les pharmacies d'officine aux plans de dépistage, permettant ainsi une première « filtration » des patients, à l'issue de laquelle une orientation vers un médecin traitant est prodiguée en fonction du résultat.

Néanmoins, un travail d'organisation de l'espace officinale adaptée est à fournir pour pratiquer de tels examens (lieux confidentiels dédiés, traitements des déchets, formations du personnel, adhésion patient, ...).

Aujourd'hui, le développement de partenariats pluridisciplinaires est une force pour combattre de façon globale les cancers, et le pharmacien d'officine pourrait être au cœur de cette pluridisciplinarité à travers les dépistages précoces des cancers et autres pathologies détectés par test d'haleine.

THÈSE SOUTENUE par Mme BATHELIER MSAYIF Hanane

IV. CONCLUSIONS

Le diagnostic par analyse des composés volatils est très attrayant car il constitue une alternative peu coûteuse et non-invasive, représentant ainsi un grand potentiel en matière de diagnostic en médecine humaine.

Le test respiratoire est probablement le moins invasif de tous les tests diagnostiques. Même les personnes très âgées et très malades peuvent généralement donner un échantillon d'haleine sans inconvénient. Cependant, malgré cet énorme potentiel, l'utilisation de ces modèles dans un cadre clinique est encore plutôt limitée.

Dans un futur proche, les résultats d'études pourraient conduire au développement d'un outil portatif, non invasif, peu coûteux et facile à utiliser qui surmonte plusieurs des lacunes associées aux méthodes actuelles de diagnostic en oncologie.

Toutefois, le dépistage respiratoire sera facilité et admis que grâce à la généralisation de l'enseignements de ce type d'analyse au cours des études scientifiques à visées médicales.

Un certain nombre de défi restent encore à franchir pour faire de l'analyse respiratoire un outil de diagnostic et/ou de surveillance fiable :

- ✓ Établir des procédures normalisées et développer une approche d'échantillonnage standardisée pour les biomarqueurs respiratoires, afin de surmonter les problèmes techniques d'échantillonnage et d'analyse des COV.
- ✓ Etendre les connaissances de base sur les biomarqueurs potentiels (origine, distribution, exhalation), et relier un COV donné à une source cellulaire particulière et des processus biochimiques sous-jacents, qui mènent à leur génération.
- ✓ Obtenir une identification sans ambiguïté des COV selon les différents états de santé du corps humain, dans les états sains et malades, afin d'améliorer la discrimination d'un profil pathologique versus un profil sain. Pour atteindre cet objectif il sera utile de collecter des métadonnées de grandes cohortes de patients et de volontaires.

- ✓ Identifier les causes sous-jacentes des différences d'empreintes de COV entre différents types de cellules ou différents phénotypes de la même population cellulaire.
- ✓ Comprendre la variabilité inter / intra-individuelle et établir une éventuelle relation génotype-phénotype pour la production de COV
- ✓ Valider de nouvelles technologies avec une sensibilité et une spécificité adéquate
- ✓ Créer une banque d'odeurs, répertoriant des combinaisons d'empreintes validées, liées à un état de santé particulier
- ✓ Etablir une notion de seuil sur l'aspect qualitatif et quantitatif des COV

Une interrogation subsiste malgré nos recherches, à savoir : est-ce la présence de certains COV qui signe l'éventualité d'être affecté par un cancer ou est-ce, à contrario, la présence de ces COV qui est à l'origine du développement de ce cancer (COV exogènes notamment) ?

Autrement dit, l'exposition à certains COV issus de notre environnement (polluants, tabac, alimentations, arômes artificiels, etc.), favorise-t-elle le développement de certains troubles ?

En effet, la plupart des modèles étudiés se rapportent aux COV produits de façon endogène. Cela dit les COV exogènes détectés dans l'air expiré sont également d'un grand intérêt, car ils témoignent de l'exposition d'un individu à des agents cancérigènes, en raison de leur grande réactivité, leur présence peut être la cause de dommages peroxydant sur l'ADN, des protéines ou des AGPI. Leur accumulation au cours des années est un impact négatif, considéré comme un facteur supposé favoriser le développement d'un cancer (267). C'est le cas en particulier, des composés chimiques très lipophiles, stockés dans les compartiments graisseux du corps et pouvant être libérés pendant des semaines, voire des mois après l'exposition (273).

Les progrès dans ce domaine de recherche pourront avec le temps éclaircir cette ambiguïté, et dans l'idéal attribuer une empreinte volatile caractéristique pour une maladie donnée.

Le directeur de thèse,



JM. HEYDEL

Le président,



JM. HEYDEL

Vu pour l'autorisation de Soutenance

Dijon, le 12/09/2018

Le Vice-Doyen



ANNEXES

COV ET MALADIES INFECTIEUSES
COV ET MALADIES METABOLIQUES
AUTRES MALADIES DETECTABLE VIA
L'HALEINE

COV et Maladies infectieuses

L'odeur des maladies infectieuses a fasciné l'humanité pendant de nombreuses années. Par exemple, l'odeur typique de la gangrène gazeuse, une grave infection de la peau et des tissus mous causée par *Clostridium perfringens*, a été décrite dès le Moyen Age.

Tout au long de l'histoire, les maladies infectieuses ont joué un rôle majeur dans les batailles et les guerres. Dans les deux Première et Seconde Guerres mondiales, de nombreux soldats ont souffert de gangrène gazeuse, à laquelle 50% ont succombé. Dépourvus d'outil de diagnostic, les médecins se fiaient uniquement à leurs sens, en particulier l'odorat.

Le diagnostic du chevet par l'odorat est toujours appliqué. Par exemple, pour les infections des plaies causées par *Pseudomonas aeruginosa* caractérisé dans les manuels et par les cliniciens comme ayant une odeur « fruitée », et la vaginose bactérienne caractérisé par son odeur distinctive de "Poisson".

Ces dernières années, des études ont tenté d'évaluer les capacités olfactives supérieures des animaux, et les moyens de détection d'odeur nouvellement développés ont fait grandir la perspective de nouvelles formes de diagnostics pour certaines maladies infectieuses.

En effet, il a été montré que certains micro-organismes généraient de grandes quantités de composés volatils diversifiés et qu'il était possible de les distinguer par leur empreinte olfactive.

Ce phénomène confirme l'existence d'un métabolome microbien, contenant des métabolites volatils caractéristiques, pouvant révéler la présence de microorganismes. Cette approche est particulièrement intéressante pour la détection non-invasive de pathogènes dans des échantillons complexes comme les matrices alimentaires, les échantillons sanguins, ou encore les plaies chroniques.

Parmi l'immense diversité du métabolome microbien, les métabolites volatils émis par un micro-organisme constituent une forme « d'empreinte olfactive », qui peut être exploitée par des techniques analytiques.

L'ensemble des COV endogènes et des COV microbiens d'un individu présentent un intérêt clinique, car il peut fournir un aperçu de son état physiologique et des interactions

des microorganismes hôtes et commensaux qui contribuent à la complexité du métabolome de ce « super-organisme » complexe si l'on considère, comme le chercheur Goodacre, l'humain comme un hybride humain-microbe (2007). Ceci semble nécessaire pour définir la santé humaine au niveau moléculaire.

Ces Composés Organiques Volatils Microbiens (MCOV), issus du métabolisme des micro-organismes, sont composés le plus souvent d'amines, de dérivés soufrés, d'acides carboxyliques, d'aldéhydes ou encore de cétones (274).

Les MCOV émis peuvent varier en fonction de facteurs extérieurs comme la température ou la composition du milieu. Certains composés volatils sont plus spécifiquement émis par quelques espèces seulement, tandis que d'autres sont plus universels. Toutefois, il faut retenir que la spécificité à l'espèce n'est obtenue qu'en combinant la détection de plusieurs MCOV (274).

Les composés libérés par des souches bactériennes comme *Pseudomonas aeruginosa* ou *Streptococcus pneumonia* ont démontré qu'ils pouvaient être détecté par des méthodes instrumentales, mais également par la capacité olfactive des animaux. Quelques rares études ont tenté de démontrer les capacités, cette fois, de l'homme à caractériser certaines empreintes olfactives, sur des échantillons de selles dans le cadre de recherche de *Clostridium* et de Rotavirus, mais les résultats furent mitigés, avec de faibles sensibilités mais de bonnes spécificités. Le Tableau 30 ci-dessous montre les caractéristiques de quelques études clés.

Tableau 30 : Performances de quelques études du sens olfactif de l'homme, de l'animal et du nez électronique, pour la détection de maladies

Infection	Type of nose	Type of sample	Sensitivity / Specificity (95%CI when available) or Success rate	Sample size (diseased/ healthy)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ³²	Rat	Sputum	80% / 72%	28 / 111
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ³³	Rat	Sputum	68% / 87%	162 / 748
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ³⁵	Enose	Breath	84% / 65%	65 / 161
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ³⁶	Enose	Breath	90% / 88%	32 / 40
Rotavirus ³⁷	Human	Faeces	38% / 88%	26 / 42
<i>Clostridium difficile</i> ³⁸	Human	Faeces	55% (33-77%) / 83% (76-90%)	37 / 81
<i>Clostridium difficile</i> ³⁹	Dog	Faeces and hospitalised patients	Faeces: 100% / 100% (91-100%) Patients: 83% (65-94%) / 97% (95-99%)	Faeces: 50 / 50 Patients: 30 / 270
<i>Clostridium difficile</i> ⁴⁰	Enose	Faeces	95% success rate	22 / 30

Des expériences *in vitro* récemment réalisées démontrent que divers composés soufrés

volatils (VSCs), *entre autres* méthane, diméthylsulfide, diméthyltrisulfide ou diméthyltrisulfide, sont produits par des bactéries pathogènes colonisant les voies respiratoires supérieures et inférieures et provoquant une infection pulmonaire, telle qu'une pneumonie. Les VSC peuvent être produits de manière endogène par le biais du métabolisme des acides aminés sulfurés (méthionine et cystéine) dans la voie de transamination.

Parmi les métabolites endogènes volatils spécifiques de pathogènes d'intérêt, le méthacrylate de méthyle (CAS 80-62-6), a été observé dans l'espace de tête de *Streptococcus pneumoniae* dans des concentrations allant jusqu'à 1420 ppb. D'autres COV émis par six espèces de bactéries pathogènes sont illustrés dans la figure ci-dessous.

Bactéries pathogènes étudiées (Figure 40) :

- *Staphylococcus aureus* (SA),
- *Streptococcus pneumoniae* (SP),
- *Enterococcus faecalis* (EF),
- *Pseudomonas aeruginosa* (PA),
- *Klebsiella pneumoniae* (KP),
- *Echerichia coli* (EC).

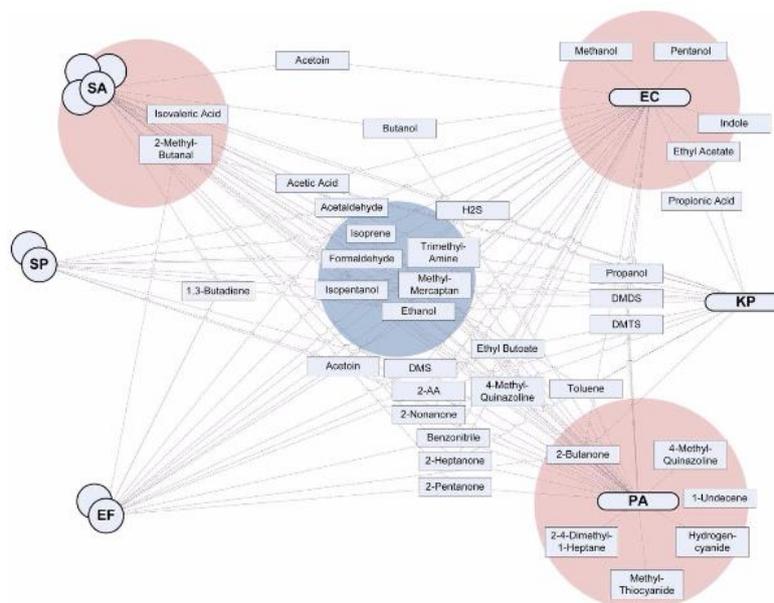


Figure 40 : COV émis par six espèces de bactéries pathogènes: *Staphylococcus aureus* (SA), *streptococcus pneumoniae* (SP), *Enterococcus faecalis* (EF), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Klebsiella pneumoniae* (KP), *Echerichia coli* (EC) (5).

Plus il y a de preuves de production d'un composé par un pathogène plus il apparaît proche de celui-ci. Ainsi, quatre zones se démarquent : la zone bleue correspond à des composés volatils émis par toutes les bactéries.

Les COV émanant des matières fécales ont été impliquées dans la différenciation de certaines maladies intestinales infectieuses telles que *Clostridium difficile*, *Campylobacter*, *Salmonella* et Cholera. Ils ont également été utilisés pour différencier d'autres affections non infectieuses telles que le syndrome du côlon irritable et la maladie inflammatoire de l'intestin.

Tuberculose

La méthode de détection de *Mycobacterium tuberculosis* utilisée par Grecs anciens et Chinois, paraît de nos jours quelque peu insolite, mais elle a fait ses preuves dans ces civilisations ancienne. Le médecin mettait le feu aux crachats du patient et la reconnaissance d'une odeur spécifique dans les fumées en découlait le diagnostic de la tuberculose.

La technique de microscopie par frottis, généralement utilisée, est très limitée en termes de sensibilité et de rapidité de résultat, malgré sa spécificité élevée (182). Une autre méthode de biologie moléculaire, utilisant la réaction par polymérisation en chaîne (PCR), est beaucoup plus sensible, mais moins économique (275).

La mise en culture est également une méthode sensible pour détecter la tuberculose, mais cela prend généralement au minimum trois semaines (166).

Ces obstacles sont majeurs dans la lutte contre la tuberculose, notamment dans les pays pauvres en ressources. Par conséquent, la communauté médicale internationale a donné la priorité à l'élaboration d'un diagnostic alternatif rapide, précis et abordable.

Mycobacterium tuberculosis fabrique des métabolites volatils détectables dans la respiration des patients infectés sous forme de COV, dont les principaux sont :

- Les dérivés du naphthalène
- Les dérivés du benzène
- Des alcanes

Ces biomarqueurs fournissent des informations précieuses sur l'état des sujets atteints de la forme active de la maladie.

Les résultats d'une étude coordonnée par des chercheurs américains à ce sujet s'avèrent relativement prometteurs.

Avec une prévalence de 5% dans la population étudiée, le test respiratoire identifierait une tuberculose pulmonaire active avec 98% de valeur prédictive négative et 13% de valeur prédictive positive. L'algorithme prédictif multivarié a identifié une tuberculose pulmonaire active avec une précision de 80%, une sensibilité de 71,2% et une spécificité de 72%. La précision a augmenté à 84% dans les sous-groupes appariés selon l'âge (276). D'autres méthodes de détections ont été étudiées, notamment par des rats (Cf. chapitre C).

Des investissements soutenus dans le développement et la diffusion de tests de diagnostic de la tuberculose accessibles dans de nombreuses régions du monde, sont essentiels pour réduire la transmission, placer les patients sous traitement approprié et diminuer les cas de tuberculose.

Autres infections

Des altérations des substances volatiles dans l'urine ont été utilisées pour détecter les infections des voies urinaires, la vessie, la prostate et d'autres cancers (277).

COV et Maladies métaboliques

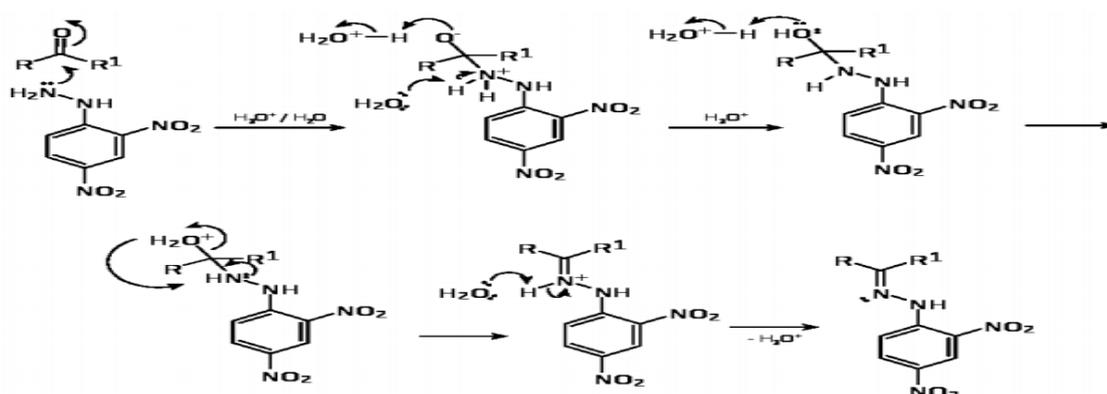
Dans les processus normaux et anormaux dans le corps, les changements métaboliques se produisent tout le temps. Dans les maladies métaboliques, de tels processus anormaux peuvent altérer la chimie du corps en changeant la concentration en COV ou en produisant de nouveaux COV.

Diabète

L'une des façons les plus aisées de diagnostiquer un diabète est l'odeur, très facilement reconnaissable, émise par le patient, caractéristique de la pomme verte en fermentation. De même, en cas d'états de jeûnes prolongés, cette même odeur apparaît : c'est l'acidocétose, complication métabolique du diabète. En effet, de grandes concentrations d'acétone ont été relevées chez des patients atteints de diabète aigu (32.41).

L'utilisation d'iode alcalin en solution avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine peut provoquer une réaction de l'air expiré et révéler la présence d'acétone (9) (fig.1).

Henderson MJ, Karger BA, Wrenshall GA. Acetone in the Breath - A Study of Acetone Exhalation in Diabetic and Nondiabetic Human Subjects. *Diabetes* 1952;1(3):188-&.



Maladies hépatiques

Avec certaines maladies hépatiques, telles que les cirrhoses, l'insuffisance hépatocellulaire apparaît et l'haleine du patient évoque alors une odeur de foie frais ou de terre argileuse. Elle provient de l'accumulation d'ammonium et de son élimination par voie respiratoire (32 63).

Des marqueurs volatils, comme l'acide sulfurique (H₂S) sont détectés en cas de stase biliaire ou de cirrhose biliaire simple. En cas de cirrhose hépatique décompensée d'autres composés sont détectés :

- Acides aliphatiques,
- Méthylmercaptan,
- Ethanethiol,
- Sulfure de diméthyle

Une maladie génétique rare telle que la triméthylaminurie provoque une odeur typique de « poisson pourri », due, là aussi, à une expulsion dans l'air rejeté par le patient de triméthylamine. Cette maladie est liée à un déficit d'oxydation hépatique de triméthylamine (9.41).

Insuffisance rénale

En cas d'insuffisance rénale, l'urée, qui est un produit du catabolisme azoté, est caractérisé par une odeur d'ammoniacque (9.41).

Les Halitoses ou « mauvaise haleine » caractérisant une pathologie

Différents types de « mauvaises haleine » peuvent être caractéristique d'une situation pathologiques particulières, comme par exemple :

- Œufs « pourris » : indique des composés sulfurés volatils (CSV) qui le plus souvent sont associés à une parodontite ou à un revêtement sur la langue.
- Souris morte : cirrhose du foie : CSV acides aliphatiques (butyrique, acide propionique), méthyle mercaptan, éthyle mercaptan, sulfure de diméthyle.
- Pomme « pourrie » : diabète insulino-dépendant mal équilibré : accumulation de cétones
- Odeur de poisson : insuffisance rénale ou triméthylaminurie : accumulation de di- et triméthylamine.

Autres maladies détectables via l'haleine

Les processus neurologiques pathologiques pourraient entraîner un spectre altéré de composés organiques volatils qui sont excrétés par l'haleine expirée (117).

La sclérose en plaques

A l'heure actuelle, le diagnostic de la SEP est posé sur des caractéristiques purement cliniques. Il est ensuite confirmé à l'aide d'outils comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM) du cerveau et de la moelle épinière, ou d'une ponction lombaire à la recherche de la présence de bandes oligo-clonales IgG (OCB) par électrophorèse.

Une nouvelle approche basée sur l'analyse non invasive des composés organiques volatils (COV) dans l'air expiré, est envisagée dans certaines études afin de découvrir de nouveaux outils de diagnostic de la SEP utilisables en routine (268).

Les résultats d'une récente étude, Août 2017, menée par l'équipe de Broza Y. , (268) a révélé des différences significatives dans la concentration des COV entre les 148 patients atteints de SEP et les 54 témoins, grâce à une analyse par GC-MS, permettant d'établir des liens possibles entre les biomarqueurs de COV et la pathogenèse de la SEP.

Après analyse, cinq principaux COV ont montré des différences significatives entre tous les patients atteints de SEP et le groupe témoin. Sur les cinq COV, l'acétophénone a été retrouvée à des niveaux plus élevés dans le groupe témoin. D'autre part, quatre marqueurs ont été trouvés à des niveaux plus élevés dans le groupe malade (graphique) :

- L'heptadécane,
- Le nonanal,
- Le décanal et
- Le dioxyde de soufre

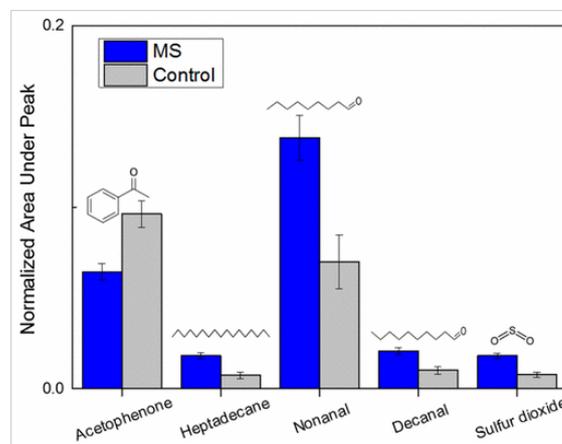


Figure 41 : Différences de concentration de COV entre malades de SEP et témoins. 233

Les marqueurs de COV dans l'haleine expirée des patients atteints de sclérose en plaques étaient l'hexanal et le 5-méthyl-undécane (278).

L'une des hypothèses pour expliquer la pathogenèse de la SEP est l'effet toxique du stress oxydatif sur le système nerveux central (SNC), ce qui peut expliquer la présence de taux anormalement élevés de COV.

Parkinson

L'analyse de la respiration expirée est une approche prometteuse pour la différenciation entre la maladie de Parkinson idiopathique (iPD), et d'autres syndromes de type parkinsoniens (non-iPD) et ainsi diminuer le taux de mauvais diagnostic estimé à 35% lorsque le diagnostic repose essentiellement sur les caractéristiques cliniques et l'évaluation du médecin (279).

En effet, l'apparition des premiers signes cliniques de la maladie de Parkinson, indique que la détérioration des neurones dopaminergiques est de plus de 50%. C'est pourquoi, il est important de détecter la maladie à ses débuts, afin que la progression de la maladie par des médicaments neuroprotecteurs puisse être ralentie.

Une étude clinique a examiné la possibilité de discriminer les iPD d'autres états parkinsoniens (non-iPD) par l'analyse de souffle exhalé et a fait la distinction entre les sujets iPD et non-iPD avec une sensibilité de 88% et une précision de 88% en utilisant une gamme de capteurs de gaz à base de nanomatériaux.

Une seconde étude s'est donné l'objectif d'identifier les composés organiques volatils (COV) en tant que biomarqueurs précoces de la maladie de Parkinson, à l'aide de rats appauvris en neurones dopaminergiques, utilisés comme modèle pré-parkinsonien (280). (khatib 2014)

De nouveaux COV ont été identifiés comme biomarqueurs pour la détection précoce de la maladie. Parmi eux, le 1-octène-3-ol a été trouvé à des concentrations supérieures au groupe témoin.

Alzheimer

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) jouent un rôle dans la cascade physiopathologique menant à la maladie d'Alzheimer.

L'analyse des COV représente un outil de diagnostic et de dépistage prometteur pour cette maladie dont le diagnostic est généralement posé au stade avancé relativement du processus pathologique.

Il a été suggéré que l'apparition biologique de la maladie peut se produire plusieurs décennies avant que les manifestations physiques et cliniques soient détectées (281).

Une équipe de chercheur a mis en évidence l'existence d'une empreinte COV de la MA, caractérisée par un groupe de signaux générés par l'abondance relative des COV significativement différente de celle du groupe en bonne santé (figure 33).

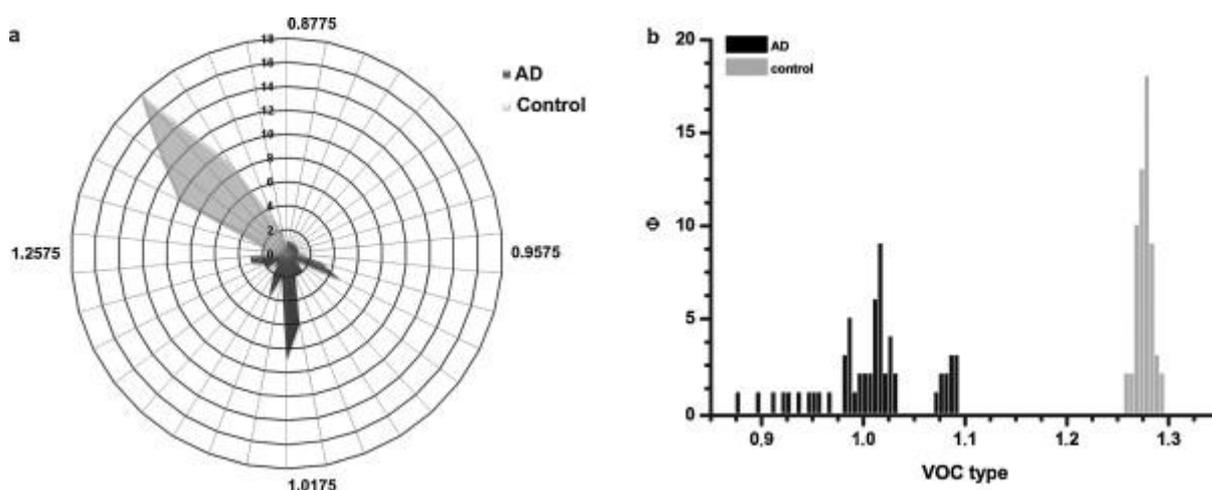


Figure 42 : Proportion des COV exhalés par population malade de MA et témoins.

Une autre étude chimique a identifié un groupe de 24 COV trouvés dans l'haleine des patients MA et des sujets sains; ces COV ont nettement augmenté dans MA (280).

En se référant à cette étude, l'hypothèse que la MA est caractérisée par une empreinte de COV en grappes plutôt que par seulement quelques composés peut être émise.

Asthme

En terme d'analyse des composés expiré, on sait déjà que le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO) exhalé est un bon marqueur biologique de l'inflammation des voies aériennes, et sa mesure dans l'air expiré est devenue au fil des années un examen nécessaire dans la prise en charge des patients asthmatiques (282). En effet, la concentration fractionnaire du NO dans l'air expiré (FENO) est augmentée chez les sujets asthmatiques par rapport aux témoins sains. Au-delà de 13 ppb (parties par milliard), l'existence d'un asthme est fortement probable. Ainsi, la mesure du NO exhalé permet d'ajuster la corticothérapie inhalée à l'état clinique du patient asthmatique aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant (283).

Cependant, il existe plusieurs sources de variabilité concernant la production de NO d'un individu à un autre.

Sources de variabilité de concentration de NO :

- Atopie : facteur indépendant, et pas uniquement l'atopie à l'origine d'un asthme ;
- Taille : entre 120 et 180 cm, la valeur de FENO pour une personne saine passe de 7 à 14 ppb ;
- Âge : la FENO augmente avec l'âge chez l'enfant comme chez l'adulte ;
- Sexe : la valeur de FENO est plus élevée chez le sexe masculin et ce, dès l'enfance ;
- Inflammation nasale : en raison de la production de NO par le tissu épithélial nasal, toute inflammation induit une majoration de la FENO ;
- Infection : toute infection du tractus respiratoire se traduit par une majoration de la FENO en raison de la production propre de NO par l'épithélium respiratoire en réponse à l'infection ;
- Nourriture : tous les aliments contenant des nitrates, tels que la laitue, majorent le taux de FENO. Par ailleurs, la consommation de caféine ou d'alcool peut, elle aussi, majorer le taux de NO ;
- Médicaments : les corticoïdes par voie orale, les inhibiteurs des leucotriènes, les bronchodilatateurs peuvent modifier le taux de FENO ;
- Tabac : le tabagisme actif et passif diminue le taux de FENO.

Ainsi, les normes actuellement déterminées dans la mesure du NO, ne doivent suffire pour établir un diagnostic ou prendre une décision thérapeutique et toute mesure de NO doit être analysée en tenant compte de l'examen clinique et de l'anamnèse.

Ces sources de variabilités importantes, inter- et intra-individuelle, génétique et environnementale, ont conduit la recherche depuis plusieurs années, à étudier de nouvelles approches, en ciblant notamment les caractéristiques individuelles de la maladie.

Des études récentes, orientées sur la détection des COV de l'haleine, ont également montré un potentiel comme outil de diagnostic de l'asthme chez l'adulte et les enfants (284).

Les profils de COV offrent l'opportunité de découvrir de nouveaux biomarqueurs spécifiques de la maladie (264). D'autant plus que certains d'entre eux, détectés par un nez électronique, peuvent distinguer les patients atteints d'une maladie pulmonaire obstructive chronique de ceux souffrant d'asthme (285).

Il serait même possible de discriminer les échantillons d'haleine en fonction du type de cellule inflammatoire dominant, à travers des COV spécifiques. C'est ce que révèle une étude, qui après culture de globules blancs, constate que ces derniers libèrent et utilisent des COV (286).

Le profilage des COV peut se faire par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. C'est notamment la méthode utilisée dans une étude en 2011, et qui lui a permis de mettre en évidence plusieurs composés présents en quantités élevées chez les patients souffrant d'asthme par rapport aux sujets sains. Ainsi, des alcanes à chaîne plus longue ont été jugés discriminatoires et plus spécifiques de l'asthme.

Ce groupe de composés (alcanes en C₇ à C₁₂ et leurs dérivés méthylés) mérite une exploration plus poussée pour être validés en tant que biomarqueur potentiel de l'asthme.

La fibrose kystique

Une étude parue en 2006, menée par Baker et son équipe (287), a mesuré les concentrations respiratoires ambiantes et exhalées de 12 gaz à l'état de traces volatiles : d'éthane, propane, *n*-pentane, méthanol, éthanol, 2-propanol, acétone, isoprène, benzène,

toluène, sulfure de diméthyle (DMS) et limonène, chez 40 sujets, dont 20 sujets atteints de fibrose kystique et 20 sujets sains, incluant des enfants, des adolescents et de jeunes adultes qui étaient soit en bonne santé ou affectés par une inflammation chronique des voies respiratoires due à la mucoviscidose. Les résultats ont montré une variabilité intersujets importante dans les deux groupes, avec des différences significatives pour le pentane, le DMS et le 2-propanol. Le gradient alvéolaire pour le pentane était plus élevé chez les patients atteints de fibrose kystique que chez les témoins en bonne santé (0,36 *versus* 0,21 ppb).

Le pentane expiré a été proposé comme marqueur de la pathologie des voies respiratoires et les preuves disponibles suggèrent que la peroxydation des acides gras polyinsaturés dans le foie est sa principale source.

De plus, une diminution de l'isoprène expiré a été signalée dans les exacerbations pulmonaires aiguës de la fibrose kystique dans une précédente étude (288).

L'analyse de la respiration chimique pour les composés organiques volatils est faisable et peut devenir un outil potentiel pour le diagnostic non invasif et le suivi des processus inflammatoires dans la maladie pulmonaire de la fibrose kystique.

Le rejet de l'allogreffe cardiaque

Un suivi périodique des receveurs cardiaque est nécessaire pour dépister un éventuel rejet de greffe. Les outils actuels permettant ce dépistage sont indispensables compte tenu de l'absence de signes cliniques spécifiques annonçant le rejet. La biopsie endo-myocardique ventriculaire est pratiquée à cet effet mais reste néanmoins une technique assez invasive.

De nombreux tests non invasifs pour le rejet de greffe ont été proposés, telle que l'imagerie par résonance magnétique, imagerie d'anticorps, échocardiographie, et l'utilisation de marqueurs sériques tels que la troponine I, la troponine T, la fraction créatine kinase-MB et la protéine C-réactive, mais ces derniers restent insuffisants pour guider la prise de décision clinique (289).

L'analyse de la respiration représente un outil potentiel de test non invasif pour plusieurs raisons. Tout d'abord, l'idée n'est pas irrationnelle étant donné que le rejet d'allogreffe s'accompagne d'un stress oxydatif résultant de l'augmentation de la production d'espèces

réactives de l'oxygène (ROS) dans le myocarde et donc susceptible de produire des COV (290) ; d'autre part, les ROS dégradent les membranes cellulaires par la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés (PUFA), générant des alcanes qui sont excrétés dans la respiration sous la forme de composés organiques volatils (COV) (120).

Ces COV peuvent fournir des marqueurs de l'intensité du rejet.

Une étude menée par Michael Phillips MD, pionnier dans la recherche de l'analyse respiratoire, et fondateur de Messena Research, a été présentée lors de la session scientifique annuelle de l'American College of Cardiology, en 2002 (289). Cette étude, considérée comme un essai clinique, s'est déroulée sur trois ans, pendant lesquelles l'haleine de 539 patients allogreffés ont été analysées par chromatographie, le jour de la biopsie de contrôle préalablement programmée. Une augmentation des alcanes méthylés a été corrélée aux rejets dépister par la biopsie. Dans le cadre de la procédure de l'étude, les pathologistes examinant les biopsies n'avaient aucune connaissance des résultats des tests respiratoires.

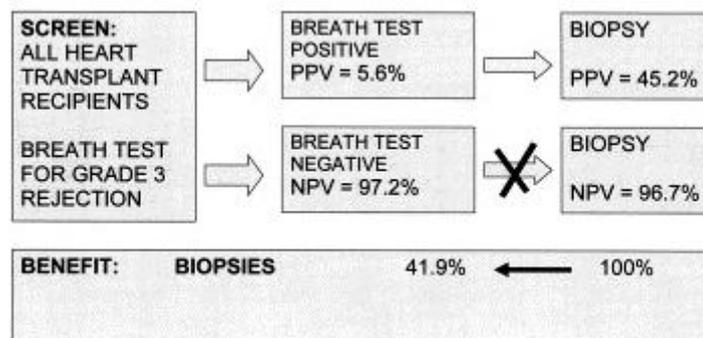


Figure 43 Résultats avec biopsie versus test respiratoire

Si le résultat du test respiratoire est négatif, il n'est pas nécessaire d'effectuer une biopsie car la valeur prédictive négative (VAN) reste pratiquement la même. Si elle est utilisée comme alternative à la biopsie endomyocardique de surveillance de routine chez tous les patients, un test respiratoire de dépistage réduirait le nombre de biopsies effectuées de plus de 50%.

Le syndrome du côlon irritable

L'odeur fécale peut changer en présence de troubles gastro-intestinaux et la compréhension de ces changements peut aider à diagnostiquer diverses maladies. En effet, celle-ci est directement liée aux métabolites organiques volatils (MVO) pouvant être émis par les matières fécales et contribuent à son odeur (291). La compréhension des changements dans les profils de ces COV pourrait nous aider à mieux comprendre l'étiologie de la maladie et le développement de biomarqueurs pouvant aider au diagnostic du syndrome du côlon irritable (292)

Il a été récemment signalé l'existence d'une différence entre le microbiote fécal des patients atteint de SCI et celui des personnes sans syndrome (293). Ce qui conduit à l'hypothèse de l'existence d'un microbiote volatil bactérien spécifique au SCI.

Dans la pratique clinique, il peut être difficile de différencier les patients qui présentent un IBS-D ou une maladie inflammatoire de l'intestin (MICI). Par conséquent, de nombreux médecins s'appuient sur des procédures invasives afin d'exclure les MICI et d'autres maladies organiques. L'utilisation de procédures invasives expose les patients à leurs risques et a un impact économique important (294).

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, Cary P. Quantitative Analysis of Urine Vapor and Breath by Gas-Liquid Partition Chromatography. Proc Natl Acad Sci U S A. oct 1971;68(10):2374-6.
2. Lavoisier respiration experiment, 1770s [Internet]. Kory W. Mathewson. [cité 7 juill 2018]. Disponible sur: <http://korymathewson.com/capture-2/>
3. Histoire contemporaine des médicaments - François CHAST - Google Livres [Internet]. [cité 7 janvier 2018]. Disponible sur: <https://books.google.fr/books?id=wUPwAQAQBAJ&pg=PR125&lpg=PR125&dq=Wilhelm+Petters,+acetone&source=bl&ots=iHVsyLPb7v&sig=TndNGgH1s2ubAN2r4vBaqtTTL70&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwixq8vY5YzcAhVKWhQKHdB0DL0Q6AEILjAB#v=onepage&q=Wilhelm%20Petters%2C%20acetone&f=false>
4. Detection of lung, breast, colorectal, and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors | British Journal of Cancer [Internet]. [cité 2 mars 2018]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/6605810?foxtrotcallback=true>
5. Kendall C, Barr H, Magan N. CHAPTER 9: Volatile Analysis for Clinical Diagnostics. In: Detection Challenges in Clinical Diagnostics [Internet]. 2013 [cité 2 nov 2017]. p. 222-37. Disponible sur: <http://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9781849736121-00222/978-1-84973-612-1>
6. Les cancers en France [Internet]. [cité 29 mai 2018]. Disponible sur: http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers_en_france/#page=4
7. Merlin J-L. Biomarqueurs Moléculaires en Oncologie. Springer; 2014. 175 p.
8. Nature [Internet]. [cité 2 mars 2018]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/6605810.pdf>
9. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 1 mars 2015;136(5):E359-386.
10. Etude de cancer du sein et du cancer colorectal aspect nutritionnel (MNA) et évolution de l'hémoglobine, des leucocytes et des plaquettes en fonction des protocoles thérapeutiques.pdf [Internet]. [cité 26 avr 2018]. Disponible sur: [http://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/biblio/mmf/2017/Etude%20de%20cancer%20du%20sein%20et%20du%20cancer%20colorectal%20%20aspect%20nutritionnel%20\(MNA\)%20et%20%20C3%A9volution%20de%20l%27h%27C3%A9moglobine,%20des%20leucocytes%20et%20des%20plaquettes%20en%20fonction%20des%20protocoles%20th%C3%A9rapeutiques.pdf](http://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/biblio/mmf/2017/Etude%20de%20cancer%20du%20sein%20et%20du%20cancer%20colorectal%20%20aspect%20nutritionnel%20(MNA)%20et%20%20C3%A9volution%20de%20l%27h%27C3%A9moglobine,%20des%20leucocytes%20et%20des%20plaquettes%20en%20fonction%20des%20protocoles%20th%C3%A9rapeutiques.pdf)

11. Cancer [Internet]. World Health Organization. [cité 27 avr 2018]. Disponible sur: <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
12. Organisation mondiale de la santé.france.pdf [Internet]. [cité 2 mars 2018]. Disponible sur: http://www.who.int/cancer/country-profiles/fra_fr.pdf?ua=1%20Profil%20de%20donn%C3%A9es%20cancer%20en%20France%20201
13. Xu Z–., Broza YY, Ionsecu R, Tisch U, Ding L, Liu H, et al. A nanomaterial-based breath test for distinguishing gastric cancer from benign gastric conditions. *Br J Cancer*. mars 2013;108(4):941-50.
14. Wu CC, Maher MM, Shepard J-AO. Complications of CT-guided percutaneous needle biopsy of the chest: prevention and management. *AJR Am J Roentgenol*. juin 2011;196(6):W678-682.
15. Buzyn A. Le Plan cancer 2014-2019 : un plan de lutte contre les inégalités et les pertes de chance face à la maladie, The Cancer Plan 2014-2019: a plan to fight against inequalities and loss of opportunity in the face of illness. *Trib Santé*. 15 juill 2014;(43):53-60.
16. HAS guide des programmes dépistage organisés.pdf [Internet]. [cité 2 mars 2018]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/guide_programme_depistage_rap.pdf
17. Brochure Synthèse- F EDIFICE 4- lipbook [Internet]. [cité 4 avr 2018]. Disponible sur: <https://sftp.rch.cm/france/Edifice/170210-%20EDIFICE%204-%20Brochure%20Synthese-%20Flipbook/files/assets/basic-html/page-6.html>
18. Registre des cancers du sein et autres cancers gynécologiques de Côte d’Or (registre qualifié 2012-2015) / Portail Epidemiologie - France | Health Databases [Internet]. [cité 2 mars 2018]. Disponible sur: <https://epidemiologie-france.aviesan.fr/epidemiologie-france/fiches/registre-des-cancers-du-sein-et-autres-cancers-gynecologiques-de-cote-d-or-registre-qualifie-2012-2015>
19. Rapport du Groupe de réflexion sur l’éthique. Éthique et dépistage organisé du cancer du sein en France [Internet]. Collections Bilans d’activité et d’évaluation, , Boulogne-Billancourt, ouvrage édité par l’INCa; 2012 [cité 20 oct 2017]. Disponible sur: <file:///C:/Users/DELL-E5530/Downloads/ETAETHDEPSEINSYN12.pdf>
20. département dépistage de l’INCa. Bénéfices et limites du programme de dépistage organisé du cancer du sein [Internet]. 2013. Disponible sur: <file:///C:/Users/DELL-E5530/Downloads/Benefices-limites-du-programme-de-depistage-cancer-sein2013.pdf>
21. Hewitson P, Glasziou P, Watson E, Towler B, Irwig L. Cochrane systematic review of colorectal cancer screening using the fecal occult blood test (hemoccult): an update. *Am J Gastroenterol*. juin 2008;103(6):1541-9.

22. JFHOD | SNFGE.org - Société savante médicale française d'hépatogastroentérologie et d'oncologie digestive [Internet]. [cité 3 avr 2018]. Disponible sur: <https://www.snfge.org/content/comparaison-dun-test-immunologique-et-dun-tes>
23. Le test immunologique en images - Dépistage du cancer colorectal | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 3 avr 2018]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Se-faire-depister/Depistage-du-cancer-colorectal/Le-test-immunologique-en-images>
24. L'essentiel sur le test immunologique - Dépistage du cancer colorectal | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 3 avr 2018]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Depistage-et-detection-precoce/Depistage-du-cancer-colorectal/L-essentiel-sur-le-test-immunologique>
25. Le test de dépistage du cancer colorectal gratuit de 50 à 74 ans [Internet]. [cité 2 mars 2018]. Disponible sur: <https://www.ameli.fr/assure/sante/themes/cancer-colorectal/depistage-gratuit-50-74-ans>
26. Le frottis de dépistage - Dépistage du cancer du col de l'utérus | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 2 mars 2018]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Se-faire-depister/Depistage-du-cancer-du-col-de-l-uterus/Le-frottis-de-depistage>
27. Cancer de la prostate | Assuré | ameli.fr [Internet]. [cité 2 mars 2018]. Disponible sur: <https://www.ameli.fr/assure/sante/themes/cancer-prostate>
28. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*. 23 2018;359(6378):926-30.
29. Échographie - Société canadienne du cancer [Internet]. www.cancer.ca. [cité 30 mai 2018]. Disponible sur: <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/diagnosis-and-treatment/tests-and-procedures/ultrasound/?region=qc>
30. IRM - Diagnostic | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 30 mai 2018]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Diagnostic/IRM>
31. A quoi sert-elle ? - IRM et cancer | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 30 mai 2018]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Se-faire-soigner/Traitements/Examens/IRM-et-cancer/A-quoi-sert-elle>
32. Brochure radiographie-scanner.pdf [Internet]. [cité 4 avr 2018]. Disponible sur: <https://www.ligue-cancer.net/sites/default/files/brochures/radiographie-scanner.pdf>
33. Hakim M, Broza YY, Barash O, Peled N, Phillips M, Amann A, et al. Volatile Organic Compounds of Lung Cancer and Possible Biochemical Pathways. *Chem Rev*. 14 nov 2012;112(11):5949-66.

34. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*. 8 mars 2007;446(7132):153-8.
35. Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ, Humphray SJ, Greenman CD, et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature*. 14 janv 2010;463(7278):191-6.
36. COSMIC - Catalogue of Somatic Mutations in Cancer [Internet]. [cité 5 avr 2018]. Disponible sur: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>
37. Yoshimoto M, Kurihara H, Fujii H. Theragnostic Imaging Using Radiolabeled Antibodies and Tyrosine Kinase Inhibitors. *Sci World J* [Internet]. 2015 [cité 5 avr 2018];2015. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4385703/>
38. INSP Poitiers LeDuc_and_al.pdf [Internet]. [cité 2 mars 2018]. Disponible sur: http://www.insp.upmc.fr/webornano/poitiers/LeDuc_and_al.pdf
39. Enhanced permeability and retention effect. In: Wikipedia [Internet]. 2018 [cité 13 juin 2018]. Disponible sur: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Enhanced_permeability_and_retention_effect&oldid=832989937
40. Scarpa L, Buxbaum S, Kendler D, Fink K, Bektic J, Gruber L, et al. The⁶⁸Ga/¹⁷⁷Lu theragnostic concept in PSMA targeting of castration-resistant prostate cancer: correlation of SUVmax values and absorbed dose estimates. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. mai 2017;44(5):788-800.
41. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg Chic Ill* 1960. avr 1992;127(4):392-9.
42. Ellart J, Duquennoy-Martinot V. Technique et indication du ganglion sentinelle dans la chirurgie des tumeurs cutanées. [Httpwwwem-Premiumcomdatatraitest0745-65526](http://www.em-premium.com/traitements/0745-65526) [Internet]. 1 juill 2014 [cité 5 avr 2018]; Disponible sur: <http://www.em.premium.com/article/906249/resultatrecherche/5>
43. Strimbu K, Tavel JA. What are Biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. nov 2010;5(6):463-6.
44. BEAUDEUX J-L, DURAND G. Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives. LAVOISIER. 2011. 608 p.
45. Study Compares Four Genomic Tests for Breast Cancer [Internet]. [Breastcancer.org](http://www.breastcancer.org/research-news/study-compares-4-genomic-tests). [cité 30 mai 2018]. Disponible sur: <http://www.breastcancer.org/research-news/study-compares-4-genomic-tests>
46. Sturgeon CM, Hoffman BR, Chan DW, Ch'ng S-L, Hammond E, Hayes DF, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice

Guidelines for Use of Tumor Markers in Clinical Practice: Quality Requirements. Clin Chem. août 2008;54(8):e1-10.

47. PubMed Central Link [Internet]. [cité 2 mars 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5564312/>
48. Hayes DF, Bast RC, Desch CE, Fritsche H, Kemeny NE, Jessup JM, et al. Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. J Natl Cancer Inst. 16 oct 1996;88(20):1456-66.
49. Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of Archived Specimens in Evaluation of Prognostic and Predictive Biomarkers. JNCI J Natl Cancer Inst. 4 nov 2009;101(21):1446-52.
50. Mouliere F, Thierry AR. The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients. Expert Opin Biol Ther. 1 mai 2012;12(sup1):S209-15.
51. Ramirez JL, Taron M, Balaña C, Sarries C, Mendez P, de Aguirre I, et al. Serum DNA as a tool for cancer patient management. Rocznik Akad Med W Białymstoku 1995. 2003;48:34-41.
52. Circulating tumour DNA the better of the blood biomarkers | Nature Reviews Clinical Oncology [Internet]. [cité 2 mars 2018]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2013.48>
53. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. Nat Med. avr 2014;20(4):430-5.
54. Ahmad N, Haider S, Jagannathan S, Anaissie E, Driscoll JJ. MicroRNA theragnostics for the clinical management of multiple myeloma. Leukemia. avr 2014;28(4):732-8.
55. Lu M, Zhang Q, Deng M, Miao J, Guo Y, Gao W, et al. An Analysis of Human MicroRNA and Disease Associations. PLoS ONE [Internet]. 15 oct 2008 [cité 6 avr 2018];3(10). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2559869/>
56. Schmidt K, Podmore I. Current Challenges in Volatile Organic Compounds Analysis as Potential Biomarkers of Cancer. J Biomark [Internet]. 2015 [cité 13 avr 2018];2015. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4437398/>
57. Chen X, Xu F, Wang Y, Pan Y, Lu D, Wang P, et al. A study of the volatile organic compounds exhaled by lung cancer cells in vitro for breath diagnosis. Cancer. 15 août 2007;110(4):835-44.
58. Cikach FS, Dweik RA. Cardiovascular Biomarkers In Exhaled Breath. Prog Cardiovasc Dis. 2012;55(1):34-43.

59. Smith D, Španěl P. The challenge of breath analysis for clinical diagnosis and therapeutic monitoring. *Analyst*. 30 avr 2007;132(5):390-6.
60. Breath Analysis - For Clinical Diagnosis, Therapeutic Monitoring - A. Amann, D. Smith (World, 2005) WW.pdf [Internet]. [cité 3 mars 2018]. Disponible sur: <https://the-eye.eu/public/Books/Medical/texts/Breath%20Analysis%20-%20For%20Clinical%20Diagnosis%2C%20Therapeutic%20Monitoring%20-%20A.%20Amann%2C%20D.%20Smith%20%28World%2C%202005%29%20W%20W.pdf>
61. Larousse É. Définitions : haleine - Dictionnaire de français Larousse [Internet]. [cité 2 oct 2017]. Disponible sur: <http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/haleine/38882>
62. Miekisch W, Schubert JK. From highly sophisticated analytical techniques to life-saving diagnostics: Technical developments in breath analysis. *TrAC Trends Anal Chem*. 1 juill 2006;25(7):665-73.
63. Amann A, Poupart G, Telser S, Ledochowski M, Schmid A, Mechtcheriakov S. Applications of breath gas analysis in medicine. *Int J Mass Spectrom*. 15 déc 2004;239(2):227-33.
64. Lechner M, Moser B, Niederseer D, Karlseder A, Holzknicht B, Fuchs M, et al. Gender and age specific differences in exhaled isoprene levels. *Respir Physiol Neurobiol*. 1 déc 2006;154(3):478-83.
65. Peng G, Hakim M, Broza YY, Billan S, Abdah-Bortnyak R, Kuten A, et al. Detection of lung, breast, colorectal, and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors. *Br J Cancer*. août 2010;103(4):542-51.
66. Dragonieri S, Quaranta VN, Carratu P, Ranieri T, Resta O. Influence of age and gender on the profile of exhaled volatile organic compounds analyzed by an electronic nose. *J Bras Pneumol*. 2016;42(2):143-5.
67. PHILLIPS M, N CATANEO, R, GREENBERG, J. Effect of age on the breath methylated alkane contour, a display of apparent new markers of oxidative stress. *J Lab Clin Med*. 2000;9(136):243.
68. T ML, Robin P, Bernard S. Breath isoprene in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*. 3(4):423-7.
69. Horváth I, Lázár Z, Gyulai N, Kollai M, Losonczy G. Exhaled biomarkers in lung cancer. *Eur Respir J*. 1 juill 2009;34(1):261-75.
70. Fu X-A, Li M, Knipp RJ, Nantz MH, Bousamra M. Noninvasive detection of lung cancer using exhaled breath. *Cancer Med*. févr 2014;3(1):174-81.
71. King J, Mochalski P, Kupferthaler A, Unterkofler K, Koc H, Filipiak W, et al. Dynamic profiles of volatile organic compounds in exhaled breath as determined by a coupled PTR-MS/GC-MS study. *Physiol Meas*. 2010;31(9):1169.

72. King J, Mochalski P, Unterkofler K, Teschl G, Klieber M, Stein M, et al. Breath isoprene: Muscle dystrophy patients support the concept of a pool of isoprene in the periphery of the human body. *Biochem Biophys Res Commun.* 6 juill 2012;423(3):526-30.
73. Karl T, Prazeller P, Mayr D, Jordan A, Rieder J, Fall R, et al. Human breath isoprene and its relation to blood cholesterol levels: new measurements and modeling. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. août 2001;91(2):762-70.
74. de Lacy Costello B, Amann A, Al-Kateb H, Flynn C, Filipiak W, Khalid T, et al. A review of the volatiles from the healthy human body. *J Breath Res.* mars 2014;8(1):014001.
75. Filipiak W, Ruzsanyi V, Mochalski P, Filipiak A, Bajtarevic A, Ager C, et al. Dependence of exhaled breath composition on exogenous factors, smoking habits and exposure to air pollutants. *J Breath Res [Internet].* sept 2012 [cité 17 juill 2018];6(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3863686/>
76. Statheropoulos M, Agapiou A, Georgiadou A. Analysis of expired air of fasting male monks at Mount Athos. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 7 mars 2006;832(2):274-9.
77. Thompson GN, Walter JH, Bresson JL, Ford GC, Lyonnet SL, Chalmers RA, et al. Sources of propionate in inborn errors of propionate metabolism. *Metabolism.* nov 1990;39(11):1133-7.
78. Frank Kneepkens CM, Lepage G, Roy CC. The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 1 août 1994;17(2):127-60.
79. Zoller O, Sager F, Reinhard H. Furan in food: headspace method and product survey. *Food Addit Contam.* 2007;24 Suppl 1:91-107.
80. Kaushik G, Kaushik T, Khanduja S, Pathak CM, Khanduja KL. Cigarette smoke condensate promotes cell proliferation through disturbance in cellular redox homeostasis of transformed lung epithelial type-II cells. *Cancer Lett.* 18 oct 2008;270(1):120-31.
81. Analysis of exhaled breath from smokers, passive smokers and non-smokers by solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry - Buszewski - 2009 - *Biomedical Chromatography - Wiley Online Library [Internet].* [cité 18 juill 2018]. Disponible sur: <https://onlinelibrary-wiley-com.proxy-scd.u-bourgogne.fr/doi/abs/10.1002/bmc.1141>
82. Beauchamp J. Inhaled today, not gone tomorrow: pharmacokinetics and environmental exposure of volatiles in exhaled breath. *J Breath Res.* 2011;5(3):037103.

83. Volatile Organic Compounds (VOC) as non-invasive biomarkers for a range of diseases. [Internet]. [cité 13 mars 2018]. Disponible sur: <https://www.owlstonemedical.com/science-technology/voc-biomarkers/>
84. German JB, Hammock BD, Watkins SM. Metabolomics: building on a century of biochemistry to guide human health. *Metabolomics Off J Metabolomic Soc.* mars 2005;1(1):3-9.
85. Dettmer K, Hammock BD. Metabolomics--a new exciting field within the « omics » sciences. *Environ Health Perspect.* mai 2004;112(7):A396-7.
86. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell.* juin 2008;13(6):472-82.
87. Griffin JL, Shockcor JP. Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer.* juill 2004;4(7):551-61.
88. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Eisner R, Young N, Gautam B, et al. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res.* 1 janv 2009;37(suppl_1):D603-10.
89. Beale DJ, Jones OAH, Karpe AV, Dayalan S, Oh DY, Kouremenos KA, et al. A Review of Analytical Techniques and Their Application in Disease Diagnosis in Breathomics and Salivaomics Research. *Int J Mol Sci* [Internet]. 23 déc 2016 [cité 23 juill 2018];18(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5297659/>
89. Volatilome Wikipedia [Internet]. 2018 [cité 23 mars 2018]. Disponible sur: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Volatilome&oldid=818846973>
91. Phillips M, Herrera J, Krishnan S, Zain M, Greenberg J, Cataneo RN. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. *J Chromatogr B Biomed Sci App.* 11 juin 1999;729(1-2):75-88.
92. Phillips M, Herrera J, Krishnan S, Zain M, Greenberg J, Cataneo RN. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. *J Chromatogr B Biomed Sci App.* 11 juin 1999;729(1-2):75-88.
93. Erhart S, Amann A, Haberlandt E, Edlinger G, Schmid A, Filipiak W, et al. 3-Heptanone as a potential new marker for valproic acid therapy. *J Breath Res.* 2009;3(1):016004.
94. Eisenmann A, Amann A, Said M, Datta B, Ledochowski M. Implementation and interpretation of hydrogen breath tests. *J Breath Res.* 1 déc 2008;2(4):046002.
95. Cramer PH, Boggess KE, Hosenfeld JM, Remmers JC, Breen JJ, Robinson PE, et al. Determination of organic chemicals in human whole blood: preliminary method development for volatile organics. *Bull Environ Contam Toxicol.* avr 1988;40(4):612-8.

96. Ojanperä I, Pihlainen K, Vuori E. Identification Limits for Volatile Organic Compounds in the Blood by Purge-and-Trap GC-FTIR. *J Anal Toxicol.* 1 juill 1998;22(4):290-5.
97. Abuse NI on D. Inhalants [Internet]. [cité 25 juill 2018]. Disponible sur: <https://www.drugabuse.gov/publications/drugfacts/inhalants>
98. Horvath G, Andersson H, Paulsson G. Characteristic odour in the blood reveals ovarian carcinoma. *BMC Cancer.* 24 nov 2010;10:643.
98. Test Ammoniaque [Internet]. [cité 25 mai 2018]. Disponible sur: <http://www.labtestsonline.fr/tests/Ammonia.html?tab=2>
100. Penn DJ, Oberzaucher E, Grammer K, Fischer G, Soini HA, Wiesler D, et al. Individual and gender fingerprints in human body odour. *J R Soc Interface.* 22 avr 2007;4(13):331-40.
101. Vaglio S, Minicozzi P, Bonometti E, Mello G, Chiarelli B. Volatile Signals During Pregnancy: A Possible Chemical Basis for Mother–Infant Recognition. *J Chem Ecol.* janv 2009;35(1):131-9.
102. Buszewski B, Ligor T, Rudnicka J, Jezierski T, Walczak M, Wenda-Piesik A. Chapter 10 - Analysis of Cancer Biomarkers in Exhaled Breath and Comparison with Sensory Indications by Dogs. In: Amann A, Smith D, éditeurs. *Volatile Biomarkers* [Internet]. Boston: Elsevier; 2013 [cité 25 juill 2018]. p. 177-92. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444626134000106>
103. Wallace P. Individual discrimination of humans by odor. *Physiol Behav.* oct 1977;19(4):577-9.
104. Kuukasjärvi S, Eriksson CJP, Koskela E, Mappes T, Nissinen K, Rantala MJ. Attractiveness of women's body odors over the menstrual cycle: the role of oral contraceptives and receiver sex. *Behav Ecol.* 1 juill 2004;15(4):579-84.
105. AL-Kateb H, Costello B de L, Ratcliffe N. An investigation of volatile organic compounds from the saliva of healthy individuals using headspace-trap/GC-MS. *J Breath Res.* 2013;7(3):036004.
106. Kostelc JG, Zelson PR, Preti G, Tonzetich J. Quantitative differences in volatiles from healthy mouths and mouths with periodontitis. *Clin Chem.* 1 juin 1981;27(6):842-5.
107. Alagendran S, Archunan G, Rameshkumar K, Kadalmani B, Rodriguez JA de L, Fernandez G, et al. 2-Nonenal-Ovulatory Specific Volatiles in Human Saliva throughout Menstrual Cycle by Gas Chromatography and Mass Spectrometry Analysis. *Am J Biochem Biotechnol.* 30 sept 2010;6(3):187-94.
108. Mills GA, Walker V. Headspace solid-phase microextraction profiling of volatile compounds in urine: application to metabolic investigations. *J Chromatogr B Biomed Sci App.* 5 avr 2001;753(2):259-68.

109. Mitchell SC, Zhang AQ. Methylamine in human urine. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* oct 2001;312(1-2):107-14.
110. Garner CE, Smith S, de Lacy Costello B, White P, Spencer R, Probert CSJ, et al. Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* juin 2007;21(8):1675-88.
111. De Preter V, Van Staeyen G, Esser D, Rutgeerts P, Verbeke K. Development of a screening method to determine the pattern of fermentation metabolites in faecal samples using on-line purge-and-trap gas chromatographic–mass spectrometric analysis. *J Chromatogr A.* 27 févr 2009;1216(9):1476-83.
112. Pellizzari ED, Hartwell TD, Harris BS, Waddell RD, Whitaker DA, Erickson MD. Purgeable organic compounds in mother’s milk. *Bull Environ Contam Toxicol.* mars 1982;28(3):322-8.
113. Blount BC, McElprang DO, Chambers DM, Waterhouse MG, Squibb KS, LaKind JS. Methodology for collecting, storing, and analyzing human milk for volatile organic compounds. *J Environ Monit.* 2010;12(6):1265.
114. Buettner A. A selective and sensitive approach to characterize odour-active and volatile constituents in small-scale human milk samples. *Flavour Fragr J.* 22(6):465-73.
115. Directive n° 1999/13/CE du 11/03/99 relative à la réduction des émissions de composés organiques volatils dues à l’utilisation de solvants organiques dans certaines activités et installations | AIDA [Internet]. [cité 3 mars 2018]. Disponible sur: https://aida.ineris.fr/consultation_document/1015
116. Décret n° 2006-623 du 29 mai 2006 relatif à la réduction des émissions de composés organiques volatils dues à l’utilisation de solvants organiques dans certains vernis et peintures et dans les produits de retouche de véhicules | Legifrance [Internet]. [cité 3 mars 2018]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/2006/5/29/DEVP0640026D/jo/texte>
117. Haick H, Broza YY, Mochalski P, Ruzsanyi V, Amann A. Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers. *Chem Soc Rev.* 7 mars 2014;43(5):1423-49.
118. Fens N, Schee MP van der, Brinkman P, Sterk PJ. Exhaled breath analysis by electronic nose in airways disease. Established issues and key questions. *Clin Exp Allergy.* 1 juill 2013;43(7):705-15.
119. GARAIT B. Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®. :196.
120. Guichardant M, Bacot S, Molière P, Lagarde M. Les biomarqueurs de la peroxydation lipidique. *Ol Corps Gras Lipides.* janv 2006;13(1):31-4.

121. Buszewski B, Kęsy M, Ligor T, Amann A. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed Chromatogr.* 1 juin 2007;21(6):553-66.
122. Buszewski B, Ligor T, Jeziński T, Wenda-Piesik A, Walczak M, Rudnicka J. Identification of volatile lung cancer markers by gas chromatography–mass spectrometry: comparison with discrimination by canines. *Anal Bioanal Chem.* juill 2012;404(1):141-6.
123. Amal H, Ding L, Liu B, Tisch U, Xu Z, Shi D, et al. The scent fingerprint of hepatocarcinoma: in-vitro metastasis prediction with volatile organic compounds (VOCs). *Int J Nanomedicine.* 2012;7:4135-46.
124. Hakim M, Billan S, Tisch U, Peng G, Dvorkind I, Marom O, et al. Diagnosis of head-and-neck cancer from exhaled breath. *Br J Cancer.* 10 mai 2011;104(10):1649-55.
125. Gas Sensor Roadmap.pdf [Internet]. [cité 20 mars 2018]. Disponible sur: <http://www.scienco.com/PDF%27s/Gas%20Sensor%20Roadmap.pdf>
126. Amann A, Smith PS and D. Breath Analysis: The Approach Towards Clinical Applications [Internet]. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* 2007 [cité 3 mars 2018]. Disponible sur: <http://www.eurekaselect.com/77692/article>
127. UE3-2 - Physiologie Respiratoire. Chapitre 8 : Echanges gazeux. Docteur Sandrine LAUNOIS-ROLLINAT - PDF [Internet]. [cité 31 mai 2018]. Disponible sur: <http://docplayer.fr/21041661-Ue3-2-physiologie-physiologie-respiratoire-chapitre-8-echanges-gazeux-docteur-sandrine-launois-rollinat.html>
128. Miekisch W, Kischkel S, Sawacki A, Liebau T, Mieth M, Schubert JK. Impact of sampling procedures on the results of breath analysis. *J Breath Res.* 2008;2(2):026007.
129. Salvo P, Ferrari C, Persia R, Ghimenti S, Lomonaco T, Bellagambi F, et al. A dual mode breath sampler for the collection of the end-tidal and dead space fractions. *Med Eng Phys.* juin 2015;37(6):539-44.
130. Schubert JK, Miekisch W, Birken T, Geiger K, Nöldge-Schomburg GFE. Impact of inspired substance concentrations on the results of breath analysis in mechanically ventilated patients. *Biomarkers.* 1 janv 2005;10(2-3):138-52.
131. Bhavani-Shankar K, Philip JH. Defining segments and phases of a time capnogram. *Anesth Analg.* oct 2000;91(4):973-7.
132. Anderson JC, Babb AL, Hlastala MP. Modeling soluble gas exchange in the airways and alveoli. *Ann Biomed Eng.* déc 2003;31(11):1402-22.
133. Lawal O, Ahmed WM, Nijssen TME, Goodacre R, Fowler SJ. Exhaled breath analysis: a review of ‘breath-taking’ methods for off-line analysis. *Metabolomics.* 1 oct 2017;13(10):110.

134. Jones AW. Role of rebreathing in determination of the blood-breath ratio of expired ethanol. *J Appl Physiol.* oct 1983;55(4):1237-41.
135. Ohlsson J, Ralph DD, Mandelkorn MA, Babb AL, Hlastala MP. Accurate measurement of blood alcohol concentration with isothermal rebreathing. *J Stud Alcohol.* janv 1990;51(1):6-13.
136. Cope KA, Watson MT, Foster WM, Sehnert SS, Risby TH. Effects of ventilation on the collection of exhaled breath in humans. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. avr 2004;96(4):1371-9.
137. Phillips M, Altorki N, Austin JHM, Cameron RB, Cataneo RN, Greenberg J, et al. Prediction of lung cancer using volatile biomarkers in breath. :15.
138. Phillips M, Greenberg J. Ion-Trap Detection of Volatile Organic Compounds in Alveolar Breath. :6.
139. Williams DE. Semiconducting oxides as gas-sensitive resistors. *Sens Actuators B Chem.* 7 sept 1999;57(1):1-16.
140. Basanta M, M. Jarvis R, Xu Y, Blackburn G, Tal-Singer R, Woodcock A, et al. Non-invasive metabolomic analysis of breath using differential mobility spectrometry in patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy smokers. *Analyst.* 2010;135(2):315-20.
141. Development O of R&. Methodological Issues of Sample Collection and Analysis of Exhaled Breath [Internet]. [cité 3 mars 2018]. Disponible sur: https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?dirEntryId=218723
142. Mochalski P, King J, Unterkofler K, Amann A. Stability of selected volatile breath constituents in Tedlar, Kynar and Flexfilm sampling bags. *The Analyst.* 7 mars 2013;138(5):1405-18.
143. Rattray NJW, Hamrang Z, Trivedi DK, Goodacre R, Fowler SJ. Taking your breath away: metabolomics breathes life in to personalized medicine. *Trends Biotechnol.* oct 2014;32(10):538-48.
144. Kwak J, Fan M, Harshman SW, Garrison CE, Dershem VL, Phillips JB, et al. Evaluation of Bio-VOC Sampler for Analysis of Volatile Organic Compounds in Exhaled Breath. *Metabolites.* 29 sept 2014;4(4):879-88.
141. Exhaled breath and oral cavity VOCs as potential biomarkers in oral cancer patients MBouza1, J Gonzalez-Soto2, RPereiro1, JCde Vicente2,3 andASanz-Medell1. Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, E-33006 Oviedo, Spain. Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), E-33011 Oviedo, Spain Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, Spain [Internet]. [cité 3 mars 2018]. Disponible sur: <http://iopscience.iop.org.proxy-scd.u-bourgogne.fr/article/10.1088/1752-7163/aa5e76/pdf>

146. Dettmer K, Engewald W. Adsorbent materials commonly used in air analysis for adsorptive enrichment and thermal desorption of volatile organic compounds. *Anal Bioanal Chem.* 1 juill 2002;373(6):490-500.
147. Fernandez-Villarrenaga V, López-Mahía P, Muniategui-Lorenzo S, Prada-Rodríguez D, Fernández-Fernández E, Tomás X. Optimization of a Thermal Desorption Method for a Mixture of Volatile Organic Compounds (C 1 –C 10): Comparison of Two Types of Cold-Traps. *Anal Lett.* 1 janv 2004;37:3313-30.
148. Kang S, Paul Thomas CL. 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.* 7 juin 2016;10(2):026011.
149. Vas G, Vékey K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J Mass Spectrom JMS.* mars 2004;39(3):233-54.
150. Lord HL, Zhan W, Pawliszyn J. Fundamentals and applications of needle trap devices: a critical review. *Anal Chim Acta.* 10 sept 2010;677(1):3-18.
151. Trefz P, Rösner L, Hein D, Schubert JK, Miekisch W. Evaluation of needle trap micro-extraction and automatic alveolar sampling for point-of-care breath analysis. *Anal Bioanal Chem.* avr 2013;405(10):3105-15.
148. Les méthodes d'analyses. :20. chromatographie en phase gazeuse.
153. Rouessac F, Rouessac A, Cruché D, Duverger-Arfulso C, Martel A. *Analyse chimique - 8e éd.: Méthodes et techniques instrumentales.* Dunod; 2016. 568 p.
154. Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry (SIFT-MS) [Internet]. Syft Technologies. [cité 9 juill 2018]. Disponible sur: <https://www.syft.com/sift-ms/>
155. Proton-transfer-reaction mass spectrometry. In: Wikipedia [Internet]. 2018 [cité 9 juill 2018]. Disponible sur: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Proton-transfer-reaction_mass_spectrometry&oldid=847526966
156. Jordan A, Haidacher S, Hanel G, Hartungen E, Herbig J, Maerk L, et al. An online ultra-high sensitivity Proton-transfer-reaction mass-spectrometer combined with switchable reagent ion capability (PTR SRI- MS). *Int J Mass Spectrom.* 2009;286:32–38.
157. Kumar S, Huang J, Abbassi-Ghadi N, Mackenzie HA, Veselkov KA, Hoare JM, et al. Mass Spectrometric Analysis of Exhaled Breath for the Identification of Volatile Organic Compound Biomarkers in Esophageal and Gastric Adenocarcinoma. *Ann Surg.* déc 2015;262(6):981-90.
158. Lourenço C, Turner C. Breath Analysis in Disease Diagnosis: Methodological Considerations and Applications. *Metabolites.* 20 juin 2014;4(2):465-98.
159. L'Odorat [Internet]. [cité 7 juin 2018]. Disponible sur: <http://www.corinnacoulmas.eu/l-odorat.html>

160. ISB-SIB: Protéines à la Une [Internet]. [cité 10 juill 2018]. Disponible sur: <https://web.expasy.org/prolune/dossiers/014/>
157. L.R. Bijland, M.K. Bomers, Y.M. Smulderssmelling the diagnosis a review on the use of scent in diagnosing disease_Department of Internal Medicine, VU University Medical Centre, Amsterdam, the Netherlands, [cité 8 mars 2018]. Disponible sur: <http://www.njmonline.nl/getpdf.php?id=1330>
158. SNIFFER DOGS IN THE MELANOMA CLINIC? THE LANCET, APRIL 1, 1989.pdf [Internet]. [cité 3 mars 2018]. Disponible sur: https://ac-els-cdn-com.proxy-scd.u-bourgogne.fr/S0140673689922575/1-s2.0-S0140673689922575-main.pdf?_tid=7c7f8c4c-a48f-47f3-91e8-b9ad37fff6d8&acdnat=1520079599_118940df6eac8efbf2b272456ac77153
163. Williams H, Pembroke A. SNIFFER DOGS IN THE MELANOMA CLINIC? The Lancet. 1 avr 1989;333(8640):734.
164. Ehmann R, Boedeker E, Friedrich U, Sagert J, Dippon J, Friedel G, et al. Canine scent detection in the diagnosis of lung cancer: revisiting a puzzling phenomenon. Eur Respir J. 1 mars 2012;39(3):669-76.
161. Cancer du sein : l'Institut Curie teste deux Bergers Malinois à détecter la maladie [Internet]. Blog dogfidelity. 2016 [cité 7 juin 2018]. Disponible sur: <http://blog.dogfidelity.com/2016/11/cancer-sein-linstitut-curie-teste-deux-bergers-malinois-a-detecter-maladie/>
166. Bijland LR, Bomers MK, Smulders YM. Smelling the diagnosis A review on the use of scent in diagnosing disease. August T. 2013;(6):8.
167. Vadurel A, Gogny M. L'odorat du chien : aspects physiologiques et facteurs de variation. Point Vét. 1997;181.
164. M. Zographos. LES CHIENS POUR LA DÉTECTION D'AFFECTIONS MÉDICALES.thèse docteur vétérinaire.telecharger.pdf [Internet]. [cité 12 mars 2018]. Disponible sur: <http://theses.vet-alfort.fr/telecharger.php?id=2072>
165. M. Zographos. LES CHIENS POUR LA DÉTECTION D'AFFECTIONS MÉDICALES.thèse docteur vétérinaire.telecharger.pdf [Internet]. [cité 12 mars 2018]. Disponible sur: <http://theses.vet-alfort.fr/telecharger.php?id=2072> telecharger.pdf [Internet]. [cité 7 juin 2018]. Disponible sur: <http://theses.vet-alfort.fr/telecharger.php?id=2072>
170. Willis CM, Church SM, Guest CM, Cook WA, McCarthy N, Bransbury AJ, et al. Olfactory detection of human bladder cancer by dogs: proof of principle study. BMJ. 25 sept 2004;329(7468):712.
171. KDOG - Cancer Detect Group [Internet]. KDOG - Cancer Detect Group. [cité 16 mai 2018]. Disponible sur: <http://www.kdog.fr/nous-contacter>
172. Isabelle Fromantin : « la recherche en soins infirmiers comme leitmotiv » [Internet]. Institut Curie. [cité 16 mai 2018]. Disponible sur:

<https://curie.fr/actualite/cancers-du-sein/isabelle-fromantin-la-recherche-en-soins-infirmiers-comme-leitmotiv>

173. McCulloch M, Jezierski T, Broffman M, Hubbard A, Turner K, Janecki T. Diagnostic Accuracy of Canine Scent Detection in Early- and Late-Stage Lung and Breast Cancers. *Integr Cancer Ther.* 1 mars 2006;5(1):30-9.
174. Cornu J-N, Cancel-Tassin G, Ondet V, Girardet C, Cussenot O. Olfactory detection of prostate cancer by dogs sniffing urine: a step forward in early diagnosis. *Eur Urol.* févr 2011;59(2):197-201.
175. Guerrero-Flores H, Apresa-García T, Garay-Villar Ó, Sánchez-Pérez A, Flores-Villegas D, Bandera-Calderón A, et al. A non-invasive tool for detecting cervical cancer odor by trained scent dogs. *BMC Cancer* [Internet]. 26 janv 2017 [cité 30 juill 2018];17. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5267360/>
176. Scent-Trained Dog Detects Thyroid Cancer in Human Urine Samples | Endocrine Society [Internet]. [cité 3 mars 2018]. Disponible sur: <https://www.endocrine.org/news-room/press-release-archives/2015/scent-trained-dog-detects-thyroid-cancer-in-human-urine-samples>
177. Lung cancer detection by canine scent: will there be a lab in the lab? | European Respiratory Society [Internet]. [cité 10 juill 2018]. Disponible sur: <http://erj.ersjournals.com/content/39/3/511.short>
178. Horvath G, Järverud GAK, Järverud S, Horváth I. Human ovarian carcinomas detected by specific odor. *Integr Cancer Ther.* juin 2008;7(2):76-80.
179. Proboscis extension reflex. Wikipédia [Internet]. 23 févr 2018 [cité 5 mars 2018]; Disponible sur: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Proboscis_extension_reflex&oldid=827202146
180. Chiva. Des abeilles formées pour détecter le cancer aux premiers stades en dix minutes ! [Internet]. 2016 [cité 10 juill 2018]. Disponible sur: <https://www.plus-saine-la-vie.com/sante/des-abeilles-formees-pour-detecter-le-cancer-aux-premiers-stades-en-dix-minutes/>
175. Weetjens. Rats Pouched dans la détection de TB [Internet]. [cité 7 mars 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4634033/>
182. Mgone GF, Weetjens BJ, Nawrath T, Cox C, Jubitana M, Machang'u RS, et al. Diagnosis of Tuberculosis by Trained African Giant Pouched Rats and Confounding Impact of Pathogens and Microflora of the Respiratory Tract. *J Clin Microbiol.* févr 2012;50(2):274-80.
183. Mahoney A, Weetjens BJ, Cox C, Beyene N, Reither K, Makingi G, et al. Pouched Rats' Detection of Tuberculosis in Human Sputum: Comparison to Culturing and Polymerase Chain Reaction. *Tuberc Res Treat* [Internet]. 2012 [cité 3 mars

- 2018];2012. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3400328/>
184. APOPO | Training rats to save lives [Internet]. [cité 7 mars 2018]. Disponible sur: <https://www.apopo.org/en>
179. Can Now Fund Mine-Detecting « Super Rats » [Internet]. CoinDesk. 2014 [cité 7 mars 2018]. Disponible sur: <https://www.coindesk.com/bitcoin-donations-can-now-fund-mine-detecting-super-rats/>
186. APOPO. In: Wikipédia [Internet]. 2018 [cité 7 mars 2018]. Disponible sur: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=APOPO&oldid=827146946>
187. Persaud K, Dodd G. Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose. *Nature*. 23 sept 1982;299(5881):352-5.
188. Veille scientifique et technologique [Internet]. France Diplomatie : : Ministère de l'Europe et des Affaires étrangères. [cité 14 mars 2018]. Disponible sur: <https://www.diplomatie.gouv.fr/fr/politique-etrangere-de-la-france/diplomatie-scientifique/veille-scientifique-et-technologique/>
189. Menini P. Du capteur de gaz à oxydes métalliques vers les nez électroniques sans fil.
190. Tropis C. Analyse et Optimisation des performances d'un capteur de gaz à base de SnO₂ nanoparticulaire: Application à la détection de CO et CO₂. :260.
191. Korotcenkov G. Metal oxides for solid-state gas sensors: What determines our choice? *Mater Sci Eng B*. 25 avr 2007;139(1):1-23.
192. Oblov K, Ivanova A, Soloviev S, Samotaev N, Vasiliev A, Sokolov A. Fabrication of MEMS Platform for Sensors Applications by Laser Micro Engraving. *Phys Procedia*. 2015;72:475-9.
193. What Your Breath May Tell You About Your Health: 5 Conditions That Can Show In Your Breath [Internet]. Medical Daily. 2014 [cité 14 mars 2018]. Disponible sur: <http://www.medicaldaily.com/what-your-breath-may-tell-you-about-your-health-5-conditions-can-show-your-breath-277374>
194. Covington JA, van. der Schee MP, Edge ASL, Boyle B, Savage RS, Arasaradnam RP. The application of FAIMS gas analysis in medical diagnostics. *The Analyst*. 2015;140(20):6775-81.
190. Lorsque le smartphone se transforme en éthylomètre | Proxima Mobile : applications et services gratuits sur mobile pour les citoyens [Internet]. [cité 14 mars 2018]. Disponible sur: <http://www.proximamobile.fr/article/lorsque-le-smartphone-se-transforme-en%E2%80%A6-ethylometre>
196. SniffPhone | Smart Phone for Disease Detection from Exhaled Breath [Internet]. [cité 14 mars 2018]. Disponible sur: <https://www.sniffphone.eu/>

197. European Commission : CORDIS : Projects and Results : Periodic Reporting for period 2 - SNIFFPHONE (Smart Phone for Disease Detection from Exhaled Breath) [Internet]. [cité 14 mars 2018]. Disponible sur: https://cordis.europa.eu/result/rcn/190094_en.html
198. Zhang J, Rector J, Lin JQ, Young JH, Sans M, Katta N, et al. Nondestructive tissue analysis for ex vivo and in vivo cancer diagnosis using a handheld mass spectrometry system. *Sci Transl Med*. 6 sept 2017;9(406):eaan3968.
194. Dispositif ReCIVA_flyer_v2.0_Screen.pdf [Internet]. [cité 19 avr 2018]. Disponible sur: https://www.owlstonemedical.com/media/uploads/files/ReCIVA_flyer_v2.0_Screen.pdf
200. ReCIVA® Breath Sampler [Internet]. [cité 19 avr 2018]. Disponible sur: <https://www.owlstonemedical.com/products/reciva/>
201. healthinformatics - iKnife [Internet]. [cité 19 avr 2018]. Disponible sur: <https://healthinformatics.wikispaces.com/iKnife>
202. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*. nov 2004;4(11):891-9.
203. Vousden KH, Ryan KM. p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer*. oct 2009;9(10):691-700.
204. Furton KG, Myers LJ. The scientific foundation and efficacy of the use of canines as chemical detectors for explosives | Invited paper for the special issue of *Talanta* 'Methods for Explosive Analysis and Detection'. 1. *Talanta*. 10 mai 2001;54(3):487-500.
205. Spánel P, Smith D, Holland TA, Al Singary W, Elder JB. Analysis of formaldehyde in the headspace of urine from bladder and prostate cancer patients using selected ion flow tube mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM*. 1999;13(14):1354-9.
206. Deng C, Zhang X, Li N. Investigation of volatile biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 5 sept 2004;808(2):269-77.
207. Dragonieri S, Annema JT, Schot R, van der Schee MPC, Spanevello A, Carratú P, et al. An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD. *Lung Cancer*. 1 mai 2009;64(2):166-70.
208. Poli D, Carbognani P, Corradi M, Goldoni M, Acampa O, Balbi B, et al. Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study. *Respir Res*. 2005;6(1):71.
209. Kumar S, Huang J, Abbassi-Ghadi N, Španěl P, Smith D, Hanna GB. Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry Analysis of Exhaled Breath for Volatile Organic

- Compound Profiling of Esophago-Gastric Cancer. *Anal Chem.* 18 juin 2013;85(12):6121-8.
210. Horvath G, Chilo J, Lindblad T. Different volatile signals emitted by human ovarian carcinoma and healthy tissue. *Future Oncol.* 1 juin 2010;6(6):1043-9.
211. Phillips M, Cataneo RN, Saunders C, Hope P, Schmitt P, Wai J. Volatile biomarkers in the breath of women with breast cancer. *J Breath Res.* juin 2010;4(2):026003.
212. Phillips M, Cataneo RN, Ditkoff BA, Fisher P, Greenberg J, Gunawardena R, et al. Volatile markers of breast cancer in the breath. *Breast J.* juin 2003;9(3):184-91.
213. Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature.* 12 févr 2009;457(7231):910-4.
214. D'Amico A, Pennazza G, Santonico M, Martinelli E, Roscioni C, Galluccio G, et al. An investigation on electronic nose diagnosis of lung cancer. *Lung Cancer.* 1 mai 2010;68(2):170-6.
215. Stracci F, Zorzi M, Grazzini G. Colorectal Cancer Screening: Tests, Strategies, and Perspectives. *Front Public Health* [Internet]. 2014 [cité 25 mars 2018];2. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2014.00210/full>
216. Bhattacharyya D, Kumar P, Mohanty SK, Smith YR, Misra M. Detection of Four Distinct Volatile Indicators of Colorectal Cancer using Functionalized Titania Nanotubular Arrays. *Sensors* [Internet]. 4 août 2017 [cité 26 mars 2018];17(8). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5580033/>
217. Altomare DF, Di Lena M, Porcelli F, Travaglio E, Longobardi F, Tutino M, et al. Effects of Curative Colorectal Cancer Surgery on Exhaled Volatile Organic Compounds and Potential Implications in Clinical Follow-up. *Ann Surg.* nov 2015;262(5):862-7.
218. Campbell LF, Farmery L, George SMC, Farrant PBJ. Canine olfactory detection of malignant melanoma. *BMJ Case Rep* [Internet]. 14 oct 2013 [cité 11 mars 2018];2013. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3822260/>
219. Pickel D, Manucy GP, Walker DB, Hall SB, Walker JC. Evidence for canine olfactory detection of melanoma. *Appl Anim Behav Sci.* nov 2004;89(1-2):107-16.
217. SUMMARY OF SAFETY AND PROBABLE BENEFIT Menssana Research, Inc. Hearts breath Test for Grade 3 Heart Transplant Rejection. Michael Phillips MD, FACPH030004B.pdf GeneralInformation. [cité 9 mai 2018]. Disponible sur: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf3/H030004B.pdf
221. Le monitoring du CO2 expiré : de la théorie à la pratique. 2009;10.
222. Indications de la capnographie en préhospitalier et aux urgences. 2009;8.

223. Place de la mesure du NO expiré dans l'asthme - EM|consulte [Internet]. [cité 9 mai 2018]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/rmr/article/146295>
224. Huguet L-N. Haute Autorité de santé. 2015;78.
225. Test respiratoire à l'urée marquée [Diagnostic rapide d'une infection à *Helicobacter pylori*] [Internet]. E-Santé. [cité 9 mai 2018]. Disponible sur: <http://www.e-sante.fr/test-respiratoire-uree-marquee-diagnostic-rapide-infection-helicobacter-pylori/guide/1534>
226. Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World J Gastroenterol*. 28 sept 2014;20(36):12847-59.
227. *Helicobacter pylori*. In: Wikipédia [Internet]. 2018 [cité 10 mai 2018]. Disponible sur: https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Helicobacter_pylori&oldid=148011122
228. Ling D. Carbon-13 urea breath test for *Helicobacter pylori* infection in patients with uninvestigated ulcer-like dyspepsia: an evidence-based analysis. *Ont Health Technol Assess Ser*. 2013;13(19):1-30.
226. HAS Test Helikit.ct-3810_helikit_.pdf [Internet]. [cité 9 avr 2018]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/ct-3810_helikit_.pdf
230. Flourié B. Le test respiratoire à l'hydrogène en gastroentérologie. *Hépatogastro Oncol Dig*. 8 janv 1998;5(1):53-5.
231. Rana SV, Malik A. Breath tests and irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol WJG*. 28 juin 2014;20(24):7587-601.
232. Ducrotté P, Gourcerol G, Leroi A-M. Gastroparésie: Quand y penser? Comment traiter? In: Lévy P, éditeur. *Post'U FMC-HGE* [Internet]. Paris: Springer Paris; 2011 [cité 9 mai 2018]. p. 57-64. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-2-8178-0237-4_7
233. Szarka LA, Camilleri M, Vella A, Burton D, Baxter K, Simonson J, et al. A Stable Isotope Breath Test with a Standard Meal for Abnormal Gastric Emptying of Solids in the Clinic and in Research. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. juin 2008;6(6):635-643.e1.
234. Gastroparésie : Quand y penser ? Comment traiter ? [Internet]. FMC-HGE. 2011 [cité 9 mai 2018]. Disponible sur: <http://www.fmcgastro.org/postu-main/archives/postu-2011-paris/textes-postu-2011-paris/gastroparesie-quand-y-penser-comment-traiter/>
235. Ghos YF, Maes BD, Geypens BJ, Mys G, Hiele MI, Rutgeerts PJ, et al. Measurement of gastric emptying rate of solids by means of a carbon-labeled octanoic acid breath test. *Gastroenterology*. juin 1993;104(6):1640-7.

236. Menssana Research Inc. | Breathtaking Technology | Menssana Publications [Internet]. [cité 28 mai 2018]. Disponible sur: http://www.menssanaresearch.com/publications_Menssana.html
237. Point of Care - Test respiratoire de rejet de greffe de coeur (Heartsbreath) | Produits | Menssana Research, Inc. [Internet]. [cité 14 mai 2018]. Disponible sur: http://www.menssanaresearch.com/products_Heartsbreath_heart_transplant_rejection_Menssana.html
238. Menssana Research Inc. | Breathtaking Technology | About Menssana [Internet]. [cité 14 mai 2018]. Disponible sur: http://www.menssanaresearch.com/about_Menssana.html
239. Menssana Research Inc. | Breathtaking Technology | About Breath Testing: a Brief History [Internet]. [cité 21 mars 2018]. Disponible sur: http://www.menssanaresearch.com/about_breath_testing_a_brief_history_Menssana.html
240. Owlstone Medical - the home of Breath Biopsy® [Internet]. [cité 28 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.owlstonemedical.com/>
241. Breath Biopsy Kits [Internet]. [cité 28 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.owlstonemedical.com/products/breath-biopsy-kits/>
242. Owlstone Medical provides Breath Biopsy Services to AstraZeneca to study disease drivers in Asthma a [Internet]. [cité 28 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.owlstonemedical.com/about/news/2018/apr/9/owlstone-medical-provides-services-to-astrazeneca/>
243. GSK Integrate Owlstone Medical's Breath Biopsy Platform into Respiratory Disease Clinical Trial [Internet]. [cité 28 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.owlstonemedical.com/about/news/2017/nov/27/GSK-breath-biopsy-clinical-trial/>
244. Owlstone Medical Wins Business Innovation Award for Breath Biopsy® Technology [Internet]. [cité 28 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.owlstonemedical.com/about/news/2017/mar/24/owlstone-medical-wins-business-innovation-award/>
242. Etude cancer du poumon.LuCID [Internet]. [cité 28 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.owlstonemedical.com/clinical-pipeline/lucid/>
246. Trial Detail - UK Clinical Trial Gateway [Internet]. [cité 13 mars 2018]. Disponible sur: <https://www.ukctg.nihr.ac.uk/trials/trial-details/trial-details?trialId=10807&query=%257B%2522query%2522%253A%2522lucid%2522%252C%2522facetDef%2522%253A%257B%2522Trial%2520Status%2522%253A%255B%2522Re>

247. Knipp RJ, Li M, Fu X-A, Nantz MH. A versatile probe for chemoselective capture and analysis of carbonyl compounds in exhaled breath. *Anal Methods*. 2015;7(14):6027-33.
245. Erin M. Schumer MPH, MD1, Jaimin R. Trivedi, MPH, MD1, Victor van Berkel MD1, PhD, Matthew C. Black, MD1, Mingxiao Li PhD2, Xiao-An Fu PhD2, Michael Bousamra. High Sensitivity for Lung Cancer Detection by Analysis of Exhaled Carbonyl Compounds_3 II MD1. JTCVS2015B150I6P1517-1524.pdf [Internet]. [cité 12 mai 2018]. Disponible sur: <http://breathdiagnosticsinc.com/articles/JTCVS2015B150I6P1517%E2%80%931524.pdf>
249. Li M, Yang D, Brock G, Knipp RJ, Bousamra M, Nantz MH, et al. Breath carbonyl compounds as biomarkers of lung cancer. *Lung Cancer*. oct 2015;90(1):92-7.
250. Applications – Breath Diagnostics Inc. [Internet]. [cité 12 mai 2018]. Disponible sur: <http://www.breathdiagnosticsinc.com/applications/>
251. Principle of Operation [Internet]. FIT - Breath Research Instrumentation. [cité 12 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.fossiliontech.com/technology/>
252. Analytical Chemistry Instrumentation Development (ACID) [Internet]. Analytical Chemistry Instrumentation Development (ACID). [cité 14 mai 2018]. Disponible sur: <http://acidmariecurie.com/>
253. Presentations [Internet]. Breathtec Biomedical Inc. [cité 12 mai 2018]. Disponible sur: <http://breathtecbiomedical.com/news/presentations/>
254. About Us [Internet]. LNBD. [cité 16 mai 2018]. Disponible sur: <http://lnbd.technion.ac.il/sponsors/>
255. Our Team [Internet]. LNBD. [cité 16 mai 2018]. Disponible sur: <http://lnbd.technion.ac.il/our-team/>
256. Prof. Hossam Haick [Internet]. LNBD. [cité 28 mai 2018]. Disponible sur: <http://lnbd.technion.ac.il/team/prof-hossam-haick/>
257. TR35 2008 - MIT Technology Review [Internet]. [cité 16 mai 2018]. Disponible sur: <http://www2.technologyreview.com/tr35/?year=2008>
258. Publications [Internet]. LNBD. [cité 16 mai 2018]. Disponible sur: <http://lnbd.technion.ac.il/publications/>
256. Laboratoire Technion Israel. News [Internet]. LNBD. [cité 16 mai 2018]. Disponible sur: <http://lnbd.technion.ac.il/news/>
260. King J, Risby TH. The unique contributions of Professor Anton Amann to the field of breath research. *J Breath Res*. 2015;9(4):040201.

261. Favier P par S. KDog : une collaboration multidisciplinaire [Internet]. Aider à Aider. 2017 [cité 18 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.aideraaider.fr/kdog-une-collaboration-multidisciplinaire/>
262. Isabelle Fromantin, entre soins et recherche [Internet]. Institut Curie. [cité 16 mai 2018]. Disponible sur: <https://curie.fr/actualite/innovation/isabelle-fromantin-entre-soins-et-recherche>
263. Westhoff M, Litterst P, Freitag L, Urfer W, Bader S, Baumbach J-I. Ion mobility spectrometry for the detection of volatile organic compounds in exhaled breath of patients with lung cancer: results of a pilot study. *Thorax*. 1 sept 2009;64(9):744-8.
264. Ibrahim B, Basanta M, Cadden P, Singh D, Douce D, Woodcock A, et al. Non-invasive phenotyping using exhaled volatile organic compounds in asthma. *Thorax*. 1 sept 2011;66(9):804-9.
265. Markar SR, Lagergren J, Hanna GB. Research protocol for a diagnostic study of non-invasive exhaled breath analysis for the prediction of oesophago-gastric cancer. *BMJ Open* [Internet]. 6 janv 2016 [cité 21 mai 2018];6(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4716255/>
266. Phillips M, Greenberg J, Sabas M. Alveolar Gradient of Pentane in Normal Human Breath. *Free Radic Res*. 1 janv 1994;20(5):333-7.
267. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med*. juin 1992;119(6):598-620.
268. Broza YY, Har-Shai L, Jeries R, Cancilla JC, Glass-Marmor L, Lejbkowitz I, et al. Exhaled Breath Markers for Nonimaging and Noninvasive Measures for Detection of Multiple Sclerosis. *ACS Chem Neurosci*. 15 nov 2017;8(11):2402-13.
269. Les biomarqueurs en cancérologie | Fondation contre le Cancer [Internet]. [cité 25 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.cancer.be/le-cancer/examens-medicaux/biomarqueurs/les-biomarqueurs-en-canc-erologie>
270. Labar M, Desmoulière A. Cancer du côlon : prévention, dépistage et suivi des patients à l'officine. *Actual Pharm*. 1 juin 2015;54(547):30-5.
271. Vérier-Mine O, Tirelli S, Delemotte A, Charlet J, Zamboni JM, Escoufflaire N. P12 Dépistage de la rétinopathie diabétique en collaboration avec les pharmaciens d'officine du Hainaut. Expérience du réseau Ville-Hôpital DiabHainaut. *Diabetes Metab*. mars 2009;35:A31-2.
272. Halimi S, Hourmant M, Pene-Marie M, Boizel R. 046 Évaluation de la faisabilité d'un co-dépistage diabète et maladies rénales dans les pharmacies d'officine. *Diabetes Metab*. 1 mars 2011;37(1, Supplement 1):A12.
273. Barr DB, Wang RY, Needham LL. Biologic Monitoring of Exposure to Environmental Chemicals throughout the Life Stages: Requirements and Issues for Consideration for the National Children's Study. *Environ Health Perspect*. août 2005;113(8):1083-91.

274. Bos L, J Sterk P, J Schultz M. Volatile Metabolites of Pathogens: A Systematic Review. Vol. 9. 2013. e1003311 p.
275. Kolk AHJ, van Berkel JJBN, Claassens MM, Walters E, Kuijper S, Dallinga JW, et al. Breath analysis as a potential diagnostic tool for tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis*. juin 2012;16(6):777-82.
276. Phillips M, Basa-Dalay V, Blais J, Bothamley G, Chaturvedi A, Modi KD, et al. Point-of-care breath test for biomarkers of active pulmonary tuberculosis. [Httpwwwem-Premiumcomdatarevues14729792v92i4S1472979212000790](http://www.em-premium.com/data/revues/14729792v92i4S1472979212000790) [Internet]. 9 juin 2012 [cité 6 mars 2018]; Disponible sur: <http://www.em-premium.com.proxy-scd.u-bourgogne.fr/article/728210/resultatrecherche/6/complSearch>
272. Marjorie Vrignaud. Matrices nanoporeuses pour la détection de métabolites volatils microbiens par transduction optique directe. *Matériaux*. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. <NNT :2015GREAV017>. <tel-01288232>. [cité 3 mars 2018]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01288232/document>
278. Mazzatenta A, Pokorski M, Sartucci F, Domenici L, Di Giulio C. Volatile organic compounds (VOCs) fingerprint of Alzheimer's disease. *Respir Physiol Neurobiol*. 1 avr 2015;209:81-4.
279. accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service | *Brain* | Oxford Academic [Internet]. [cité 28 mars 2018]. Disponible sur: <https://academic.oup.com/brain/article/125/4/861/260616>
280. Tisch U, Schlesinger I, Ionescu R, Nassar M, Axelrod N, Robertman D, et al. Detection of Alzheimer's and Parkinson's disease from exhaled breath using nanomaterial-based sensors. *Nanomed*. 15 oct 2012;8(1):43-56.
281. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1 sept 1991;82(4):239-59.
282. Mesure du NO expiré dans l'asthme : comment utiliser cet outil ? [Internet]. *Medscape*. [cité 24 avr 2018]. Disponible sur: <http://francais.medscape.com/viewarticle/3600090>
283. Base documentaire & formation en pneumologie [Internet]. [cité 24 avr 2018]. Disponible sur: http://www.respir.com/doc/abonne/base/Test_NO.asp
284. Dallinga JW, Robroeks CMHHT, van Berkel JJBN, Moonen EJC, Godschalk RWL, Jöbsis Q, et al. Volatile organic compounds in exhaled breath as a diagnostic tool for asthma in children. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. janv 2010;40(1):68-76.
285. Fens N, Zwinderman AH, van der Schee MP, de Nijs SB, Dijkers E, Roldaan AC, et al. Exhaled Breath Profiling Enables Discrimination of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 déc 2009;180(11):1076-82.

286. Shin H-W, Ueber BJ, Meinardi S, Leu S-Y, Zaldivar F, Blake DR, et al. Acetaldehyde and hexanaldehyde from cultured white cells. *J Transl Med.* 29 avr 2009;7:31.
287. Barker M, Hengst M, Schmid J, Buers H-J, Mittermaier B, Klemp D, et al. Volatile organic compounds in the exhaled breath of young patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 1 mai 2006;27(5):929-36.
288. McGrath LT, Patrick R, Mallon P, Dowey L, Silke B, Norwood W, et al. Breath isoprene during acute respiratory exacerbation in cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 1 déc 2000;16(6):1065-9.
289. Phillips M, Boehmer JP, Cataneo RN, Cheema T, Eisen HJ, Fallon JT, et al. Heart allograft rejection: detection with breath alkanes in low levels (the HARDBALL study). *J Heart Lung Transplant.* 1 juin 2004;23(6):701-8.
290. Oxidative stress in the human heart is associated with changes in the antioxidative defense as shown after heart transplantation | SpringerLink [Internet]. [cité 26 avr 2018]. Disponible sur: <https://link-springer-com.proxy-scd.u-bourgogne.fr/article/10.1023%2FA%3A1007030322514>
291. De Lacy Costello B, Ewen R, Ewer AK, Garner CE, Probert CSJ, Ratcliffe NM, et al. An analysis of volatiles in the headspace of the faeces of neonates. *J Breath Res.* sept 2008;2(3):037023.
292. Ahmed I, Greenwood R, Costello B de L, Ratcliffe NM, Probert CS. An Investigation of Fecal Volatile Organic Metabolites in Irritable Bowel Syndrome. *PLoS ONE* [Internet]. 13 mars 2013 [cité 26 avr 2018];8(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3596408/>
293. Codling C, O'Mahony L, Shanahan F, Quigley EMM, Marchesi JR. A Molecular Analysis of Fecal and Mucosal Bacterial Communities in Irritable Bowel Syndrome. *Dig Dis Sci.* 1 févr 2010;55(2):392-7.
294. Maxion-Bergemann S, Thielecke F, Abel F, Bergemann R. Costs of irritable bowel syndrome in the UK and US. *PharmacoEconomics.* 2006;24(1):21-37.

TITRE DE LA THÈSE : Nouvelles formes de dépistage et de diagnostic par analyse de l'air expiré. Détection non invasives de cancers.

AUTEUR : BATHELIER MSAYIF Hanane

RESUMÉ : L'exploitation des composés organiques volatils (COV) offre une nouvelle génération de biomarqueurs à vocation diagnostic. Ces composés produits dans le corps humain, notamment au cours de processus pathologique comme le stress oxydatif, émanent de diverses sources de l'organisme : la peau, les urines, le lait maternel, le sang, les fèces, l'air expiré, etc. Parmi ces diverses sources, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'haleine dans laquelle des COV peuvent être analysés et servir de biomarqueurs en cancérologie. Ces tests respiratoires à visée diagnostic, de suivi thérapeutique ou de surveillance à la réponse à un traitement, présentent l'avantage considérable d'être non-invasifs, peu coûteux et faciles à mettre en œuvre dans des conditions cliniques de terrain. C'est pourquoi ils font l'objet de nombreuses recherches depuis plusieurs années. Néanmoins, mise à part le célèbre alcootest et la mesure du CO₂ au cours d'une anesthésie, l'utilisation de ces « *breath tests* » est encore plutôt limitée. Cette limitation s'explique par la méthodologie analytique rigoureuse que les tests requièrent, répondant à des exigences strictes en termes de sensibilité, spécificité et reproductibilité, afin de garantir des résultats fiables et exploitables en médecine humaine. L'enjeu méthodologique et technologique est crucial pour démocratiser ce type de test à destination des praticiens mais aussi des patients dans une démarche d'auto-dépistage précoce grâce au développement d'outils portatifs, faciles à utiliser, sous forme de tests disponibles en officines.

MOTS-CLÉS : Biomarqueurs respiratoires, COV, analyse de l'air expiré, tests respiratoires, diagnostic non-invasif du cancer, flair canin