HAL
open science

Application de la volatolomique à la recherche de marqueurs d'exposition aux micropolluants dans le foie, le plasma et le tissu adipeux

Jihéne Bouhlel

To cite this version:

Jihéne Bouhlel. Application de la volatolomique à la recherche de marqueurs d'exposition aux micropolluants dans le foie, le plasma et le tissu adipeux. Chimie analytique. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLA026 . tel-01980862

HAL Id: tel-01980862

https://theses.hal.science/tel-01980862v1

Submitted on 14 Jan 2019

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

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

université PARIS-SACLAY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

NNT : 2017SACLA026

Application de la volatolomique à la recherche de marqueurs d'exposition aux micropolluants dans le foie, le plasma et le tissu adipeux

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Préparée à AgroParisTech
(L'Institut des Sciences et Industries
du Vivant et de l'Environnement)

École doctorale n°581 : Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement et Santé (ABIES)

Spécialité de doctorat: Chimie Analytique

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 26 Septembre 2017, par

Jihéne Bouhlel

Composition du Jury :

Mme Sophie Landaud Professeur, INRA Grignon (UMR GMPA)	Président du jury
Mme Elisabeth Guichard Directeur de recherche, INRA Dijon (UMR GSGA)	Rapporteur
M Serge Rudaz Professeur, Université de Genève	Rapporteur
Mme Evelyne Vigneau Professeur, ONIRIS Nantes (StatSC)	Examinateur
M Erwan Engel Directeur de recherche, INRA Theix (UR QuaPA)	Codirecteur de thèse
M Douglas N Rutledge Professeur, AgroParisTech (UMR GENIAL)	Directeur de thèse

Thèse de doctorat

Remerciements

Je remercie monsieur le **Professeur Douglas N RUTLEDGE**, de m'avoir accueilli dans son laboratoire IAQA à AgroParisTech et m'avoir accompagné de faire cette thèse. Mes sincères remerciements pour ses constants encouragements, sa présence et pour sa confiance dans la direction de cette thèse. Je tiens spécialement à lui remercier de m'avoir transmis la passion de la chimiométrie et de ses conseils bienveillants qui m'ont accompagné le long de mon parcours. Je tiens à lui remercier chaleureusement pour son encadredment, sa compréhension et surout pour son soutien. Je tiens à lui exprimer ma sincère considération et mon profond respect.

Je remercie monsieur le **Docteur Erwan ENGEL** qui est le directeur du projet SOMEAT dans lequel s'insère ma thèse de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire MASS à l'INRA de Clermont Ferrand et m'avoir permis de faire cette thèse portant sur un sujet passionnant et multidisciplinaire. Mes sincères remerciements pour ses encouragements et ses conseils précieux qui furent déterminants dans l'aboutissement de ce travail. Je tiens à lui exprimer ma sincère considération et mon profond respect.

A mes rapporteurs, madame le **Docteur Elisabeth GUICHARD** (INRA de Dijon) et monsieur le **Professeur Serge RUDAZ** (Université de Genève), mes vifs remerciements pour le précieux temps qu'ils ont consacré à la lecture minutieuse de mon manuscrit et à la restitution de leur rapport.

A madame le **Professeur Sophie LANDAUD** (INRA, AgroParisTech) et madame le **Professeur Evelyne VIGNEAU** (ONIRIS, Nantes), je vous adresse mes chaleureux remerciements pour avoir accepté de participer à ce jury et d'examiner ce travail.

Mes remerciement s'addressent aussi aux docteurs **Julien BOCCARD** (Université de Genève) et Jean-Luc **LEQUERE** (INRA de Dijon) qui ont accepté de faire partie de mon comité de thèse et qui contribué à l'avancement de ce travail par leurs remarques pertinentes et leur conseils.

Je remercie tout particluièrement à monsieur **Jérémy RATEL** (MASS, INRA de Clermont Ferrand) de m'avoir accompagné par ses conseils bienveillants et son co-encadrement pertinent pour aboutir à ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à madame **Estelle PARIS** (IAQA, AgroParisTech) au laboratoire de Chimie Analytiques à AgroParisTech pour sa participation au cours de ce travail de thèse.

Je remercie particulièrement **Delphine BOUVERESSE** (IAQA, AgroParisTech) pour sa présence et son aide à avancer dans mes travaux.

Un grand merci aux collaborateurs du projet SOMEAT, Elisabeth Baeza et Catherine Jondreville (INRA de Nouzilly), Gaud Pinel (LABERCA à Nantes), Roger Rahmani et Georges De-sousa (TOXALIM à l'INRA de Sophia Antipolis) pour leur collaboration.

Un grand merci très chaleureux à tous les membres permanents de l'équipe MASS, Said, Maiia, Frédérique, Pascale, Patrick, Nathalie, et Jean-Louis, que j'ai eu la chance de côtoyer au quotidien, pour la solidarité, la complicité et les bons moments que nous avons partagés tous ensemble.

Je remercie également les membres permanents de l'équipe IAQA à AgroParisTech, Mathieu, Christophe, Roberto, Stéphanie, Nathalie, Nastaranne, Hervé, Camille et Yann, pour leur accueil chaleureux.

Un remerciement particulier pour Beninia et Grégoire.

A monsieur le Professeur Arbi MGAIDI, qui m'a toujours encouragé depuis mon parcours universitaire. Mes sincères remerciements pour sa confiance.

A mon fiancé, qui m'a toujours encouragé du début jusqu'à la fin de ce parcours. Un très grand merci pour sa présence et son soutien.

A mes parents, mon frére et ma meilleure amie qui étaient toujours à mes cotés. Je leur suis très reconnaissante pour leur aide, leur soutien et leur présence malgré la distance.

Enfin, je remercie toutes les personnes, et elles sont nombreuses, qui m'ont aidé de près ou de loin durant ce parcours !

Table des Matières

Table des Matières i
Publications & Communications iv
Liste des figures vii
Liste des tableaux ix
Liste des principales abréviations x
Introduction générale 1
Chapitre I : Synthèse Bibliographique 8
I. Micropolluants 8
I.1. Principales familles de micopolluants dans la chaine de production de viande 8
..... 14
I.2. Justification des micropolluants clés retenus dans le cadre de la thèse 15
I.2.1. Elément métallique trace : le cadmium 17
I.2.2. Micropolluants environnementaux : les PCBs 17
I.2.3. Produits vétérinaires : monensin et ampicilline 18
I.2.4. Produits phytosanitaires : deltaméthrine et lindane 19
I.2.5. Mycotoxines : fumonisines et zéaralénone 20
II. La volatolomique, une option pour tracer l'exposition animale aux micropolluants 21
II.1. Approches omiques 22
II.1.1. Principe 22
II.1.2. Profilage et empreintes métabolomiques 24
II.1.3. Principales étapes de la stratégie expérimentale 26
II.1.3.1. Prélèvement et conservation des échantillons 27
II.1.3.2. Préparation des échantillons biologiques 28
II.1.3.3. Evaluation de la qualité des données 28
II.1.3.4. Déroulement de la session 29
II.2. Volatolomique 29
II.2.1. Le volatolome 29
II.2.2. Mécanismes biochimiques responsables des changements de composition du volatolome 30
III. Analyse du volatolome 33
III.1. Microextraction sur phase solide (SPME) 34
III.1.1. Principe Thermodynamique 35
III.1.2. Principe Cinétique 36
III.1.3. Calibration de la SPME 39
III.2. Verrous analytique pour l'extraction du volatolome par SPME 41
III.2.1. Conditions d'extraction 41

III.2.1.1.Type de fibre 41
III.2.1.2.Température/temps d'extraction 42
III.2.1.3.Agitation 42
III.2.2.Préparation des échantillons 42
III.2.2.1.Equilibre des COVs 42
III.2.2.2. Ajout de sel 43
III.3. Verrous du traitement des données volatolomiques 43
III.3.1. Identification des COVs 43
III.3.2. Prétraitement des données volatolomiques 44
III.3.2.1. Transformation des données 44
III.3.2.2. Normalisation 46
III.3.3. Traitement statistique 47
III.3.3.1. Analyses statistiques univariées 47
III.3.3.2. Analyses statistiques multivariées 49
III.3.3.2.1. Analyse en Composantes Principales (ACP) 50
III.3.3.2.2. Analyse en Composantes Indépendantes (ACI) 51
III.3.3.2.3. Analyse en Composantes Communes (ACC) 53
Chapitre II. Mise au point méthodologique 62
Partie 1. Détermination des paramètres SPME pour l'extraction du volatolome dans le foie. Article 1 64
Partie 2. Comparaison de stratégies chimiométriques non-supervisées pour révéler des discriminations et des marqueurs d'exposition dans des données volatolomiques. Article 2 96
Chapitre III. Recherche de marqueurs volatils dans le foie 127
Chapitre IV. Recherche de marqueurs volatils dans le plasma et les tissus adipeux 163
Partie I. Recherche de marqueurs volatils dans le plasma. Article 3 164
Partie II. Recherche de marqueurs volatils dans les tissus adipeux 192
II.1. Introduction 192
II.2. Matériels et méthodes 192
II.2.1. Expérimentation animale 192
II.2.2. Préparation des échantillons 193
II.2.3. Analyse du volatolome 193
II.2.4. Traitement des données 193
II.3. Résultats et discussion 194
II.3.1. Contrôle de la contamination dans les tissus et les aliments 194
II.3.2. Détermination de marqueurs volatils dans les tissus adipeux 194
II.3.2.1. Cadmium 195
II.3.2.2. Micropolluants environnementaux 196
II.3.2.3. Produits vétérinaires 198

II.3.2.4. Pesticides 199
II.3.2.5. Mycotoxines 201
Discussion générale et Perspectives 206

Publications & Communications

Publications:

E. Engel, J. Ratel, J. Bouhlel, C. Planche, M. Meurillon. Novel approaches to improving the chemical safety of the meat chain towards toxicants. *Meat Science*.109 (2015) 75–85.

Jihéne Bouhlel, Jérémy Ratel, Said Abouelkaram, Frédéric Mercier, Angélique Travel, Elisabeth Baéza, Catherine Jondreville, Gaud Dervilly-Pinel, Philippe Marchand, Bruno Le Bizec, Eric Verdon, Estelle Dubreil, Sophie Mompelat, Chanthadary Inthavong, Thierry Guérin, Douglas N. Rutledge, Erwan Engel. Solid-phase microextraction set-up for the analysis of liver volatolome to detect livestock exposure to micropollutants. *Journal of Chromatography A*. (2017), 1497, 9–18.

Jihéne Bouhlel, Jérémy Ratel, Said Abouelkaram, Elisabeth Baéza, Catherine Jondreville , Angélique Travel, Delphine Jouan-Rimbaud Bouveresse, Erwan Engel, Douglas N. Rutledge. Comparison of Common Components Analysis with Principal Components Analysis and Independent Components Analysis: Application to SPME-GC-MS Volatolomic Signatures. *Talanta*. 2017. Accepted.

Jihéne Bouhlel, Jérémy Ratel, Said Abouelkaram, Frédéric Mercier, Elisabeth Baéza, Catherine Jondreville, Gaud Dervilly-Pinel, Eric Verdon, Thierry Guérin, Douglas N. Rutledge, Erwan Engel. Liver Volatolomics to Reveal Markers of Poultry Exposure to Micropollutants. *Chemosphere*. Submitted.

Jihéne Bouhlel, Jérémy Ratel, Said Abouelkaram, Patrick Blinet, Elisabeth Baéza, Catherine Jondreville, Gaud Dervilly-Pinel, Eric Verdon, Thierry Guérin, Douglas N. Rutledge, Erwan Engel. Plasma Volatolomics to Reveal Markers of Livestock Exposure to Micropollutants. *Metabolomics*. Prepared.

Communications orales

J Bouhlel, J Ratel , G Pinel , T Guerin , E Verdon, E Baeza , A Travel , C Jondreville , D N Rutledge , E Engel. Determination of volatile organic compounds as markers to back trace food chain exposure to micropollutants. 18ème Edition Euro Analysis. Bordeaux, France. 6-10th September 2015.

J Bouhlel, J Ratel, S Abouelkaram, G Pinel, T Guerin, E Verdon, E Baeza, A Travel, C Jondreville, D N Rutledge, E Engel. Determination of volatile organic compounds as markers to back-trace food chain exposure to micropollutants. 7th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis. Prague, Czech Republic. 3rd -6th November 2015.

J Bouhlel, J Ratel, S Abouelkaram, G Pinel, T Guerin, E Verdon, E Baeza, A Travel, C Jondreville, D N Rutledge, E Engel. Investigation of volatolome of body fluids and tissues by SPME-GC-MS to back-trace food chain exposure to micropollutants. 40th International Symposium on Capillary Chromatography and 13th GC×GC Symposium. Riva Del Garda, Italy. Juin 2016.

J Bouhlel, J Ratel, S Abouelkaram, G Pinel, T Guerin, E Verdon, E Baeza, A Travel, C Jondreville, D Bouveresse, E Engel, D N Rutledge. Application de ComDim à la Recherche de Marqueurs D'exposition aux Contaminants Chimiques par une Approche Volatolomique. Chimiométrie XVIII-2017. Paris, France. 30 January-1 February 2017.

Communications affichées

J Bouhlel, J Ratel, S Abouelkaram, E Baeza, C Jondreville, D N Rutledge, E Engel. Use of liver volatile compounds as markers of animal exposure to micropollutants. Avril 2015. ABIES Days, Synthetic biology Sustainable food systems. AgroParisTech, France. 14-15th April 2015.

J Bouhlel, J Ratel, S Abouelkaram, E Baeza, C Jondreville, D N Rutledge, E Engel. Use of liver volatile compounds as markers of animal exposure to micropollutants. 61st International Congress of Meat of Science and Technology, Clermont-Ferrand, France. 23-18th August 2015.

J Bouhlel, J Ratel, S Abouelkaram, E Baéza, C Jondreville, A Travel, D Jouan-Rimbaud Bouveresse, E Engel, D N Rutledge. A comparison of PCA, ICA and Common Components Analysis applied to volatolomic data. Chimiométrie XVIII-2017. Paris, France. 30 January-1 February 2017.

Liste des figures

Figure 1 : La cascade " omique " qui illustre les réponses génomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique décrivant la réponse d'un système biologique à une pathologie ou aux perturbations induites par une exposition environnementale. La métabolomique est la voix qui traduit les changements phénotypiques 23

Figure 2 : Stratégies d'acquisition des données métabolomiques 25

Figure 3 : Description des étapes de la stratégie expérimentale pour l'analyse non ciblée du métabolome 27

Figure 4 : Modèle pathophysiologique dans le foie pour expliquer les sources possibles des composés organiques volatils (COVs) comme marqueurs de pathologies ou d'exposition aux polluants 30

Figure 5 : Mécanisme de détoxification des xénobiotiques au niveau cellulaire. 32

Figure 6 : Profil typique du temps d'extraction des composés volatils par SPME. Copié de l'article Ouyang et al. (2011). 37

Figure 7 : Propriétés des méthodes de calibration par SPME : 40

Figure 8 : Description de l'algorithme de ComDim 54

Figure 9 : Projection selon les 16 premières Composantes Communes (CC) des scores suite à l'application de l'Analyse en Composantes Communes sur l'ensemble des données SPME-GC-MS collectées dans les tissus adipeux du groupe contrôle et des groupes exposés aux différents contaminants 195

Figure 10 : Projection selon les 16 premières Composantes Communes (CC) des scores suite à l'application de l'ACC sur les données SPME-GC-MS collectées dans les tissus adipeux du groupe contrôle (n=15) et du groupe exposé au cadmium (n=9). Les carrés noirs représentent le groupe des animaux contrôles et les losanges violets représentent le groupe des animaux exposés au cadmium..... 196

Figure 11 : Projection selon les 16 premières Composantes Communes (CC) les scores suite à l'application de l'ACC sur les données SPME-GC-MS collectées dans les tissus adipeux du groupe contrôle (n=15) et du groupe exposé à la faible dose de PCBs (n=9). Les carrés noirs représentent le groupe des contrôles et les '**+**' roses représentent le groupe exposé à la faible dose de PCBs..... 197

Figure 12 : Projection selon les 16 premières Composantes Communes (CC) les scores suite à l'application de l'ACC sur les données SPME-GC-MS collectées dans les tissus adipeux du groupe contrôle (n=15) et du groupe exposé à la forte dose de PCBs (n=9). Les carrés noirs

représentent le groupe des contrôles et les triangles rouges représentent le groupe exposé à la forte dose de PCBs. 197

Figure 13 : Projection selon les 16 premières Composantes Communes (CC) les scores suite à l'application de l'ACC sur les données SPME-GC-MS collectées dans les tissus adipeux du groupe contrôle (n=15) et du groupe exposé à la monensine (n=9). Les carrés noirs représentent le groupe des contrôles et les étoiles vertes représentent le groupe de la monensine..... 198

Figure 14 : Projection selon les 16 premières Composantes Communes (CC) les scores suite à l'application de l'ACC sur les données SPME-GC-MS collectées dans les tissus adipeux du groupe contrôle (n=15) et du groupe exposé à l'ampicilline (n=9). Les carrés noirs représentent le groupe des contrôles et les étoiles bleus représentent le groupe exposé à l'ampicilline 199

Figure 15 : Projection selon les 16 premières Composantes Communes (CC) les scores suite à l'application de l'ACC sur les données SPME-GC-MS collectées dans les tissus adipeux du groupe contrôle (n=15) et du groupe exposé à deltaméthrine (n=9). Les carrés noirs représentent le groupe des contrôles et les étoiles bleus représentent le groupe exposé à la deltaméthrine. 200

Figure 16 : Projection selon les 16 premières Composantes Communes (CC) les scores suite à l'application de l'ACC sur les données SPME-GC-MS collectées dans les tissus adipeux du groupe contrôle (n=15) et du groupe exposé au lindane (n=9). Les carrés noirs représentent le groupe des contrôles et les triangles jaunes représentent le groupe exposé au lindane. 200

Figure 17 : Projection selon les 16 premières Composantes Communes (CC) les scores suite à l'application de l'ACC sur les données SPME-GC-MS collectées dans les tissus adipeux du groupe contrôle (n=15) et du groupe exposé aux fumonisines (n=9). Les carrés noirs représentent le groupe des contrôles et les cercles bleus représentent le groupe exposé aux fumonisines. 201

Figure 18 : Projection selon les 16 premières Composantes Communes (CC) les scores suite à l'application de l'ACC sur les données SPME-GC-MS collectées dans les tissus adipeux du groupe contrôle (n=15) et du groupe exposé à la zéaraléone (n=9). Les carrés noirs représentent le groupe des contrôles et les croix vertes représentent le groupe exposé à la zéaralenone. 202

Liste des tableaux

Tableau 1: Noms, familles et formules chimiques des micropolluants clés retenus dans le cadre de ce travail de thèse..... 16

Liste des principales abréviations

-A-	
ACC	Analyse en Composantes Communes
ACI	Analyse en Composantes Indépendante
ACP	Analyse en Composantes Principales
ADN	L'Acide Désoxyribonucléique
ALDH	Aldéhyde Déshydrogénase
ANOVA	Analysis of Variance
-C-	
CAR	Carboxen
CC	Common Component
CCSC	Comprehensive Combinatory Standard Correction
Comdim	Common Components Analysis and Specific Weights
COV	Composé Organique Volatil
CW	Carbowax
CYR	Cythochrome
-D-	
DI	Direct Immersion
DVB	Divinylbenzene
-E-	
EAT	Etude de l'Alimentation Totale
EI	Electronic Ionization
-G-	
GC	Gas Chromatography
GMD	Golm Metabolome DataBase
GTS	Glutathion-S-Transférase
-H-	
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycyliques
HS	Headspace
-I-	
IC	Independent Component
-J-	
JADE	Joint approximate diagonalization of Eigenmatrices
-M-	
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	Tendem Mass Spectrometry
-P-	
PC	Principale Component
PA	Polyacrylate

PBDE	Les Polybromodiphényléthers
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PSPC	Plan de Surveillance et de Contrôle
PQN	Probabilitic Quotient Normalization
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acids
-Q-	
QC	Quality Control
-R-	
RI	Retention Index
RSD	Relative Standard Deviation
RSO	Reactive Oxygen Species
-S-	
SD	Standard Deviation
S/N	Signal/Noise
SNV	Standard Normal Variate
SPME	Solid Phase Microextraction
SRN	Systematic Ratio Normalization
-T-	
TOF-MS	Time of Flight Mass Spectrometry

Introduction générale

En raison de l'augmentation de la demande mondiale en protéines animales, des questions autour de leur impact sur la santé des consommateurs se sont largement posées. Dans ce contexte, plusieurs études scientifiques suggèrent que l'alimentation, et en particulier les régimes riches en protéines, joueraient un rôle majeur dans l'apparition et le développement de nombreuses pathologies *via* notamment l'exposition à diverses substances chimiques toxiques [1,2] désignées sous le terme de micropolluants.

Le transfert alimentaire des micropolluants est notamment induit par les pratiques exercées sur les productions animale et végétale [3]. Le problème est critique pour les produits dérivés des animaux en raison de la tendance connue de ces matrices alimentaires à bio-accumuler les contaminants toxiques tels que les micropolluants environnementaux, les mycotoxines ou les antibiotiques [4]. Bien que les micropolluants soient généralement trouvés à des niveaux de traces dans les produits carnés, ils peuvent constituer un danger pour la santé humaine à la suite d'une exposition chronique.

Jusqu'à présent, les solutions analytiques mises en œuvre pour assurer le contrôle chimique des aliments sont le plus souvent basées sur les techniques classiques employées par les laboratoires nationaux de référence qui ciblent spécifiquement les micropolluants ou leurs résidus dans les aliments et les tissus animaux [5]. Si les performances de ces méthodes les rendent parfaitement adaptées aux mesures ponctuelles réclamées par les autorités sanitaires dans le cadre des plans de surveillance et de contrôle (PSPC), elles sont souvent couteuses et lourdes à mettre en œuvre et de ce fait inadaptées aux besoins en contrôles de routine fréquents pour assurer plus systématiquement la sécurité chimique des aliments [6].

Pour pallier les contraintes des méthodes de référence, de nouvelles approches émergent. Parmi elles, des approches toxico-génomiques qui consistent à analyser les différents profils génomiques [7], transcriptomiques [8], lipidomiques [9], protéomiques [10] et métabolomiques [11] dans les tissus et les fluides des animaux exposés aux micropolluants dans le but de révéler des marqueurs prometteurs pour tracer la contamination.

C'est notamment sur ce volet exploratoire que se positionne la tâche WP5 du projet pluridisciplinaire SOMEAT (Safety of Organic Meat) dans laquelle s'inscrit ce travail de thèse.

Le projet SOMEAT n°ANR-12-ALID-0004 a pour ambition de fournir des données scientifiques objectives pour évaluer les bénéfices et risques éventuels des systèmes de

production de viande biologique au regard de leurs teneurs en contaminants. Le projet donne également un nouvel éclairage sur les déterminants socio-économiques de la consommation de viandes biologiques et propose des approches originales pour tracer les contaminations le long des chaînes de production des viandes [5] . SOMEAT est un projet combinant les recherches fondamentale et industrielle, qui intègre les trois piliers de la durabilité des systèmes de production de viande au moyen d'approches pluridisciplinaires couvrant la chimie des contaminants, l'ingénierie des aliments, la toxicologie cellulaire et moléculaire, l'évaluation des risques, l'économie, les approches « omiques » et la chimiométrie.

En s'appuyant sur un consortium pluridisciplinaire constitué de laboratoires de recherche (INRA, AgroParisTech), des laboratoires nationaux de référence (ANSES, ONIRIS) et les trois principaux instituts techniques français spécialisés dans la production de viande (IFIP, ITAVI et IDELE), l'objectif de la tâche WP5 était de développer de nouvelles méthodes basées sur le profilage de marqueurs qui permettront de tracer l'exposition des animaux aux micropolluants.

Parmi les approches abordées, ce travail de thèse propose d'examiner tout particulièrement l'intérêt de la volatolomique qui consiste à déterminer dans des organes ou des fluides biologiques des composés organiques volatils (COVs) marqueurs dont l'abondance pourrait selon des travaux préliminaires, être significativement modulée par des affections ou des contaminations. Les COVs ont fait l'objet de nombreux travaux de recherche de marqueurs prometteurs pour diagnostiquer des pathologies et notamment des cancers [11-18]. Ces auteurs suggèrent qu'une exposition à haut risque, comme une exposition à des micropolluants, provoque un stress oxydatif au niveau cellulaire et induit l'activité de certaines enzymes de détoxification, ce qui conduit à modifier le volatolome des organes de détoxification comme le foie. Les travaux de Berge *et al*. (2011) confirment le potentiel informatif du volatolome hépatique pour révéler l'exposition d'animaux d'élevage aux contaminants environnementaux via leur alimentation, malgré l'absence des résidus de micropolluants dans l'organe [19].

Trois matrices biologiques sont ciblées pour rechercher des COVs marqueurs d'exposition. D'abord, le foie est l'organe de détoxification des substances toxiques, où celles-ci déclencheraient une modulation de la composition hépatique en COVs [20].

Ensuite, le plasma est le fluide de transfert qui transporte les métabolites volatils générés notamment par les organes de détoxification dans la circulation sanguine. Compte tenu de son caractère moins invasif, l'analyse de marqueurs volatils dans le sang a fait l'objet de plusieurs études métabolomiques [21] au cours des dernières années pour révéler des pathologies

[22,23], ou l'exposition aux micropolluants [9,24]. La recherche de marqueurs volatils dans le plasma pourrait ouvrir la voie à un diagnostic moins invasif et in vivo de l'exposition aux micropolluants chez l'animal et à terme chez l'homme.

Enfin, les tissus adipeux sont les tissus de stockage et d'accumulation des micropolluants durant la vie de l'animal. En effet, le suivi des composés volatils dont certains sont les produits finis du métabolisme des acides gras, pourrait révéler les changements volatolomiques générés par l'exposition aux micropolluants. Des études ultérieures ont utilisé les COVs dans les tissus adipeux pour souligner des différences de protocoles d'alimentation et de pratiques d'élevage chez les animaux [25,26]. Ainsi, l'identification des marqueurs volatils dans ces tissus permettrait de suivre la trace de l'exposition aux micropolluants dans les produits alimentaires.

Pour analyser ces composés volatils de faibles poids moléculaires dans ces tissus et fluides biologiques, la microextraction en phase solide (SPME) est aujourd'hui la méthode de choix [27]. Cette technique, conçue par Pawliszyn en 1989, est basée sur une pré-concentration des COVs sur une fibre sur laquelle ils viennent s'adsorber [28]. Cette méthode présente de nombreux avantages en termes de sensibilité, de rapidité, d'automatisation, de mise en œuvre, et de manipulation minimale des échantillons avant l'analyse [29]. Cependant, il n'existe pas de procédure universelle d'extraction par SPME adaptée à l'extraction des COVs dans toutes les matrices biologiques. Ceci souligne l'importance d'une étape d'optimisation des paramètres qui peuvent influencer l'efficacité d'extraction par SPME et qui doivent être déterminés selon la matrice et l'étude mise en œuvre [30].

Concernant l'analyse des données, les approches chimiométriques classiques ne permettent pas une exploitation complète des données acquises en métabolomique. Particulièrement, la stratégie qui consiste à utiliser une analyse de la variance pour sélectionner des métabolites intéressants avant de réaliser une Analyse en Composantes Principales (ACP) sur ces variables (parfois appelée ANOVA-ACP) a été largement utilisée. Cette méthode s'est avérée performante pour traiter les différences entre un groupe contrôle et un groupe distingué par une pathologie [15] ou une exposition à certains types de micropolluants [19]. Toutefois, elle ne permet pas d'étudier les interactions entre plusieurs groupes d'échantillons, notamment indispensables pour évaluer la spécificité des marqueurs mis en évidence. Un des grands défis actuel est de trouver de nouvelles approches rapides et performantes pour traiter les données omiques. La chimiométrie moderne, basée sur des outils d'analyses multivariées, a aidé au développement de nouvelles méthodes pertinentes. L'Analyse en Composantes Communes (ACC) est une variante de l'Analyse en Composantes Communes et Poids Spécifiques

(Common Components and Specific Weights Analysis, ComDim) conçue pour extraire des informations à partir d'une matrice unique en traitant chaque variable par un seul bloc [31]. Plusieurs études ont démontré la performance d'ACC pour traiter les données métabolomiques [31,32].

Dans ce contexte, une comparaison de la performance d'ACC par rapport aux méthodes exploratoires classiquement utilisées, l'Analyse en Composantes Principales (ACP) et l'Analyse en Composantes Indépendantes (ACI) s'avère nécessaire pour déterminer la méthode chimiométrique la plus appropriée à l'exploitation des données volatolomiques.

Pour répondre aux objectifs de ce travail de thèse qui porte sur le recherche de marqueurs volatils dans le foie, le plasma et les tissus adipeux pour tracer l'exposition d'animaux à différents types de micropolluants, le présent manuscrit fera l'objet de quatre chapitres.

Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique articulée en trois axes. Le premier axe expose les différentes familles de micropolluants susceptibles de contaminer la chaine de production de la viande, et justifie plus particulièrement le choix des micropolluants ciblés par ce travail de thèse. Le deuxième axe détaille l'intérêt des nouvelles approches omiques comme alternatives aux méthodes classiquement employées par les laboratoires nationaux de référence pour contrôler la contamination. Parmi ces approches, la volatolomique sera plus particulièrement développée. Le troisième axe expose les principaux verrous instrumentaux et chimiométriques à l'analyse des COVs dans les matrices biologiques.

Le deuxième chapitre a pour objectif de proposer des développements méthodologiques pour lever les verrous analytiques à l'analyse pertinente du volatolome des tissus animaux visés et une extraction de l'information utile des données. La première partie de ce chapitre est ainsi consacrée à l'adaptation des paramètres SPME proposés par Berge *et al*. (2011) [19] afin d'obtenir des extraits plus représentatifs tout en minimisant la variabilité analytique et en maximisant la sensibilité de l'extraction des COVs (article 1). La deuxième partie de ce chapitre porte sur le choix de stratégies de traitement des données volatolomiques à travers une comparaison de trois méthodes chimiométriques non-supervisées ; Analyse en Composantes Principales (ACP), Analyse en Composantes Indépendantes (ACI) et Analyse en Composantes Communes (CCA), dans le but de déterminer la méthode la plus performante pour une exploitation maximale des données volatolomiques (article 2).

En s'appuyant sur ces développements, le troisième chapitre présente les résultats de l'analyse du volatolome dans le foie des animaux exposés et non-exposés aux micropolluants par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse afin d'identifier des marqueurs volatils pour différents scénarios réalistes de contamination animale (article 3).

Enfin, le chapitre 4 dévoile les résultats de l'analyse prospective du volatolome dans le plasma et le tissu adipeux des mêmes animaux exposés ou non aux micropolluants (article 4). L'ensemble des résultats et des perspectives du travail seront discutés dans la section discussion générale.

REFERENCES

[1] Madalinski, G., Godat, E., Alves, S., Lesage, D., Genin, E., Levi, P., Labarre, J., Tabet, J.C., Ezan, E., Junot, C., Direct introduction of biological samples into a LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer as a tool for fast metabolome analysis. Anal. Chem. 2008, 80(9), 3291-3303.

[2] Eveillard, A., Lasserre, F., de Tayrac, M., Polizzi, A., Claus, S., Canlet, C., Mselli-Lakhal, L., Gotardi, G., Paris, A., Guillou, H., Martin, P.G.P., Pineau, T., Identification of potential mechanisms of toxicity after di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) adult exposure in the liver using a systems biology approach. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2009, 236(3), 282-292.

[3] Andree, S., Jira, W., Schwind, K.H., Wagner, H., Schwagele, F., Chemical safety of meat and meat products. Meat Sci. 2010, 86(1), 38-48.

[4] Engel, E., Ratel, J., Bouhlel, J., Planche, C., Meurillon, M., Novel approaches to improving the chemical safety of the meat chain towards toxicants. Meat Sci. 2015, 109, 75-85.

[5] Gaud Dervilly-Pinel, T.G., Brice Minvielle, Angélique Travel, Jérôme Normand,, Marie Bourin, E.R., Estelle Dubreil, Sophie Mompelat, Frédéric Hommet, Marina Nicolas,, Vincent Hort, C.I., Mailie Saint-Hilaire, Claude Chafey, Julien Parinet,, Ronan Cariou, P.M., Bruno Le Bizec, Eric Verdon, Erwan Engel, Micropollutants and chemical residues in organic and conventional meat. Food Chem. 2017, 232, 218-228.

[6] Focant, J.F., Dioxin food crises and new POPs: challenges in analysis. Anal. Bioanal. Chem. 2012, 403(10), 2797-2800.

[7] Bino, R.J., Hall, R.D., Fiehn, O., Kopka, J., Saito, K., Draper, J., Nikolau, B.J., Mendes, P., Roessner-Tunali, U., Beale, M.H., Trethewey, R.N., Lange, B.M., Wurtele, E.S., Sumner, L.W., Potential of metabolomics as a functional genomics tool. Trends Plant Sci. 2004, 9(9), 418-425.

[8] Benarbia, M.E., Macherel, D., Faure, S., Jacques C., Andriantsitohaina R., Malthiery Y., Plasmatic concentration of organochlorine lindane acts as metabolic disruptors in HepG2 liver cell line by inducing mitochondrial disorder. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2013, 272, 325-334.

[9] Lecureur, V., Arzel, M., Ameziane, S., Houlbert, N., Le Vee, M., Jouneau, S., Fardel, O., MAPK- and PKC/CREB-dependent induction of interleukin-11 by the environmental contaminant formaldehyde in human bronchial epithelial cells. Toxicology. 2012, 292(1), 13-22.

[10] Arora, D., Siddiqui, M.H., Sharma, P.K., Singh, S.P., Tripathi, A., Mandal, P., Singh, U.S., Singh, P.K., Shukla,Y., Evaluation and physiological correlation of plasma proteomic fingerprints for deltamethrin-induced hepatotoxicity in Wistar rats. Life Sci. 2016, 160, 72-83

[11] Liu, H.J., Wang, H., Li, C.X., Wang, L.C., Pan, Z.F., Wang, L.L., Investigation of volatile organic metabolites in lung cancer pleural effusions by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. J. Chromatogr. B 2014, 945, 53-59.

[12] Watkins, S.M., German, J.B., Toward the implementation of metabolomic assessments of human health and nutrition. Curr. Opin. Biotechnol. 2002, 13(5), 512-516.

[13] Michell, A.W., Mosedale, D., Grainger, D.J., Barker, R.A., Metabolomic analysis of urine and serum in Parkinson's disease. Metabolomics. 2008, 4(3), 191-201.

[14] Lokhov, P.G., Dashtiev, M.I., Moshkovskii, S.A., Archakov, A.I., Metabolite profiling of blood plasma of patients with prostate cancer. Metabolomics. 2010, 6(1), 156-163.

[15] Silva, C.L., Passos, M., Camara, J.S., Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry. Br. J. Cancer. 2011, 105(12), 1894-1904.

[16] Vuckovic, D., Pawliszyn, J., Systematic Evaluation of Solid-Phase Microextraction Coatings for Untargeted Metabolomic Profiling of Biological Fluids by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Anal. Chem. 2011, 83(6), 1944-1954.

[17] Abaffy, T., Moller, M.G., Riemer, D.D., Milikowski, C., DeFazio, R.A., Comparative analysis of volatile metabolomics signals from melanoma and benign skin: a pilot study. Metabolomics. 2013, 9(5), 998-1008.

[18] Hakim, M., Broza, Y.Y., Barash, O., Peled, N., Phillips, M., Amann, A., Haick, H., Volatile Organic Compounds of Lung Cancer and Possible Biochemical Pathways. Chem. Rev. 2012, 112(11), 5949-5966.

[19] Berge, P., Ratel, J., Fournier, A., Jondreville, C., Feidt, C., Roudaut, B., Le Bizec, B., Engel, E., Use of Volatile Compound Metabolic Signatures in Poultry Liver to Back-Trace Dietary Exposure to Rapidly Metabolized Xenobiotics. Environ. Sci. Technol. 2011, 45(15), 6584-6591.

[20] Phillips, M., Cataneo, R.N., Saunders, C., Hope, P., Schmitt, P., Wai, J., Volatile biomarkers in the breath of women with breast cancer. J. Breath Res. 2010, 4(2).

[21] Liu, Y.Z., Muralidhara, S., Bruckner, J.V., Bartlett, M.G., Optimization, validation and application of a method for the determination of trichloroethylene in rat plasma by headspace solid-phase microextraction gas chromatography mass spectrometry. Biomed. Chromatogr. 2008, 22(9), 977-984.

[22] Ikeda, A., Nishiumi, S., Shinohara, M., Yoshie, T., Hatano, N., Okuno, T., Bamba, T., Fukusaki, E., Takenawa, T., Azuma, T., Yoshida, M., Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for gastrointestinal cancer. Biomed. Chromatogr. 2012, 26(5), 548-558.

[23] Li, C., Xu, F., Xie, D.M., Jing, Y., Shang, M.Y., Liu, G.X., Wang, X., Cai, S.Q., Identification of Absorbed Constituents in the Rabbit Plasma and Cerebrospinal Fluid after Intranasal Administration of Asari Radix et Rhizoma by HS-SPME-GC-MS and HPLC-APCI-IT-TOF-MSn. Molecules. 2014, 19(4), 4857-4879.

[24] Zhou, S.N.S., Zhang, X., Ouyang, G., Es-Haghi, A., Pawliszyn, J., On-fiber standardization technique for solid-coated solid-phase microextraction. Anal. Chem. 2007, 79(3), 1221-1230.

[25] Sivadier, G., Ratel, J., Bouvier, F., Engel, E., Authentication of Meat Products: Determination of Animal Feeding by Parallel GC-MS Analysis of Three Adipose Tissues. J. Agric. Food Chem. 2008, 56(21), 9803-9812.

[26] Sivadier, G., Ratel, J., Engel, E., Persistence of pasture feeding volatile biomarkers in lamb fats. Food Chem. 2010, 118(2), 418-425.

[27] Giardina, M., Olesik, S.V., Application of low-temperature glassy carbon-coated macrofibers for solid-phase microextraction analysis of simulated breath volatiles. Anal. Chem. 2003, 75(7), 1604-1614.

[28] Song, G., Qin, T., Liu, H., Xu, G.B., Pan, Y.Y., Xiong, F.X., Gu, K.S., Sun, G.P., Chen, Z.D., Quantitative breath analysis of volatile organic compounds of lung cancer patients. Lung Cancer. 2010, 67(2), 227-231.

[29] Musteata, F.M., Pawliszyn, J., Bioanalytical applications of solid-phase microextraction. Trac-Trends Anal. Chem. 2007, 26(1), 36-45.

[30] Ouyang, G., Pawliszyn, J., A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction. Anal. Chim. Acta. 2008, 627(2), 184-197.

[31] Dubin, E., Spiteri, M., Dumas, A.S., Ginet, J., Lees, M., Rutledge, D.N., Common components and specific weights analysis: A tool for metabolomic data pre-processing. Chemometrics Intell. Lab. Syst. 2016, 150, 41-50.

[32] Martin, J.C., Maillot, M., Mazerolles, G., Verdu, A., Lyan, B., Migne, C., Defoort, C., Canlet, C., Junot, C., Guillou, C., Manach, C., Jabob, D., Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., Paris, E., Pujos-Guillot, E., Jourdan, F., Giacomoni, F., Courant, F., Fave, G., Le Gall, G., Chassaigne, H., Tabet, J.C., Martin, J.F., Antignac, J.P., Shintu, L., Defernez, M., Philo, M., Alexandre-Gouaubau, M.C., Amiot-Carlin, M.J., Bossis, M., Triba, M.N., Stojilkovic, N., Banzet, N., Molinie, R., Bott, R., Goulitquer, S., Caldarelli, S., Rutledge, D.N., Can we trust untargeted metabolomics? Results of the metabo-ring initiative, a large-scale, multi-instrument inter-laboratory study. Metabolomics. 2015, 11, 807-821.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Cette synthèse bibliographique a pour objectif de comprendre les différents aspects de l'application de la volatolomique à la recherche de marqueurs dans le foie, le plasma et le tissu adipeux afin de tracer l'exposition d'animaux à plusieurs types de micropolluants. La première section présente les principales familles de micropolluants étudiés dans le cadre du projet SOMEAT. Il s'agit de substances chimiques toxiques le plus souvent retrouvées dans les produits carnés et qui de ce fait pourraient représenter un danger pour la santé humaine. La deuxième section présente l'intérêt des méthodes omiques pour tracer les contaminations des chaines alimentaires et détaille tout particulièrement l'approche volatolomique pour la recherche de marqueurs d'exposition d'animaux à des micropolluants. La troisième section introduit et discute les principaux verrous analytiques actuels à l'analyse du volatolome et au traitement de ses données.

I. Micropolluants

Engel *et al*. (2015) [1] détaillent les différentes classes de micropolluants à risque dans une review intitulée «Novel approaches to improving the chemical safety of the meat chain towards toxicants » et publiée dans le journal '*Meat Science'*.

I.1. Principales familles de micopolluants dans la chaine de production de viande

Meat Science 109 (2015) 75–85

Contents lists available at ScienceDirect

Meat Science

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

ELSEVIER

Novel approaches to improving the chemical safety of the meat chain towards toxicants

E. Engel *, J. Ratel, J. Bouhlel, C. Planche, M. Meurillon

INRA UR370 QuaPA, MASS Group, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

1. Introduction

An aging population and constant progress in medical diagnosis contribute to the increasing prevalence of age-related pathologies such as cancer and neurodegenerative diseases. Several recent scientific studies suggest that diet, and especially proteinaceous food, plays a major role in their occurrence by exposing the consumer to various toxic contaminants present in food products. In meat, these chemical risks are mainly related to two different kinds of food toxicants, namely micropollutants and process-induced toxicants. Micropollutants are generated by human activity, or may come from veterinary or plant treatments. They are then trapped in living tissues during the production of animal raw materials and may eventually be transferred to food products. Process-induced toxicants are formed during food processing such as heating or smoking.

Although they are generally found at trace levels in meat, these micropollutants and process-induced toxicants may endanger human health through repeated exposure during a consumer's lifetime. To address this chemical risk, we therefore need to develop novel and efficient approaches to monitor their presence, limit their occurrence in food and refine risk assessment for consumers' health. After a brief overview of the main contaminants monitored in meat products by health authorities, the present paper addresses these three issues.

* Corresponding author.
E-mail address: erwan.engel@clermont.inra.fr (E. Engel).

2. Toxic contaminants in meat products

2.1. Micropollutants

Micropollutants, whether their origin is the environment or veterinary/phytosanitary practice, can contaminate meat products. The risks arising from their presence in the diet are regularly evaluated by large-scale exposure studies conducted by health authorities (ANSES, 2011a).

Micropollutants belong to several different families (Fig. 1).

Mycotoxins are metabolites produced by molds. They are carcinogenic, immunosuppressive, hepatotoxic or neurotoxic in both animals and humans. Human exposure to mycotoxins occurs directly through intake of contaminated agricultural products (cereals, corn, fruits, *etc.*) or indirectly through the consumption of animal-derived products contaminated by the feed given to the animals or during the maturation process of meat (Capriotti et al., 2012; FDA, 2008; Marroquín-Cardona, Johnson, Phillips, & Hayes, 2014). In 1985, the Food and Agriculture Organization of the United Nations estimated at 25% the proportion of cereal crops contaminated by mycotoxins in the world, thus reducing the global food supply. This contamination also raises the question of livestock contamination *via* diet or during maturation, and subsequent human contamination *via* the consumption of animal-derived foods. The carry-over of several mycotoxins into animal-derived products is closely monitored and seems greatest for blood, liver and kidney, and less problematic for muscle, milk and eggs (Kan & Meijer, 2007). Specific maximum limits for mycotoxins in food are given in several regulations (European Commission, 2006; FDA, 2011).

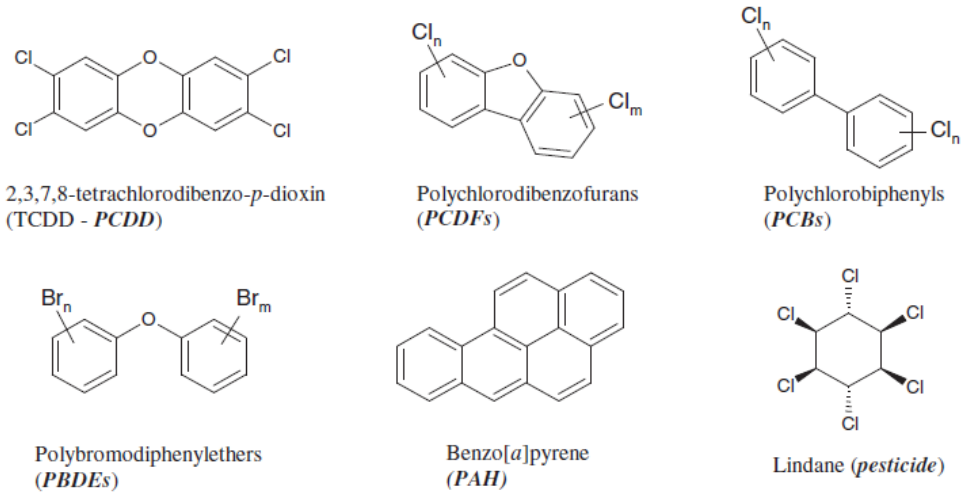


Fig. 1. Examples of environmental micropollutants found in proteinaceous products.

http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.05.016
0309-1740/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Heavy metals such as cadmium, lead, arsenic, and mercury are environmental contaminants likely to cause health problems when present in the diet. Heavy metals enter the human body mainly through ingestion of water and food and much attention has been recently focused on the concentrations of heavy metals in fish and other foods in order to check for those hazardous to human health (Demirezen & Uruç, 2006). Today their amounts in the diet are tightly controlled by strict standards (European Commission, 2006). Cadmium, lead and mercury are monitored in livestock, but it is relatively easy to reduce their amount in feed by avoiding the use of certain contaminated feedstuffs. Muscle is not likely to show high levels of heavy metals when animals are exposed *via* diet, whereas liver and kidney often show a clear dose–response related increase in heavy metal concentration after dietary exposure (Kan & Meijer, 2007). However, their levels in animal products are often tested on a survey basis, and contamination of meat products with high levels of heavy metals seldom occurs, if ever (Kan & Meijer, 2007).

Another family of environmental micropollutants that is closely monitored by health authorities are the dioxins and dioxin-like products (AFSSA, 2005; World Health Organization (WHO), 2002), mainly produced by industrial processes although they can have natural origins (*e.g.* forest fires). These dioxins are undesirable by-products of many manufacturing processes, and are persistent organic pollutants, being very resistant to chemical and biological degradation processes (Larsen, 2006). They fall into three groups: PCDDs (polychlorodibenzo-*para*-dioxins), PCDFs (polychlorodibenzofurans) and PCBs (polychlorobiphenyls). Only ten PCDDs and seven PCDFs are toxic. The most problematic one is TCDD, or Seveso dioxin, which is ten times more toxic than the other dioxins and dioxin-like compounds, and the only one considered as carcinogenic. Certain dioxin-like PCBs have similar toxic properties, 12 of them inducing the same cascades of cellular events as dioxins (Lauby-Secretan et al., 2013). These dioxins and dioxin-like compounds come from chemical reactions produced during combustion in the presence of oxygen and organochloride products. Although human exposure to dioxins from the environment has declined significantly, the monitoring of these toxicants required by health authorities is justified because food is currently the primary source of human exposure to dioxins (Charnley & Doull, 2005). Biomagnification occurs through the food chain, and high tissue concentrations can often occur in top predator species (Van den Berg et al., 2006), in particular in fatty tissues of animals (Larsen, 2006).

Brominated flame retardants (BFRs) are mixtures of chemical compounds added to a broad variety of products to make them less flammable. They are widely used for plastics, textiles, electric and electronic equipment and also for materials used to build livestock buildings. They belong to five classes: polybromodiphenylethers (PBDEs), hexabromocyclododecane (HBCD), tetrabromobisphenol A (TBBPA) and other phenols, polybromobiphenyls (PBBs) and the other brominated flame retardants. Their use in European Union is forbidden or restricted, but concerns remain worldwide about their risks for public health because of their persistence in the environment (AFSSA, 2005; ANSES, 2011a; US EPA, 2010). Materials treated with BFRs and used for livestock buildings will release BFRs that contaminate animals' tissues and can eventually be transferred to meat products. As an example, HBCD, a suspected potent endocrine disruptor, was withdrawn from the European market in 2011 and is now closely monitored by ANSES (2012) in animal-derived food products, particularly meat products.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) can be either of environmental origin or generated during the processing of foods (this origin will be discussed in Section 2.2.) and are also closely monitored by sanitary agencies (Schroeder, 2010). Concerning the environmental origin, the primary natural sources of airborne PAHs are forest fires and volcanoes. Their anthropogenic sources include residential burning of wood, oil, gas and charcoal, together with industrial power generation, incineration, and the production of several metals. These sources account for some 80% of total annual PAH emissions, to which must be added emission from the vehicle exhausts of gasoline and diesel-powered engines (EFSA, 2008). The main source of human exposure, for non-smoking individuals, is food consumption, as these PAHs build up in plants, thereby contaminating crops and feeds for livestock. Among PAHs, benzo[*a*]pyrene (BaP) is the most toxic due to its ability to form DNA adducts that can induce mutagenic and carcinogenic effects (IARC, 2010a). It was therefore long used as the sole marker of PAH presence (Srogi, 2007). The European Union established maximum levels of BaP for different food categories (European Commission, 2011) with a maximum level of BaP set at 2 µg/kg for smoked meat. However, it was recently shown that this was insufficient, and that it is necessary also to consider the sum of benzo[*a*]pyrene, benz[*a*]anthracene, benzo[*b*]fluoranthene and chrysene (European Commission, 2011).

Antibiotics given to animals are strictly regulated (FDA, 2005), and their absence in meat products is monitored at different steps in the production chain. It is noteworthy that in the case of feed for livestock, antibiotics are considered as additives, although stricter rules could be applied to them, such as those for antibiotics in humans. However, the only antibiotics allowed as feed additives are coccidiostatics and histomonostats (European Commission, 2003) because other antibiotics, especially if also used in human medicine, could induce antimicrobial resistance in humans (Chattopadhyay, 2014). Even so, the use of

coccidiostatics in animals' diet is monitored (Commission of the European Communities, 2008) to avert human contamination by consumption of meat from treated animals.

Pesticide residues used for phytosanitary treatments could be also problematic for meat products due to animal consumption of treated plants. In response to the build-up of such residues, the use of pesticides has been strongly reduced, and is now strictly regulated (FDA, 2012). This monitoring is, however, less critical for animal products than for plant products as demonstrated in the last total diet study performed by ANSES (2011a).

2.2. Process-induced food toxicants

Process-induced food toxicants can also be toxic at low doses and so present a risk for human health. Although some of them play a role in the sensorial qualities of processed food, other more harmful ones can be carcinogenic, mutagenic or neurotoxic. The process-induced toxicants are generated during food transformation steps such as cooking or fermentation, during digestion or by reaction with food packaging, and the formation of heat-induced toxicants has drawn much interest (Skog & Alexander, 2006). Meat products are one of the main routes of exposure to these process-induced toxicants by the generation of possibly carcinogenic compounds such as heterocyclic aromatic amines, polycyclic aromatic hydrocarbons like benzo[*a*]pyrene, and *N*-nitrosamines (Fig. 2).

Heterocyclic aromatic amines (HAAs) were discovered some 30 years ago and comprise more than 20 compounds (Skog, Johansson, & Jägerstad, 1998; Sugimura, Wakabayashi, Nakagama, & Nagao, 2004; Turesky et al., 2007) classified into two distinct families, the aminoimidazoazaarenes and the carbolines or pyrolytic HAAs. The first are formed by a Maillard reaction between certain free amino acids, creati(ni)ne and sugars at common cooking temperature (150–200 °C) (Skog et al., 1998). The second are induced by radical reactions occurring at pyrolytic temperatures (generally above 250 °C) (Murkovic, 2004). The main source of human exposure is *via* cooked meat (Skog & Solyakov, 2002), but the level of HAAs really depends on the kind of meat and cooking preference (Borgen, Solyakov, & Skog, 2001; Skog, Solyakov, & Jägerstad, 2000). Eight of the known HAAs are classified as probably (2A) or potentially (2B) carcinogenic to humans by the International Agency for Research on Cancer (IARC) studies (IARC, 1993).

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): their main source of exposure by processed food is *via* smoked proteinaceous products, but they are also present in grilled meat (Alomirah et al., 2011; Chen & Lin, 1997; Kazerouni, Sinha, Hsu, Greenberg, & Rothman, 2001; Roseiro, Gomes, & Santos, 2011; Kao, Chen, Huang, Chen, & Chen, 2014) as they can also be formed by pyrolysis of organic materials, direct contact of fat with a flame or incomplete combustion of charcoal. More than 30 PAHs have been identified; among them 13 are genotoxic (Audebert, Zeman, Beaudoin, Pery, & Cravedi, 2012; Audebert et al., 2010) or carcinogenic (EFSA, 2008; IARC, 2010b) and they are most probably neurotoxic (Crépeaux et al., 2013; Schroeder, 2010). It should be emphasized that processing procedures, such as smoking, drying, and cooking of food are commonly thought to be the main sources of contamination by PAHs (Scientific Committee on Food, 2002).

N-nitroso compounds (National Toxicology Program — Department of Health and Human Services, 2014) in diet mainly come from cured meat products (Bartsch & Montesano, 1984; Fiddler, 1975; Rywotycki, 2007), but as heat-processed toxicants, they can be formed by nitrosation of proline during the frying of pork meat (Walker, 1990). It is also important to note that they can be formed *in vivo* by simultaneous ingestion of nitrite or nitrogen oxides and a nitrosable substrate such as a secondary amine (Wogan & Tannenbaum, 1975). Some of the known nitrosamines are classified by IARC (1998) as probably (2A) or potentially (2B) carcinogenic to humans.

Except for exceptional, most often accidental cases of food poisoning by massive doses, the chemical risk associated with these contaminants — micropollutants and process-induced toxicants — stems from chronic exposure of consumers. These toxic contaminants are suspected to be implicated in the development of several cancers, such as colorectal cancer and breast cancer, and other pathologies such as degenerative diseases related to their neurotoxic properties. As they occur at trace levels in the diet and are consumed in complex mixtures throughout the life of an individual, there is a need to assess the risk they present for human health (Crépet et al., 2013; Nawaz et al., 2014; Shaw, 2014).

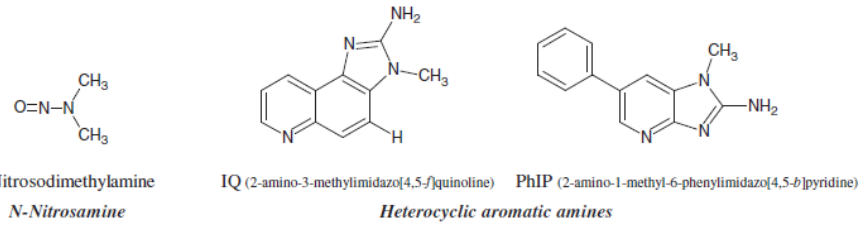


Fig. 2. Examples of process-induced toxicants found in meat products.

References

Abdulkarim, B. G., & Smith, J. S. (1998). Heterocyclic amines in fresh and processed meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46*, 4680–4687.

Afonso, C., Costa, S., Cardoso, C., Bandarra, N. M., Batista, I., Coelho, I., Castanheira, I., & Nunes, M. L. (2015). Evaluation of the risk/benefit associated to the consumption of raw and cooked farmed meagre based on the bioaccessibility of selenium, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, total mercury, and methylmercury determined by an *in vitro* digestion model. *Food Chemistry, 170*, 249–256.

AFSSA (2005). *Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation de l'exposition de la population française aux dioxines, furanes et PCB de type dioxine*. AFSSA, Saisine no. 2005-SA-0372.

Alaejos, M. S., & Afonso, A. M. (2011). Factors that affect the content of heterocyclic aromatic amines in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 10*(2), 52–108.

Alomirah, H., Al-Zenki, S., Al-Hooti, S., Zaghloul, S., Sawaya, W., Ahmed, N., & Kannan, K. (2011). Concentrations and dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from grilled and smoked foods. *Food Control, 22*(12), 2028–2035.

Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Charbonnier, L., Mesnil, A., Rainbow, P. S., & Wang, W. X. (2008). Bioaccessibility of essential and non-essential metals in commercial shellfish from Western Europe and Asia. *Food and Chemical Toxicology, 46*(6), 2010–2022.

Andree, S., Jira, W., Schwind, K. H., Wagner, H., & Schwagele, F. (2010). Chemical safety of meat and meat products. *Meat Science, 86*(1), 38–48.

ANSES (2011a). *Etude de l'alimentation totale française 2 (EAT 2)*. Avis de l'ANSES, rapport d'expertise.

ANSES (2011b). *Nutrition et cancer - Légitimité de recommandations nutritionnelles dans le cadre de la prévention des cancers.*

ANSES (2012). *Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif aux analyses de retardateurs de flamme bromés (RFB) à mettre en œuvre dans le cadre des prochains plans de surveillance*. Avis de l'Anses - Saisine no. 2010-SA-0225.

Audebert, M., Riu, A., Jacques, C., Hillenweck, A., Jamin, E. L., Zalko, D., & Cravedi, J. P. (2010). Use of the gammaH2AX assay for assessing the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell lines. *Toxicology Letters, 199*(2), 182–192.

Audebert, M., Zeman, F., Beaudoin, R., Pery, A., & Cravedi, J. P. (2012). Comparative potency approach based on H2AX assay for estimating the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology, 260*(1), 58–64.

Augustsson, K., Skog, K., Jägerstad, M., & Steineck, G. (1997). Assessment of the human exposure to heterocyclic amines. *Carcinogenesis, 18*(10), 1931–1935.

Balogh, Z., Gray, J. I., Gomaa, E. A., & Booren, A. M. (2000). Formation and inhibition of heterocyclic aromatic amines in fried ground beef patties. *Food and Chemical Toxicology, 38*, 395–401.

Bartsch, H., & Montesano, R. (1984). Relevance of nitrosamines to human cancer. *Carcinogenesis, 5*(11), 1381–1393.

Berge, P., Ratel, J., Fournier, A., Jondreville, C., Feidt, C., Roudaut, B., Le Bizec, B., & Engel, E. (2011). Use of volatile compound metabolic signatures in poultry liver to back-race dietary exposure to rapidly metabolized xenobiotics. *Environmental Science and Technology, 45*(15), 6584–6591.

Bichler, J., Cavin, C., Simic, T., Chakraborty, A., Ferk, F., Hoelzl, C., Schulte-Hermann, R., Kundi, M., Haidinger, G., Angelis, K., & Knasmüller, S. (2007). Coffee consumption protects human lymphocytes against oxidative and 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole acetate (Trp-P-2) induced DNA-damage: Results of an experimental study with human volunteers. *Food and Chemical Toxicology, 45*, 1428–1436.

Borgen, E., Solyakov, A., & Skog, K. (2001). Effect of precursor composition and water on the formation of heterocyclic amines in meat model systems. *Food Chemistry, 74*, 11–19.

Broza, Y. Y., & Haick, H. (2013). Nanomaterial-based sensors for detection of disease by volatile organic compounds. *Nanomedicine, 8*(5), 785–806.

Capriotti, A. L., Caruso, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Samperi, R., & Laganà, A. (2012). Multiclass mycotoxin analysis in food, environmental and biological matrices with chromatography/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews, 31*(4), 466–503.

Cardoso, C., Afonso, C., Lourenço, H., Costa, S., & Nunes, M. L. (2015). Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk–benefit evaluation of food. *Trends in Food Science & Technology, 41*, 5–23.

Charnley, G., & Doull, J. (2005). Human exposure to dioxins from food, 1999–2002. *Food and Chemical Toxicology, 43*, 671–679.

Chattopadhyay, M. K. (2014). Use of antibiotics as feed additives: A burning question. *Frontiers in Microbiology, 5*(334), 1–3.

Chen, B. H., & Lin, Y. S. (1997). Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons during processing of duck meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45*, 1394–1403.

Commission of the European Communities (2008). *Report from the Commission to the Council and the European parliament on the use of coccidiostatics and histomonostats as feed additives. Vol. 233*, (Brussels).

Crépeaux, G., Bouillaud-Kremarik, P., Sikhayeva, N., Rychen, G., Soulimani, R., & Schroeder, H. (2013). Exclusive prenatal exposure to a 16 PAH mixture does not impact anxiety-related behaviours and regional brain metabolism in adult male rats: A role for the period of exposure in the modulation of PAH neurotoxicity. *Toxicology Letters, 221*(1), 40–46.

Crépet, A., Héraud, F., Béchaux, C., Gouze, M. E., Pierlot, S., Fastier, A., Leblanc, J. C., Le Hégarat, L., Takakura, N., Fessard, V., Tressou, J., Maximilien, R., de Sousa, G., Nawaz, A., Zucchini-Pascal, N., Rahmani, R., Audebert, M., Graillot, V., & Cravedi, J. P. (2013). The PERICLES research program: An integrated approach to characterize the combined effects of mixtures of pesticide residues to which the French population is exposed. *Toxicology, 313*, 83–93.

Dean, J. R., & Ma, R. (2007). Approaches to assess the oral bioaccessibility of persistent organic pollutants: A critical review. *Chemosphere, 68*, 1399–1407.

Demirezen, D., & Uruç, K. (2006). Comparative study of trace elements in certain fish, meat and meat products. *Meat Science, 74*(2), 255–260.

Dervilly-Pinel, G., Weigel, S., Lommen, A., Chereau, S., Rambaud, L., Essers, M., Antignac, J.-P., Nielen, M. W. F., & Le Bizec, B. (2011). Assessment of two complementary liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry metabolomics strategies for the screening of anabolic steroid treatment in calves. *Analytica Chimica Acta, 700*(1–2), 144–154.

Domingo, J. L. (2012). Polybrominated diphenyl ethers in food and human dietary exposure: A review of the recent scientific literature. *Food and*

http://refhub.elsevier.com/S0309-1740(15)30012-7/rf0150

EFSA (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food — Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *EFSA Journal, 724*, 1–114.

Engel, E., Ratel, J., Blinet, P., Chin, S. T., Rose, G., & Marriott, P. J. (2013). Benchmarking of candidate detectors for multiresidue analysis of pesticides by comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A, 1311*, 140–148.

European Commission (2003). Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official Journal of the European Union, L268*, 29–43.

European Commission (2006). Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union, L364*, 1–26.

European Commission (2011). Commission Regulation (EU) No. 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. *Official Journal of the European Union, 215*, 4–8.

FDA (2005). Illegal residues in meat, poultry, seafood, and other animal derived foods. *Chapter: Post-approval monitoring of animal drugs, feeds and devices*. FDA (Vol. Compliance program guidance manual).

FDA (2008). Mycotoxins in domestic and imported food. *Chapter 07 — Molecular biology and natural toxins*. FDA (Vol. Compliance program guidance manual).

FDA (2011). FDA regulatory guidance for mycotoxins, a guide for grain elevators, feed manufacturers, grain processors and exporters. In N.G.a.F. Association (Ed.), FDA (Vol. Compliance program guidance manual).

FDA (2012). Pesticide monitoring program, fiscal year 2012. *Pesticide Report* (pp. 1–48). FDA.

Felton, J. S., Knize, M. G., Roper, M., Fultz, E., Shen, N. H., & Turteltaub, K. W. (1992). Chemical analysis, prevention, and low-level dosimetry of heterocyclic amines from cooked food. *Cancer Research, 52*, 2103s–2107s.

Fiddler, W. (1975). The occurrence and determination of *N*-nitroso compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology, 31*, 352–360.

Focant (2014). Keeping tabs on dioxins. *The Analytical Scientist, 15*, 34–40.

Funk, C., Weber, P., Thilker, J., Grabber, J. H., Steinhart, H., & Bunzel, M. (2006). Influence of lignification and feruloylation of maize cell walls on the adsorption of heterocyclic aromatic amines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54*(5), 1860–1867.

Gao, S., & Wang, W. X. (2014). Oral bioaccessibility of toxic metals in contaminated oysters and relationships with metal internal sequestration. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 110*, 261–268.

Garnett, M. J., Edelman, E. J., Heidorn, S. J., Greenman, C. D., Dastur, A., Lau, K. W., Greninger, P., Thompson, I. R., Luo, X., Soares, J., Liu, Q., Iorio, F., Surdez, D., Chen, L., Milano, R. J., Bignell, G. R., Tam, A. T., Davies, H., Stevenson, J. A., Barthorpe, S., Lutz, S. R., Kogera, F., Lawrence, K., McLaren-Douglas, A., Mitropoulos, X., Mironenko, T., Thi, H., Richardson, L., Zhou, W., Jewitt, F., Zhang, T., O'Brien, P., Boisvert, J. L., Price, S., Hur, W., Yang, W., Deng, X., Butler, A., Choi, H. G., Chang, J. W., Baselga, J., Stamenkovic, I., Engelman, J. A., Sharma, S. V., Delattre, O., Saez-Rodriguez, J., Gray, N. S., Settleman, J., Futreal, P. A., Haber, D. A., Stratton, M. R., Ramaswamy, S., McDermott, U., & Benes, C. H. (2012). Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. *Nature, 483*(7391), 570–575.

Giri, A., Khummueng, W., Mercier, F., Kondjoyan, N., Tournayre, P., Meurillon, M., et al. (2015). Relevance of two-dimensional gas chromatography and high resolution olfactometry for the parallel determination of heat-induced toxicants and odorants in cooked food. *Journal of Chromatography A, 1388*, 217–226.

Goscinny, S., Vandevijvere, S., Maleki, M., Overmeire, I. V., Windal, I., Hanot, V., Blaude, M.-N., Vleminckx, C., & Loco, J. V. (2011). Dietary intake of hexabromocyclododecane diastereoisomers (α-, β-, and γ-HBCD) in the Belgian adult population. *Chemosphere, 84*(3), 279–288.

Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology, 30*(11), 591–600.

Hakim, M., Broza, Y. Y., Barash, O., Peled, N., Phillips, M., Amann, A., & Haick, H. (2012). Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways. *Chemical Reviews, 112*(11), 5949–5966.

Hoogenboom, R., Traag, W., Fernandes, A., & Rose, M. (2015). European developments following incidents with dioxins and PCBs in the food and feed chain. *Food Control, 50*, 670–683.

Houlbrèque, F., Hervé-Fernández, P., Teyssié, J. L., Oberhaënsli, F., Boisson, F., & Jeffree, R. (2011). Cooking makes cadmium contained in Chilean mussels less bioaccessible to humans. *Food Chemistry, 126*(3), 917–921.

IARC (1993). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 56*.

IARC (1998). Some *N*-nitroso compou

http://refhub.elsevier.com/S0309-1740(15)30012-7/rf0260

Carcinogenic Risks to Humans, 17.

IARC (2010a). Benzo[a]pyrene. *IARC Monographs, 100F*, 111–144.

IARC (2010b). Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 92*.

Kan, C. A., & Meijer, G. A. L. (2007). The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Animal Feed Science and Technology, 133*, 84–108.

Kazerouni, N., Sinha, R., Hsu, C.-H., Greenberg, A., & Rothman, N. (2001). Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food and Chemical Toxicology, 39*, 423–436.

Kim, Y., & Je, Y. (2014). Dietary fiber intake and total mortality: A meta-analysis of prospective cohort studies. *American Journal of Epidemiology, 180*(6), 565–576.

Kao, T. H., Chen, S., Huang, C. W., Chen, C. J., & Chen, B. H. (2014). Occurrence and [illegible] hydrocarbons in kindling-free-charcoal grilled meat products in Taiwan. *Food and Chemical Toxicology, 71*, 149–158.

Kulp, K. S., Fortson, S. L., Knize, M. G., & Felton, J. S. (2003). An *in vitro* model system to predict the bioaccessibility of heterocyclic amines from a cooked meat matrix. *Food and Chemical Toxicology, 41*(12), 1701–1710.

L'Homme, B., Scholl, G., Eppe, G., & Focant, J. F. (2015). Validation of a gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry method for confirmatory analysis of dioxins and dioxin-like polychlorobiphenyls in feed following new EU Regulation 709/2014. *Journal of Chromatography A, 1376*, 149–158.

Larsen, J. C. (2006). Risk assessments of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in food. *Molecular Nutrition and Food Research, 50*, 885–896.

Lauby-Secretan, B., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., & Straif, K. on behalf of the International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group IARC. (2013). Carcinogenicity of polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls. *The Lancet Oncology, 14*, 287–288.

Lewandowska, A., Przychodzen, W., Kusznierewicz, B., Kołodziejski, D., Namiesnik, J., & Bartoszek, A. (2014). Isothiocyanates may chemically detoxify mutagenic amines formed in heat processed meat. *Food Chemistry, 157*, 105–110.

Lin, J., Forman, M. R., Wang, J., Grossman, H. B., Chen, M., Dinney, C. P., Hawk, E. T., & Wu, X. (2012). Intake of red meat and heterocyclic amines, metabolic pathway genes and bladder cancer risk. *International Journal of Cancer, 131*(8), 1892–1903.

López-Barea, J., & Gómez-Ariza, J. L. (2006). Environmental proteomics and metallomics. *Proteomics, 6*(S1), S51–S62.

Marroquín-Cardona, A. G., Johnson, N. M., Phillips, T. D., & Hayes, A. W. (2014). Mycotoxins in a changing global environment — A review. *Food and Chemical Toxicology, 69*, 220–230.

Mateo, R., Baos, A. R., Vidal, D., Camarero, P. R., Martinez-Haro, M., & Taggart, M. A. (2011). Bioaccessibility of Pb from ammunition in game meat is affected by cooking treatment. *PloS One, 6*(1), e15892.

Maulvault, A. L., Machado, R., Afonso, C., Lourenço, H. M., Nunes, M. L., Coelho, I., Langerholc, T., & Marques, A. (2011). Bioaccessibility of Hg, Cd and As in cooked black scabbard fish and edible crab. *Food and Chemical Toxicology, 49*, 2808–2815.

Melo, A., Viegas, O., Petisca, C., Pinho, O., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2008). Effect of beer/red wine marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines in pan-fried beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56*(22), 10625–10632.

Metian, M., Charbonnier, L., Oberhaënsli, F., Bustamante, P., Jeffree, R., Amiard, J. C., & Warnau, M. (2009). Assessment of metal, metalloid, and radionuclide bioaccessibility from mussels to human consumers, using centrifugation and simulated digestion methods coupled with radiotracer techniques. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 72*(5), 1499–1502.

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Menard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W., & Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food — An international consensus. *Food and Function, 5*, 1113–1124.

Mondello, L., Tranchida, P. Q., Dugo, P., & Dugo, G. (2008). Comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry: A review. *Mass Spectrometry Reviews, 27*, 101–124.

Murkovic, M. (2004). Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems. *Journal of Chromatography B, 802*(1), 3–10.

National Toxicology Program — Department of Health and Human Services (2014). N-Nitrosamines: 15 listings. *Report on Carcinogens* (pp. 1–23) (13th ed.).

Nawaz, A., Razpotnik, A., Rouimi, P., de Sousa, G., Cravedi, J.-P., & Rahmani, R. (2014). Cellular impact of combinations of endosulfan, atrazine, and chlorpyrifos on human primary hepatocytes and HepaRG cells after short and chronic exposures. *Cell Biology and Toxicology, 30*, 17–29.

Nicholson, J. K., & Lindon, J. C. (2008). Systems biology: Metabonomics. *Nature, 455*(7216), 1054–1056.

O'Kane, A. A., Chevallier, O. P., Graham, S. F., Elliott, C. T., & Mooney, M. H. (2013). Metabolomic profiling of *in vivo* plasma responses to dioxin-associated dietary contaminant exposure in rats: Implications for identification of sources of animal and human exposure. *Environmental Science and Technology, 47*(10), 5409–5418.

Olsson, V., Solyakov, A., Skog, K., Lundstrom, K., & Jägerstad, M. (2002). Natural variations of precursors in pig meat affect the yield of heterocyclic amines — Effects of RN genotype, feeding regime, and sex. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*, 2962–2969.

Pais, P., Salmon, C. P., Knize, M. G., & Felton, J. S. (1999). Formation of mutagenic/carcino[illegible]cyclic amines in dry-heated model systems, meats, and meat drippings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47*, 1098–1108.

Persson, E., Oroszvári, B. K., Tornberg, E., Sjöholm, I., & Skog, K. (2008). Heterocyclic amine formation during frying of frozen beefburgers. *International Journal of Food Science and Technology, 43*sc(1), 62–68.

Planche, C., Ratel, J., Mercier, F., Blinet, P., Debrauwer, L., & Engel, E. (2015). Assessment of comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass

spectrometry based methods for investigating 206 dioxin-like micropollutants in animal-derived food matrices. *Journal of Chromatography A, 1392*, 74–81.
Roseiro, L. C., Gomes, A., & Santos, C. (2011). Influence of processing in the prevalence of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Portuguese traditional meat product. *Food and Chemical Toxicology, 49*(6), 1340–1345.
Rywotycki, R. (2007). The effect of baking of various kinds of raw meat from different animal species and meat with functional additives on nitrosamine contamination level. *Food Chemistry, 101*(2), 540–548.
Schroeder, H. (2010). Neurotoxicité et maladies neurodégénératives: risques pour les travailleurs et en population générale en relation avec l'exposition aux substances chimiques - Les hydrocarbures aromatiques polycycliques présentent-ils un risque de neurotoxicité développementale ? *Anses - Bulletin de veille scientifique - Santé/Environnement/Travail*, 83–88.
Schwab, C. E., Huber, W. W., Parzefall, W., Hietsch, G., Kassie, F., Schulte-Hermann, R., & Knasmüller, S. (2000). Search for compounds that inhibit the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Critical Reviews in Toxicology, 30*(1), 1–69.
Scientific Committee on Food (2002). *Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons in food*. Brussels: European Commission.
Shaw, I. C. (2014). Chemical residues, food additives and natural toxicants in food — The cocktail effect. *International Journal of Food Science and Technology, 49*, 2149–2157.
Shim, S. M., Ferruzzi, M. G., Kim, Y. C., Janle, E. M., & Santerre, C. R. (2009). Impact of phytochemical-rich foods on bioaccessibility of mercury from fish. *Food Chemistry, 112*(1), 46–50.
Shin, H. -S., Strasburg, G. M., & Gray, J. I. (2002). A model system study of the inhibition of heterocyclic aromatic amine formation by organosulfur compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*, 7684–7690.
Sindelar, J. J., & Milkowski, A. L. (2012). Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. *Nitric Oxide, 26*, 259–266.
Sinha, R., Chow, W. H., Kulldorff, M., Denobile, J., Butler, J., Garcia-Closas, M., Weil, R., Hoover, R. N., & Rothman, N. (1999). Well-done, grilled red meat increases the risk of colorectal adenomas. *Cancer Research, 59*, 4320–4324.
Skog, K., & Alexander, J. (2006). *Acrylamide and other hazardous compounds in heat-treated foods*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.
Skog, K., Johansson, M., & Jägerstad, M. (1998). Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: A review on formation, occurrence and intake. *Food and Chemical Toxicology, 36*, 879–896.
Skog, K., & Solyakov, A. (2002). Heterocyclic amines in poultry products: A literature review. *Food and Chemical Toxicology, 40*, 1213–1221.
Skog, K., Solyakov, A., & Jägerstad, M. (2000). Effects of heating conditions and additives on the formation of heterocyclic amines with reference to amino-carbolines in a meat juice model system. *Food Chemistry, 68*, 299–308.
Srogi, K. (2007). Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. *Environmental Chemistry Letters, 5*(4), 169–195.
Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nakagama, H., & Nagao, M. (2004). Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Science, 95*(4), 290–299.
Torres-Escribano, S., Denis, S., Blanquet-Diot, S., Calatayud, M., Barrios, L., Velez, D., Alric, M., & Montoro, R. (2011). Comparison of a static and a dynamic *in vitro* model to estimate the bioaccessibility of As, Cd, Pb and Hg from food reference materials *Fucus* sp. (IAEA-140/TM) and lobster hepatopancreas (TORT-2). *The Science of the Total Environment, 409*, 604–611.
Turesky, R. J., Goodenough, A. K., Ni, W., McNaughton, L., LeMaster, D. M., Holland, R. D., Wu, R. W., & Felton, J. S. (2007). Identification of 2-amino-1,7-dimethylimidazo[4,5-g]quinoxaline: An abundant mutagenic heterocyclic aromatic amine formed in cooked beef. *Chemical Research in Toxicology, 20*, 520–530.
US EPA (2010). In National Center for Environmental Assessment (Ed.), *An exposure assessment of polybrominated diphenyl ethers* (pp. 1–378). Washington DC: EPA (Vol. EPA/600/R-08/086F).
Van den Berg, M., Bimbaum, L. S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., Rose, M., Safe, S., Schrenk, D., Tohyama, C., Tritscher, A., Tuomisto, J., Tysklind, M., Walker, N., & Peterson, R. E. (2006). The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicological Sciences, 93*(2), 223–241.
van Leeuwen, D. M., Gottschalk, R. W. H., Schoeters, G., van Larebeke, N. A., Nelen, V., Baeyens, W. F., Kleinjans, J. C. S., & van Delft, J. H. M. (2008). Transcriptome analysis in peripheral blood of humans exposed to environmental carcinogens: A promising new biomarker in environmental health studies. *Environmental Health Perspectives, 116*(11), 1519–1525.
Versantvoort, C. H., Oomen, A. G., Van de Kamp, E., Rompelberg, C. J., & Sips, A. J. (2005). Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology, 43*, 31–40.
Vitaglione, P., & Fogliano, V. (2004). Use of antioxidants to minimize the human health risk associated to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food. *Journal of Chromatography B, 802*(1), 189–199.
Walker, R. (1990). Nitrates, nitrites and *N*-nitrosocompounds: A review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Additives and Contaminants, 7*(6), 717–768.
Wang, H. S., Man, Y. B., Wu, F. Y., Zhao, Y. G., Wong, C. K., & Wong, M. H. (2010). Oral bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) through fish consumption, based on an *in vitro* digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*(21), 11517–11524.
Wang, H. S., Zhao, Y. -G., Man, Y. -B., Wong, C. K. C., & Wong, M. -H. (2011). Oral bioaccessibility and human risk assessment of organochlorine pesticides (OCPs) *via* fish consumption, using an *in vitro* gastrointestinal model. *Food Chemistry, 127*, 1673–1679.
Waters, M. D., & Fostel, J. M. (2004). Toxicogenomics and systems toxicology: Aims and prospects. *Nature Reviews Genetics, 5*(12), 936–948.
Wogan, G. N., & Tannenbaum, S. R. (1975). Environmental *N*-nitroso compounds: Implications for public health. *Toxicology and Applied Pharmacology, 31*, 375–383.
World Health Organization (WHO) (2002). Polychlorinated dibenzodioxins, polychlorinated dibenzofurans, and coplanar polychlorinated biphenyls. *Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Vol. 48*, . Geneva: WHO.
Xing, G. H., Yang, Y., Chan, J. K. Y., Tao, S., & Wong, M. H. (2008). Bioaccessibility of polychlorinated biphenyls in different foods using an *in vitro* digestion method. *Environmental Pollution, 156*, 1218–1226.
Yu, Y., Han, S., Zhang, D., van de Wiele, T., Lu, M., Wang, D., Yu, Z., Wu, M., Sheng, G., & Fu, J. (2009). Factors affecting the bioaccessibility of polybrominated diphenylethers in an *in vitro* digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57*, 133–139.
Yu, Y., Huang, N., Zhang, X., Li, J., Yu, Z., Han, S., Lu, M., Van de Wiele, T., Wu, M., Sheng, G., & Fu, J. (2011). Polybrominated diphenyl ethers in food and associated human daily intake assessment considering bioaccessibility measured by simulated gastrointestinal digestion. *Chemosphere, 83*, 152–160.
Yu, Y., Li, C., Zhang, X., Pang, Y., Zhang, S., & Fu, J. (2012). Route-specific daily uptake of organochlorine pesticides in food, dust, and air by Shanghai residents, China. *Environment International, 50*, 31–37.
Yu, Y., Li, J., Zhang, X., Yu, Z., Van de Wiele, T., Han, S., Wu, M., Sheng, G., & Fu, J. (2010). Assessment of the bioaccessibility of polybrominated diphenyl ethers in foods and the correlations of the bioaccessibility with nutrient contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*, 301–308.

I.2. Justification des micropolluants clés retenus dans le cadre de la thèse

Dans le cadre du projet SOMEAT, une liste des principaux micropolluants à risque des produits carnés ont été sélectionnés par les laboratoires nationaux de référence [3]. A partir de cette liste exhaustive de micropolluants fréquemment retrouvés dans la chaine de production de la viande, huit micropolluants appartenant à différentes familles chimiques ont été retenus dans le cadre de ce travail thèse.

Les différents micropolluants étudiés, leurs familles et leurs formules chimiques sont listés dans le Tableau 1.

Micropolluants	Familles chimiques	Formules chimiques
Cadmium	Elément métallique trace	
Polychlorobiphényles (PCBs)	Contaminants environnementaux	
Lindane	Pesticide	
Deltaméthrine	Pesticide	
Monensine	Anticoccidien	
Ampicilline	Antibiotique	
Fumonisine	Mycotoxine	
Zéaralénone	Mycotoxine	

Tableau 1: Noms, familles et formules chimiques des micropolluants clés retenus dans le cadre de ce travail de thèse.

I.2.1. Elément métallique trace : le cadmium

Le cadmium est un métal toxique, qui provient des batteries, des produits électriques, des plastiques ou des déchets industriels. Il est présent dans les sols, les eaux de surfaces et les plantes, et il est facilement mobilisé par des activités humaines. La contamination de l'environnement par le cadmium est une préoccupation internationale étant donné le risque sanitaire couru par sa pénétration dans la chaine alimentaire [4]. Une fois absorbé, ce métal est piégé dans le corps et s'accumule préférentiellement dans le rein et le foie [5], une faible partie ingérée est excrétée via les fèces et la bile [6]. Cet élément métallique est hépatotoxique, cardio-myopathique, et neurotoxique [4].

De nos jours, la présence des métaux lourds est strictement règlementée (Commission Européenne, 2006). La connaissance de la contamination éventuelle des aliments par le cadmium est renforcée par l'Etude de l'Alimentation Totale (EAT 2) qui a revelé une augmentation des concentrations moyennes du cadmium pour presque tous les aliments en comparaison avec celles obtenues par l'EAT 1. Cependant, les teneurs de l'EAT 2 sont du même ordre de grandeur que les plans de surveillance de l'Institut de Recherche en Technologies Agro-alimentaires des Céréales (2000-2010) et les plans de surveillance communautaires pour les produits céréaliers et le chocolat.

Par ailleurs, les mammifères sont moins tolérants au cadmium que les oiseaux, ces derniers peuvent être exposés à des doses alimentaires très supérieures à la réglementation fixée à 0.5 $mg.kg^{-1}$ d'aliment par le règlement (EC) No 629/2008 sans abaissement des performances de croissance ou de ponte [5].

I.2.2. Micropolluants environnementaux : les PCBs

Les polychlorobiphényles (PCBs) sont des polluants organiques persistants qui forment une famille de 209 composés aromatiques organochlorés dérivés du biphényle. Ils sont synthétisés industriellement et chimiquement semblables aux dioxines. Il existe deux grandes familles de PCBs : les PCBs de type dioxines, appelés PCBs dioxin-like ou PCBs-DL et les PCB de type non dioxines, appelés PCBs non dioxin-like ou PCBs-NDL. Les PCBs sont des composés stables, persistants, lipophiles, et s'accumulent typiquement dans les aliments et les tissus des animaux [7,8].

En 2013, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé les PCBs comme des cancérogènes de premier groupe. Compte tenu de leur toxicité et de leur accumulation dans les produits animaux (EFSA, 2012), les PCBs-NDL sont classés parmi les contaminants préoccupants. Récemment, les concentrations des PCBs ont été réglementées dans les aliments des animaux par le règlement (EC) No 32/2002 à un niveau maximal de 10 $\mu g.kg^{-1}$ et dans les produits animaux par le règlement (EC) 1881/2006 amendé par le règlement EU No 1259/2011 à un niveau maximal de 40 $\mu g.kg^{-1}$.

Les résultats des plans de surveillance réalisés par l'EAT 2 ont montré une réduction importante de l'exposition de la population française aux PCBs par rapport aux précédentes évaluations réalisées par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA, 2005b, 2007). Cette tendance est cohérente avec la diminution de la présence des PCBs dans les aliments et l'environnement, et traduit certainement l'efficacité des mesures européennes et nationales qui ciblent la réduction de la contamination par les PCBs. Cependant, une proportion faible mais significative (< 5%) des consommateurs présente des valeurs d'exposition qui dépassent les valeurs toxicologiques de référence (VTR) ; il convient donc de poursuivre les efforts pour limiter l'exposition aux PCBs.

I.2.3. Produits vétérinaires : monensine et ampicilline

Dans le cadre de notre étude, deux produits vétérinaires ont été sélectionnés parmi une liste de 75 antimicrobiens de différentes familles (pénicillines, céphalosporines, tétracyclines, macrolides, polypeptides,...) et 10 anticoccidiens (chimiques et polyéthers) étudiés par Dervilly-Pinel *et al*. (2017) [3]. Il s'agit d'un anticoccidien, la monensine et d'un antibiotique, l'ampicilline.

Monensine. La monensine a été approuvée comme un traitement pour les coccidiens chez les volailles [9]. La monensine est un sel polyéther de l'acide monocarboxylique. Il s'agit d'un ionophore, une petite molécule fabriquée par un microbe ressemblant à un champignon appelé Streptomyces pour se défendre contre d'autres microbes, principalement des bactéries et des protozoaires. Les ionophores agissent comme échangeurs d'ions (sodium, potassium, calcium et hydrogène) entre les bactéries et son milieu, un déséquilibre ionique est ainsi créé finissant par épuiser et tuer les bactéries.

La monensine améliore la synthèse de l'acide propionique chez le ruminant et diminue la dégradation des protéines, ce qui se traduit par une meilleure performance des protéines et de l'énergie métabolique [10].

L'utilisation des anticoccidiens dans le régime alimentaire des animaux est surveillée (Commission des Communautés Européennes, 2008) pour éviter la contamination des produits animaux proposés aux consommateurs. La présence de la monensine est réglementée par le règlement (EC) No 124/2009 fixant le niveau maximal à 125 $mg.kg^{-1}$ dans les aliments et 8 $\mu g.kg^{-1}$ dans les foies de volatilles.

Ampicilline. L'ampicilline est un antibiotique appartenant à la famille des pénicillines, elle est utilisée pour lutter contre les bactéries Gram positive et Gram négative chez les volailles. Par ailleurs, elle est largement utilisée pour les traitements vétérinaires préventifs contre les infections bactériales comme la gastro-intestinale, l'urogénitale, et les infections cutanées [11]. L'ampicilline est employée pour traiter les infections provoquées par l'Escherichia coli, la Salmonellose, et la Klebsiella chez les poulets [12]. Dotée d'un potentiel d'absorption intestinale et d'une résistance gastrique relativement élevés, l'ampicilline est le seul antibiotique qui peut être administré dans une solution buvable pour traiter les infections gastro-intestinales [12]. Selon les recommandations de dosage disposées pour les volailles, une dose maximale de 10 $mg.kg^{-1}$ est recommandée avec un délai d'attente de 7 jours avant l'abattage.

I.2.4. Produits phytosanitaires : deltaméthrine et lindane

Les pesticides sont des produits utilisés pour le traitement des végétaux qui peuvent représenter un problème pour la production de la viande suite à leur transfert dans les tissus des animaux [13]. En réponse à l'accumulation de leurs résidus dans les aliments et les tissus, l'utilisation des pesticides a été fortement réduite et strictement réglementée (FDA, 2012). Selon la récente étude publiée par Dervilly-Pinel *et al*. (2017) [3], une liste de 121 pesticides sont susceptibles d'être présents dans la chaine de production de la viande. A partir de cette liste, deux pesticides, la deltaméthrine et le lindane ont été sélectionnés dans le cadre de ce travail de thèse.

Deltaméthrine. La deltaméthrine est un insecticide de la famille des pyréthrinoïdes [14]. Les pyréthrinoïdes synthétiques sont largement utilisés pour protéger les cultures, ils sont connus

par leur photo-stabilité et leur faible toxicité chez les animaux.

Initialement, la deltaméthrine a été considérée comme un insecticide non toxique chez les mammifères. Cependant, des effets toxiques ont été récemment soulignés sur différents types de cellules, y compris des cellules neuronales et les thymocytes [15]. L'utilisation de la deltaméthrine est devenue strictement réglementée dans les aliments et les tissus des animaux, par la réglementation Européenne (EU) No 524/2011, la limite maximale autorisée dans les aliments est fixée à 2 $mg.kg^{-1}$.

Lindane. Le lindane (gamma-hexachlorocyclohexane) est un insecticide organochloré utilisé dans les traitements vétérinaires et la médecine pour traiter l'ectoparasite et la pédiculose. Cette molécule organochlorée est d'importance considérable pour la santé publique. En dépit des restrictions sur son utilisation, elle demeure présente dans l'environnement et les produits animaux [16]. En effet, l'ingestion du lindane est la voie principale qui entraine sa bioaccumulation dans les tissus biologiques et préférentiellement dans le foie, le cerveau et les tissus adipeux [17]. Le lindane est responsable du développement de plusieurs maladies de dysfonctionnements physiologiques [16] [18,19]. La limite maximale autorisée du lindane dans les aliments pour animaux est régulée à 0.2 $mg.kg^{-1}$par la directive (EC) No 32/2002.

I.2.5. Mycotoxines : fumonisines et zéaralénone

Les mycotoxines sont des contaminants naturels, non-anthropogènes, produites par diverses espèces de champignons microscopiques telles que les moisissures. Leurs métabolites possèdent une action toxique immunosuppressive, hépatotoxique et neurotoxique chez les animaux et les humains [20]. La consommation des produits agricoles et les dérivés des produits animaux contaminés par les mycotoxines peut induire la transmission de ces substances chez l'homme [21].

Fumonisines (B1&B2). Les fumonisines sont principalement produites par les *Fusarium verticillioides* et les *Fusarium proliferatum fungi* [22]. Les fumonisines B1 et B2 sont les plus représentatives des fumonisines (Commision Européenne, 2003) [23]. La fumonisine B1 est largement retrouvée dans les productions de maïs (EHC, 2000). Cette mycotoxine est soupçonnée d'être impliquée dans le développement de plusieurs types de cancers (JECFA, 2001 ; CIRC, 2002). Par ailleurs, l'exposition aux fumonisines B1&B2 a été marquée par une toxicité hépatique et rénale chez les dindes [24].

De nos jours, la teneur maximale tolérée pour les fumonisines (B1&B2) dans les aliments de volailles est fixée à 20 $mg.kg^{-1}$ par le règlement (EC) No 576/ 2006.

Zéaralénone. Les champignons du genre *Fusarium* sont omniprésents dans les aliments, ils produisent des quantités de zéaralénone qui, lorsqu'elles sont ingérées à faibles doses pendant une longue période pourraient induire des maladies [25]. La zéaralénone est également un contaminant alimentaire largement présent dans les aliments des animaux [26]. En raison des effets toxiques, hémato-toxiques, immuno-toxiques, géno-toxiques, et cancérogènes pour plusieurs espèces vivantes, la zéaralénone est considérée comme une mycotoxine de forte significativité [27]. Par conséquent, l'élimination de cette mycotoxine est un objet important pour la désintoxication agricole. D'un autre côté, les résultats de l'EAT 2 ont relevé une diminution de l'exposition de la population à la zéaralénone par rapport aux résultats de l'EAT1 grâce à la régulation (EC) No 1881/2006 qui limite le niveau maximal autorisé pour cette mycotoxine dans les produits alimentaires à 0.5 $mg.kg^{-1}$.

II. La volatolomique, une option pour tracer l'exposition animale aux micropolluants

De nos jours, le contrôle des micropolluants dans l'alimentation humaine est devenu un enjeu de santé publique majeur [28,29]. Jusqu'à présent, les solutions analytiques mises en œuvre pour assurer ce contrôle sont des méthodes d'analyses ciblées employées par les laboratoires nationaux de référence qui visent à doser spécifiquement les contaminants et/ou leurs résidus dans les aliments et/ou les tissus des animaux [30]. Ces méthodes de référence sont performantes et efficaces pour le contrôle ponctuel de la contamination dans le cadre des plans de surveillance et de contrôle mis en œuvre par les agences de sécurité sanitaire nationales (par ex. ANSES en France) et internationales (par exemple EFSA en Europe). Néanmoins du fait de leur coût et de leur lourdeur d'utilisation, ces méthodes sont souvent économiquement inadaptées pour un contrôle systématique de la contamination des chaines de production des aliments [31].

II.1. Approches omiques

II.1.1. Principe

Pour pallier les contraintes de ces méthodes d'analyses classiques, une des pistes les plus sérieuses consistent à utiliser les récents progrès des approches « omiques ». Celles-ci consistent à analyser les profils génomiques, transcriptomiques, protéomiques, lipidomiques et métabolomiques dans les tissus et les fluides des animaux exposés dans le but de révéler des marqueurs d'exposition aux substances toxiques [32]. L'idée de base associée aux approches omiques consiste à étudier la complexité du système vivant dans son ensemble, au moyen de méthodologies qui peuvent en particulier être utiles pour mettre en évidence des marqueurs de pathologies ou d'exposition aux micropolluants, en mettant en œuvre de nouvelles connaissances sur le plan mécanistique, ou en élaborant de nouveaux outils de toxicologies pour prédire et identifier des situations à risques [33].

Ces stratégies constituent une cascade comportant principalement (Figure1) : la génomique qui consiste à analyser les gènes [34], la transcriptomique à travers l'étude de l'expression des gènes et de leur régulation [35], la protéomique par l'analyse des protéines [36], et la métabolomique qui étudie les changements phénotypiques à travers la réponse de plusieurs types de métabolites [37]. L'ensemble de ces approches permet d'obtenir de nombreuses informations sur les réponses cellulaires et tissulaires qui peuvent se produire dans l'organisme.

Si l'évolution de la génomique à la protéomique a nécessité quelques dizaines d'années, le passage de la protéomique à la métabolomique n'a pris que quelques années [38]. Aujourd'hui, le concept de la « *Big Science* » est en développement. Il repose sur la génération d'une quantité importante de différentes données 'omiques' jamais atteinte auparavant ; un des objectifs étant d'exploiter simultanément les données issues de ces différentes approches 'omiques', qui décrivent les systèmes biologiques étudiés [38].

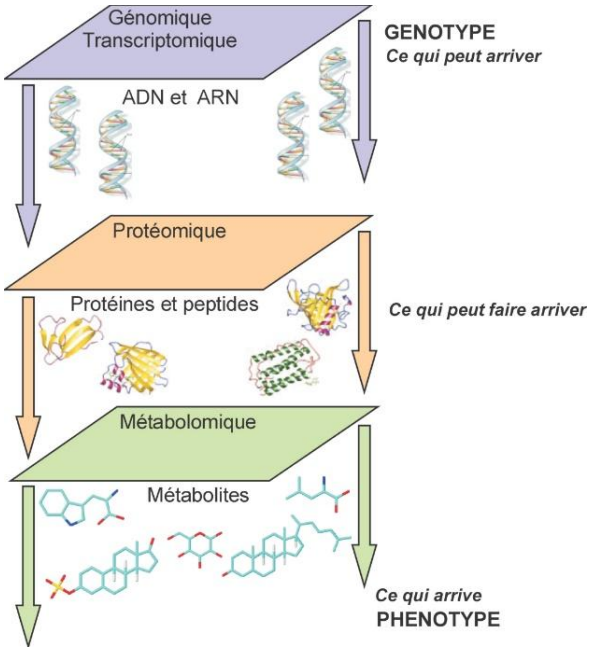


Figure 1 : La cascade " omique " qui illustre les réponses génomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique décrivant la réponse d'un système biologique à une pathologie ou aux perturbations induites par une exposition environnementale. La métabolomique est la voix qui traduit les changements phénotypiques [38].

La « métabolomique » se focalise sur les composés chimiques résultants des phénomènes complexes qui ont eu lieu dans le système biologique étudié. Le métabolome est formé d'une classe de molécules de faibles poids moléculaires (< 1 000 Da) correspondant à un ensemble de métabolites primaires et secondaires générés par l'organisme ou aux produits de métabolisation des substances exogènes [33]. Le métabolome est représenté par une large gamme de composés couvrant plusieurs familles de composés, comme les acides aminées, les lipides, les acides organiques, les peptides, les composés organométalliques, et les nucléotides [37].

L'analyse du métabolome a été principalement développée dans le domaine de la médecine dans le but d'améliorer le diagnostic précoce des maladies et des pathologies, et pour comprendre leurs mécanismes d'action [39]. Plusieurs études ont démontré le potentiel informatif de la métabolomique, capable de révéler les changements induits par un stress métabolique crée dans l'organisme [38,40]. Les composés dont l'abondance est modifiée en réponse au stress métabolique pourraient renseigner sur les changements subtils provoqués à un niveau cellulaire, et notamment tracer l'exposition aux contaminants chimiques [41].

Ainsi, la métabolomique s'est avérée être un outil performant qui peut révéler des marqueurs susceptibles de tracer un dysfonctionnement biologique [42], la présence d'une pathologie [43], ou la réponse à un traitement particulier [44], et d'expliquer notamment les mécanismes biochimiques impliqués [45].

II.1.2. Profilage et empreintes métabolomiques

L'objectif de ce paragraphe est de présenter les stratégies analytiques qui pourraient être appliquées pour acquérir les données métabolomiques. Actuellement, deux approches complémentaires sont utilisées pour l'analyse d'un large éventail de métabolites dans les matrices biologiques : il s'agit de l'analyse des empreintes métaboliques et du profilage métabolique [38] (Figure 2).

La première stratégie est l'analyse des empreintes. Dans cette approche, l'objectif n'est pas d'identifier chaque métabolite analysé, mais de comparer les modèles ou «les empreintes» de l'ensemble des métabolites en réponse à une maladie ou à une exposition aux xéno-toxiques. Cette approche a été appliquée pour étudier la réponse métabolique dans plusieurs matrices biologiques, telles que l'urine, le plasma ou le sérum, la salive et les tissus dans le but de mettre en évidence des différences métabolomiques entre des patients et des sujets sains [38].

Dans le cas des études basées sur les analyses par spectrométrie de masse, les empreintes des métabolites sont décrites par les rapports masse/charge (m/z) et les intensités correspondantes aux ions détectés. Les échantillons peuvent être classés si les empreintes des métabolites reflètent des différences entre les groupes [38]. Dans cette logique, Berge *et al*. (2011) [46] ont utilisé les empreintes volatolomiques dans le foie et ont révélé des différences entre les signatures volatolomiques des animaux exposés et non-exposés à deux types de micropolluants environnementaux, il s'agit des HAPs et des PBDEs. Cependant, l'application de cette stratégie n'aboutit pas à l'identification des métabolites responsables des différences entre les groupes expérimentaux, absolument indispensable pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la réponse métabolomique.

La deuxième stratégie est basée sur le profilage métabolique qui s'intéresse aux métabolites reliés ou non à un mécanisme métabolique spécifique ou une classe de composés. Parmi les approches du profilage métabolique, on cite l'analyse ciblée qui vise à suivre des analytes préalablement sélectionnés, comme le cas des marqueurs de maladies ou d'exposition aux

micropolluants [17,47] ou la recherche des produits de certaines réactions enzymatiques [48]. Dans la plupart des analyses des profils métaboliques, une hypothèse de travail est émise. Selon la problématique de recherche, la classe de métabolites est sélectionnée pour l'analyse avec des méthodes analytiques adaptées à leur détermination. Le résultat du profilage métabolique est quantitatif et indépendant de la technologie utilisée pour l'acquisition des données. En conséquence, les données peuvent être utilisées pour construire une base de données qui peut être intégrée avec les autres données omiques ce qui aboutit à une meilleure compréhension des mécanismes biologiques. Dans le cas des études basées sur les analyses par spectrométrie de masse, les profils métaboliques des métabolites sont décrites par les valeurs ***m/z*** et les intensités correspondantes aux ions détectés par le système d'analyse. Les métabolites sont ensuite identifiés et les échantillons peuvent être classés selon les différences des abondances des métabolites entre les groupes [38].

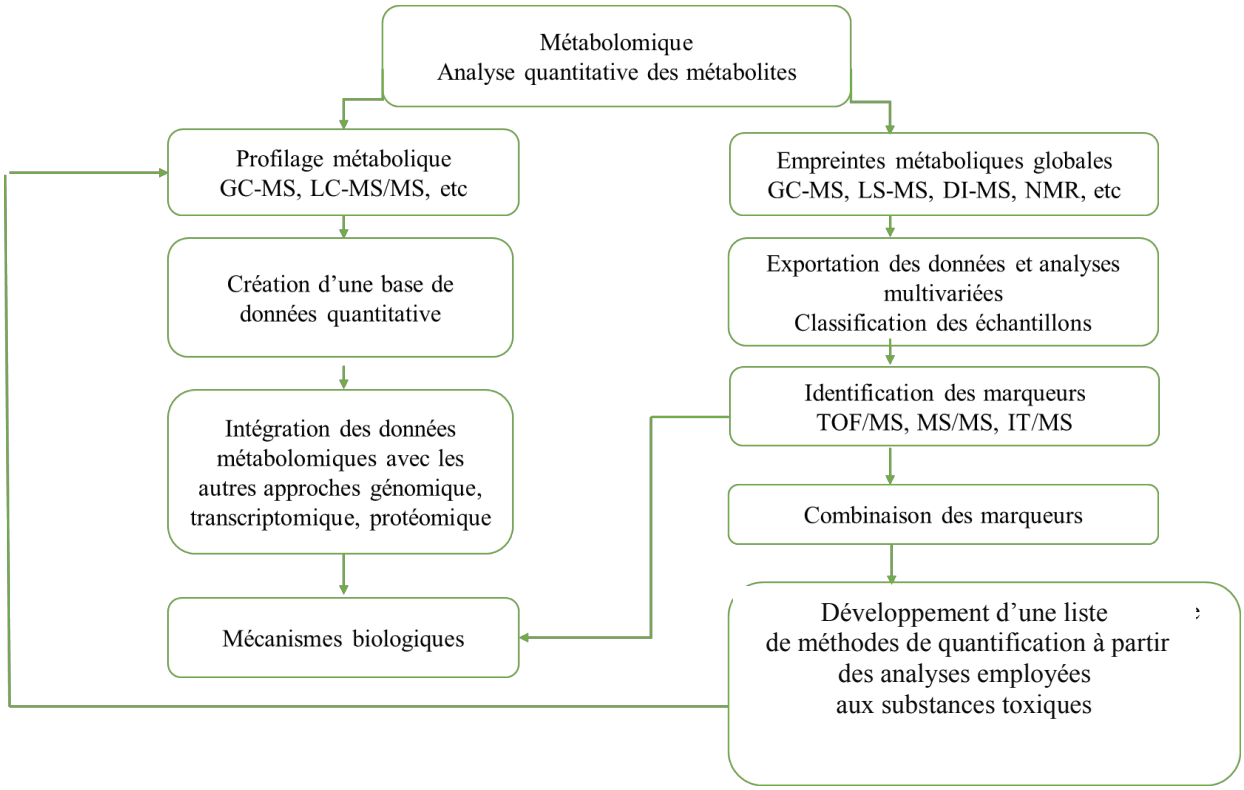


Figure 2 : Stratégies d'acquisition des données métabolomiques [38]

Finalement, l'une de ces deux approches analytiques peut être appliquée selon les exigences analytiques et la problématique étudiée [49]. Dans le cadre de ce travail de thèse, l'analyse des profils des composés volatils dans le foie, le plasma et les tissus adipeux est choisie dans le but d'identifier des marqueurs volatils de l'exposition des animaux aux différents types de micropolluants.

II.1.3. Principales étapes de la stratégie expérimentale

La stratégie expérimentale présentée ici décrit l'ensemble des étapes clés qui aboutit à l'identification de marqueurs métaboliques par une approche non-ciblée (Figure 3) :

- Expérimentation et échantillonnage : elle concerne la mise en place d'un protocole expérimental adapté à l'acquisition du matériel biologique.
- Extraction des métabolites dans les matrices biologiques : elle consiste à mettre au point les paramètres d'extraction en fonction de la nature des métabolites ciblés dans la matrice étudiée.
- Inclusion de contrôles qualités (QC) pour contrôler la performance des outils analytiques utilisés et pour la correction des variations non-biologiques.
- Utilisation de blancs pour définir le bruit du signal analysé.
- Prétraitement des données avant l'analyse statistique : application de méthodes de normalisation et de transformation des données pour éliminer les bruits et les dérives instrumentales, et corriger les variations non-biologiques pour faire submerger les différences biologiques intéressantes à mettre en œuvre par le traitement statistique appliqué derrière.
- Traitements statistiques des données par des outils adaptés aux objectifs de l'étude : choix de la méthode de traitement statistique adaptée à la nature des données métabolomiques collectées.
- Identification de marqueurs candidats : pour les données collectées par GC-MS, plusieurs bases de données libres existent qui permettent de comparer les spectres de masses et les indices de rétention théoriques et pratiques.
- Interprétation biologique des mécanismes biochimiques responsables de la génération des marqueurs.

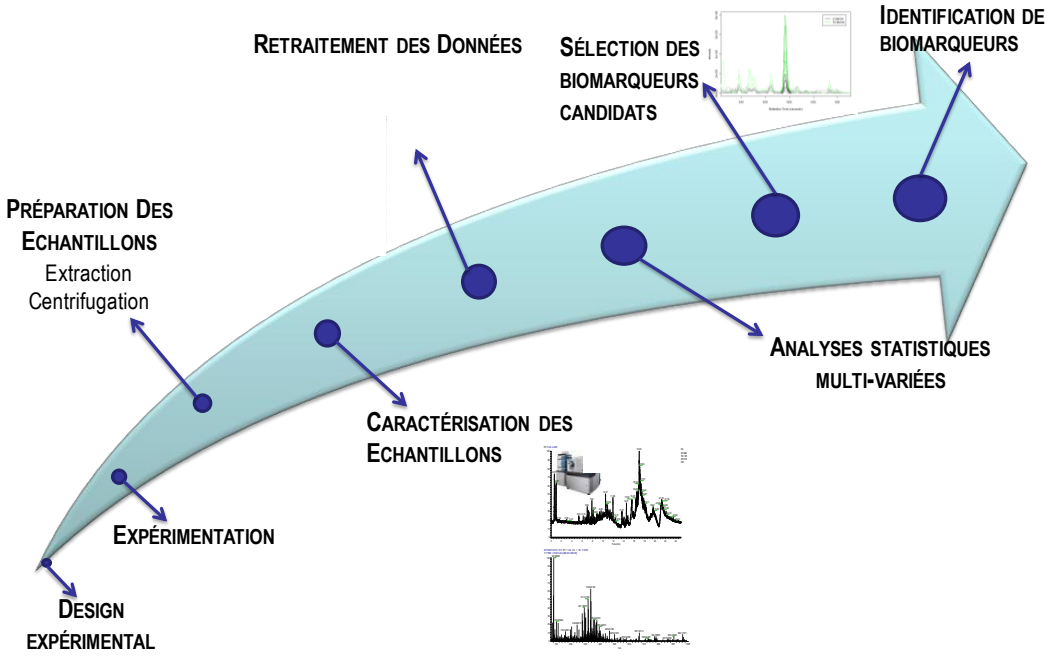


Figure 3 : Description des étapes de la stratégie expérimentale pour l'analyse non ciblée du métabolome

II.1.3.1. Prélèvement et conservation des échantillons

Pendant le préparation des échantillons biologiques, des considérations particulières doivent être prises en compte pour minimiser la modification ou la dégradation des métabolites volatils après l'échantillonnage en raison de l'activité enzymatique restante et des processus d'oxydation qui peuvent avoir lieu. L'échantillonnage et le stockage des échantillons biologiques sont des éléments très importants durant le processus d'analyse. Tout d'abord, il est essentiel que les échantillons biologiques soient prélevés avec le minimum de manipulation pour éviter la perte des métabolites. Tous les tissus et les fluides biologiques devraient idéalement être extraits immédiatement après le prélèvement de l'organisme vivant, de sorte qu'il y ait peu de modifications sur les métabolites. En cas d'analyse ultérieure, les tissus et les fluides doivent être congelés aussi rapidement que possible dans la glace carbonique ou l'azote liquide, et stockés dans des récipients scellés à - 80°C.

II.1.3.2. Préparation des échantillons biologiques

La préparation des échantillons dépend de l'état physique de la matrice étudiée (solide ou liquide). Pour les matrices solides, une étape de broyage et d'homogénéisation doit être appliquée préalablement à l'extraction afin de réduire la variabilité au cours de l'échantillonnage.

Diverses méthodes d'homogénéisation mécaniques aient été développées récemment. Cependant, le broyage à billes reste la méthode la plus utilisée pour la préparation des échantillons solides. La congélation des échantillons à l'aide d'azote liquide suivie d'un broyage mécanique réalisé sous azote liquide demeure la méthode la plus efficace qui maintient la stabilité de l'échantillon grâce à la température basse et fournit des échantillons sous la forme de poudre finement homogénéisée [46].

Dans le cas des échantillons liquides comme le plasma, une étape de centrifugation de sang permet de séparer les globules rouges, le plasma et les plaquettes. Les échantillons doivent être manipulés dans la glace pour éviter les cycles de congélation-décongélation qui peuvent modifier les métabolites. D'une manière générale, il est important de limiter la variabilité non-biologique avec un protocole de préparation des échantillons robuste et éviter les pertes des COVs.

II.1.3.3. Evaluation de la qualité des données

Dans le but d'assurer la fiabilité des résultats statistiques et la reproductibilité de la méthode d'extraction et d'analyse, l'intégration d'une série d'échantillons de contrôle qualité (QC) qui viennent de la même source des échantillons et qui seront analysés dans les mêmes conditions est indispensable pour évaluer la répétabilité et la reproductibilité de l'analyse.

Des échantillons QC sont utilisés pour évaluer la qualité des données acquises, souvent via une Analyse en Composantes Principales pour identifier les valeurs aberrantes. Diverses méthodes ont été développées pour traiter les problèmes d'effet batch (effet de dérive inter-séries) souvent observés pendant l'analyse de longues séries d'échantillons.

La préparation des QC d'échantillons liquides comme le plasma est simple et pourrait être efficacement menée par une simple agitation d'un mélange de tous les échantillons.

Cependant, dans le cas des échantillons solides comme la poudre de foie, la préparation des QC n'est pas fiable compte tenu des erreurs qui peuvent avoir lieu sur la pesée des différents

échantillons, mais aussi de l'incertitude de l'homogénéité du mélange qui représente le QC.

II.1.3.4. Déroulement de la session

Concernant le nombre d'échantillons et la durée de l'analyse, il est nécessaire d'adapter un protocole d'analyse des échantillons en plusieurs sessions pour éviter les pertes en termes de sensibilité et de stabilité des composés volatils dans les échantillons.
Par ailleurs, des blancs peuvent être analysés entre les séries des échantillons afin d'obtenir le signal de fond de l'analyse et d'observer d'éventuelles rémanences (carry over en anglais).
Un troisième point crucial est d'analyser les échantillons de différentes sources dans un ordre aléatoire pour éviter l'effet de l'ordre des injections.

II.2. Volatolomique

II.2.1. Le volatolome

Parmi les différentes classes de métabolites, les composés organiques volatils (COVs) sont des composés de faibles poids moléculaires. Pour un organe ou un fluide biologique l'ensemble de ces COVs forme le volatolome.
Plusieurs études montrent l'intérêt de l'examen des changements de composition du volatolome pour diagnostiquer plusieurs types de pathologies [40,50-54].
Berge *et al*. (2011) [46] ont également démontré le potentiel du « volatolome » hépatique pour révéler l'exposition des animaux aux micropolluants environnementaux via leur alimentation. Les COVs forment une classe de molécules importante, présente dans différents fluides (expirât, urine, sang) et tissus biologiques (peau, foie, poumons, reins, cerveau). Le taux d'émission des COVs dépend du statut physiologique de l'organisme (déshydratation, alimentation, exposition aux substances environnementales et drogues), et des conditions environnementales (humidité, température, oxygène) [55]. Tous ces facteurs influencent inévitablement les mécanismes de production des COVs.

II.2.2. Mécanismes biochimiques responsables des changements de composition du volatolome

Les mécanismes biologiques impliqués dans la régulation de la production des COVs ont été reportés dans la revue de Hakim *et al*. (2012) [56], qui ont suggéré qu'une exposition aux substances exogènes, provoque un stress oxydatif et active certaines enzymes de détoxification au niveau des cellules hépatocytaires (Figure 4).

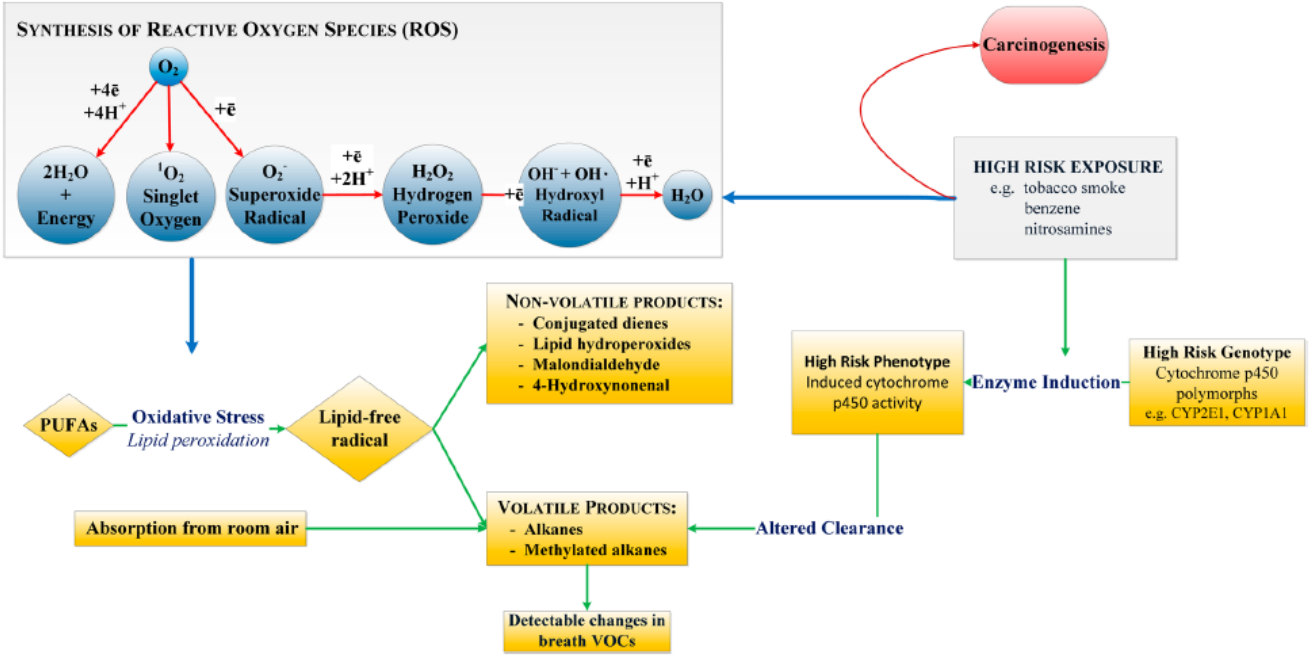


Figure 4 : Modèle pathophysiologique dans le foie pour expliquer les sources possibles des composés organiques volatils (COVs) comme marqueurs de pathologies ou d'exposition aux polluants [56].

En conditions normales, les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) sont produites dans l'organisme en faibles quantités; elles ont des effets bénéfiques dans l'homéostasie cellulaire et les mécanismes moléculaires clés tels que la modulation du métabolisme cellulaire, la signalisation cellulaire, l'inhibition ou l'activation de différents facteurs de transcription des gènes, l'inhibition de la croissance bactérienne, l'inactivation des virus et la libération de cytokines inflammatoires [57]. Cependant, en raison d'une situation de stress provoquée par une pathologie ou une exposition environnementale aux micropolluants, les niveaux de production des ROS peuvent augmenter considérablement ce qui déclenche un stress oxydatif marqué par la perte de l'équilibre redox.

Au niveau des cellules hépatiques, les ROS présentes en concentration élevées, sont des inducteurs puissants qui ciblent les phospholipides, les protéines et l'ADN [57]. En effet, les interactions des ROS avec les composantes des cellules hépatiques entrainent la peroxydation des lipides, l'oxydation des protéines et des dommages à l'ADN. Les produits finaux de ces interactions chimiques sont généralement des hydrocarbures [57].

Particulièrement, la peroxydation des lipides est une réaction en chaîne, initiée par l'élimination d'un atome d'hydrogène allylique par les ROS. Ainsi, le radical généré est conjugué, peroxydé par l'oxygène et subit d'autres réactions. Finalement, les hydrocarbures saturés, tels que l'éthane et le pentane, sont générés à partir des acides gras w 3 et w 6, respectivement. Par conséquent, ces hydrocarbures aliphatiques sont considérés comme des marqueurs de la peroxydation lipidique [58].

Parallèlement, les organes de détoxification comme le foie agissent pour métaboliser activement les substances exogènes comme les polluants chimiques, les médicaments et les xénobiotiques par un ensemble d'enzymes de détoxification qui jouent un rôle central pour la protection de l'organisme. Toutes modifications de leur régulation, leur expression et leur activité peuvent engendrer des conséquences sur la réponse métabolique de l'organisme [56].

En effet, les molécules exogènes subissent une double réaction de détoxification. D'abord, la première phase dite de fonctionnalisation se déroule au niveau des microsomes par les enzymes cytochrome P450. Ensuite, la deuxième phase fait appel aux enzymes de conjugaison comme les glucuro- ou glutathion-S-transférases (GST) qui catalysent les réactions de conjugaison. Enfin, les enzymes transporteurs de la phase III comme la P-glycoprotéine ou les MRP (multidrug resistance proteins) éliminent les dérivés des xénobiotiques via les membranes cellulaires [56] (Figure 5).

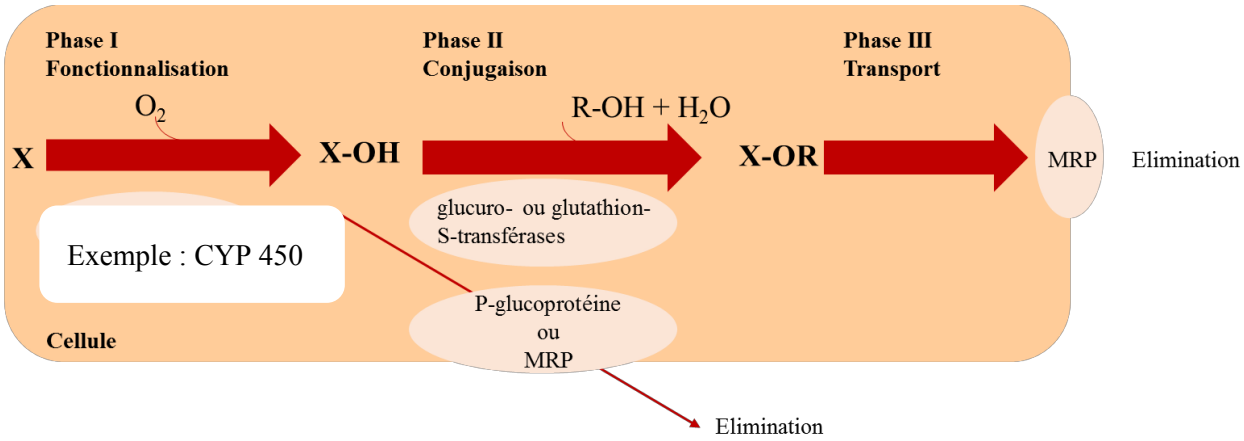


Figure 5 : Mécanisme de détoxification des xénobiotiques au niveau cellulaire.

En outres, Hakim *et al*. (2012) [56] ont expliqué que l'activation de certaines enzymes de détoxification comme le Cytochrome p450 (CYP 450) au cours du processus de détoxification décrit précédemment peut induire la libération d'alcools primaires et secondaires par hydroxylation des hydrocarbures.

$$\text{Alcanes} \longrightarrow \text{Alcools}$$

A leur tour, les alcools sont métabolisés dans le corps par diffèrent types d'enzymes, comme les Alcools Déshydrogénases (ADH) et les cytochromes P450 (CYP2E1), qui agissent essentiellement dans le foie en formant des aldéhydes. Les ADH forment une classe d'enzymes appelée oxydoréductases qui forment des aldéhydes et des cétones à partir des alcools par l'intermédiaire de la réduction des nicotinamides adénine dinucléotides (NAD^+ à NADH) qui a lieu essentiellement dans le foie. Les ADH catalysent l'oxydation de plusieurs alcools, notamment les primaires, les secondaires, et les cycliques.

$$\text{Alcools} \longrightarrow \text{Aldéhydes}$$

$$ROH + NAD^+ \longrightarrow RCHO + NADH + H^+$$

Les aldéhydes produits peuvent être transformés par les Aldéhydes déshydrogénases (ALDH) qui forment une famille d'enzymes responsables de l'oxydation des aldéhydes en acides carboxyliques. En effet, l'activité de ces enzymes est modulée par la présence de pathologie ou d'exposition aux xéno-toxiques [56].

Aldéhydes ⟶ Acides Carboxyliques

$$RCHO + NAD^+ + H_2O \longrightarrow RCOOH + NADH + H^+$$

Ainsi, il est possible que l'activation des enzymes de détoxification entraine l'accélération du catabolisme des produits du stress oxydatif à courte chaîne (C3-C11), ce qui induit la modification des abondances des différentes familles chimiques de COVs produits [56].
Ces premiers travaux qui expliquent les mécanismes impliqués dans les changements de production des différentes familles chimiques des COVs fournissent une explication de l'origine biochimique de marqueurs volatils dont les niveaux de production pourraient être perturbés par l'exposition aux micropolluants.

III. Analyse du volatolome

Afin de mettre en place une stratégie pertinente pour extraire l'information utile des COVs dans les échantillons biologiques, il est nécessaire d'identifier les principaux verrous de l'analyse de leur volatolome. Du point de vue instrumental, le principal verrou tient au choix de la méthode d'extraction utilisée en amont de la chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. Si la SPME est aujourd'hui plébiscitée par l'ensemble des études en volatolomique, les conditions de sa mise en œuvre sont souvent discutables et mériteraient d'être examinées.
Du point de vue chimiométrique, le traitement des données est généralement réalisé de manière assez rudimentaire en couplant des techniques d'analyse univariées à des approches d'analyses factorielles non supervisées. Plusieurs travaux suggèrent que la recherche de marqueurs pourrait fortement bénéficier des développements récents d'approches multi-tableaux.

III.1. Microextraction sur phase solide (SPME)

L'analyse des COVs dans les fluides et les tissus biologiques semble être compliquée étant donné le large éventail des abondances et la complexité des matrices. Certes, la chromatographie en phase gazeuse (Gas Chromatography-GC) est la méthode séparative la plus utilisée pour l'analyse des COVs dans les matrices biologiques comme l'urine [59], le plasma [60], l'expirât [61], et le sang [62]. Par ailleurs, la combinaison de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse (GC-MS) est connue par son efficacité, sa sensibilité, et sa capacité à fournir des données qualitatives et quantitatives sur la structure et les propriétés physicochimiques des métabolites analysés [63].

Toutefois, ce type de couplage nécessite une étape de préparation de l'échantillon adaptée à la classe des métabolites ciblés [38]. Le choix d'une méthode d'extraction appropriée est indispensable pour assurer la qualité de l'analyse métabolomique. La méthode de préparation de l'échantillon doit être simple et rapide de manière à protéger les analytes d'intérêt contre la dégradation et la décomposition liées notamment à la réactivité des COVs, à la chaleur ou à des phénomènes d'oxydation. Dans cette logique, les techniques d'extraction sans solvant restent les plus favorables pour l'analyse des composés volatils [38].

Aujourd'hui, la micro-extraction en phase solide (SPME) est certainement la méthode privilégiée en analyse volatolomique [64]. Cette technique, conçue par Pawliszyn en 1989 [65], est basée sur une pré-concentration des COVs sur une fibre fabriquée à base d'un film en silice qui constitue la phase stationnaire sur laquelle les COVs viennent s'adsorber [66,67]. La SPME a été appliquée dans plusieurs domaines comme méthode d'extraction et d'analyse des échantillons environnementaux [68] [69], des aliments [63,70,71], des flaveurs et arômes [72,73], des produits pharmaceutiques [74,75] et des matrices biologiques [54,76,77]. Cette méthode présente de nombreux avantages en termes de sensibilité, de rapidité, d'automatisation, de mise en œuvre, et de manipulation minimale des échantillons avant l'analyse, ce qui limite les artéfacts [65,78,79].

La SPME est principalement utilisée en mode d'immersion directe (Direct Immersion, DI) ou en mode espace de tête dynamique (Dynamic Headspace, HS). En mode DI, la fibre SPME est immergée dans l'échantillon et les analytes s'adsorbent directement sur la fibre. Toutefois, les métabolites polaires à poids moléculaires élevés peuvent être aussi capturés, leur adsorption conduit à des réactions de décomposition dans l'injecteur et à la formation d'artefacts. Ainsi, de nouveaux revêtements plus solides que les polymères SPME

commercialisés sont en cours de conception dans le but d'améliorer la compatibilité de la DI-SPME à l'extraction des matrices biologiques complexes. En mode HS-SPME, la quantité d'analytes extraite sur la fibre dépend de l'équilibre entre l'échantillon/ phase gazeuse et la phase gazeuse/ fibre [80]. Seuls les composés volatils extraits dans la phase gazeuse viennent s'adsorber sur le film de la fibre ce qui rend ce mode adapté à l'extraction des COVs dans l'expirât, les plantes, les insectes, les microorganismes, les tissus des animaux, et les fluides biologiques [81]. Evidemment, on constate que le mode d'extraction en espace de tête est très avantageux dans le cas des matrices biologiques étant donné que la fibre ne rentre pas en contact direct avec la matrice ce qui la protège contre les interférences avec les macromolécules de la matrice [80]. Cependant, il n'existe pas de procédure universelle d'extraction par SPME adaptée à l'extraction des COVs dans toutes les matrices biologiques. Ceci souligne l'importance d'une étape d'optimisation des paramètres qui peuvent influencer l'efficacité d'extraction par SPME [82] et qui doivent être déterminés selon la matrice et l'étude mise en œuvre.

La compréhension des principes fondamentaux du fonctionnement de la SPME a progressé parallèlement au développement de nouvelles technologies dans le but d'élargir les champs d'application de cette technique d'extraction. Ainsi, il est important de comprendre les principes thermodynamiques et cinétiques qui gouvernent l'extraction, pour mettre en place un protocole approprié.

III.1.1. Principe Thermodynamique

Typiquement, le processus d'extraction par SPME n'est considéré complet que lorsque les concentrations des analytes dans la matrice et sur le film de la fibre atteignent l'équilibre. La quantité d'analyte extraite à l'équilibre est décrite par l'équation 1:

$$ne = \left(\frac{Kfs\ Vs\ Vf}{Kfs\ Vf + Vs}\right) C_0 \quad \text{Equation (1)}$$

C_0 est la concentration initiale des analytes dans l'échantillon ; V_s et V_f sont les volumes de l'échantillon et de la fibre, respectivement; K_{fs} est le coefficient de distribution des analytes entre la fibre et la matrice.

Cette équation montre que la quantité des analytes extraite sur la fibre (ne) est linéairement

proportionnelle à la concentration des analytes dans la matrice (C_0) ce qui confirme l'aspect quantitatif de l'extraction par SPME.

Dans le cas où le volume de l'échantillon est très élevé, $V_s >> K_{fs}V_f$ et l'équation 1 peut se simplifier comme suit :

$$ne = K_{fs} V_f C_0 \quad \text{Equation (2)}$$

Ainsi, les quantités d'analytes extraites sont indépendantes du volume de l'échantillon et dépendent uniquement de leurs concentrations initiales dans la matrice extraite [2].
Par ailleurs, les constantes de distribution entre matrice/ phase dépendent d'une variété de paramètres expérimentales comme la température, la pression et la composition de la matrice.
En effet, si la température de l'échantillon et celle de la fibre changent de T_0 à T, les constantes de distribution changent et se décrivent par l'équation suivante (équation 3):

$$K_{fs} = K_0 \exp\left[-\frac{\Delta H}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T0}\right)\right] \quad \text{Equation (3)}$$

K_0 est la constante de distribution à la température T_0 ; ΔH est l'enthalpie de l'analyte quand il passe de la matrice vers la fibre ; R est la constante du gaz.

Lorsque la valeur de K_{fs} est supérieure à 1, l'analyte possède une énergie potentielle plus faible sur la fibre que dans l'échantillon au début de l'extraction. En effet, la répartition des analytes sur la fibre est un processus exothermique ce qui signifie que la valeur ΔH est supérieure à 0 et l'élévation de la température diminuera la valeur de K_{fs} (équivalent à un faible facteur d'enrichissement).

III.1.2. Principe Cinétique

La cinétique du processus d'extraction par SPME détermine la vitesse d'extraction. En effet, la théorie cinétique identifie le taux d'extraction et indique des stratégies pour augmenter la vitesse d'extraction. Le processus d'extraction par SPME suit généralement le profil illustré sur figure 6 qui montre une augmentation rapide de la quantité d'analyte adsorbée sur la fibre immédiatement après le contact de la fibre avec l'échantillon, le débit diminue ensuite jusqu'à atteindre l'équilibre.

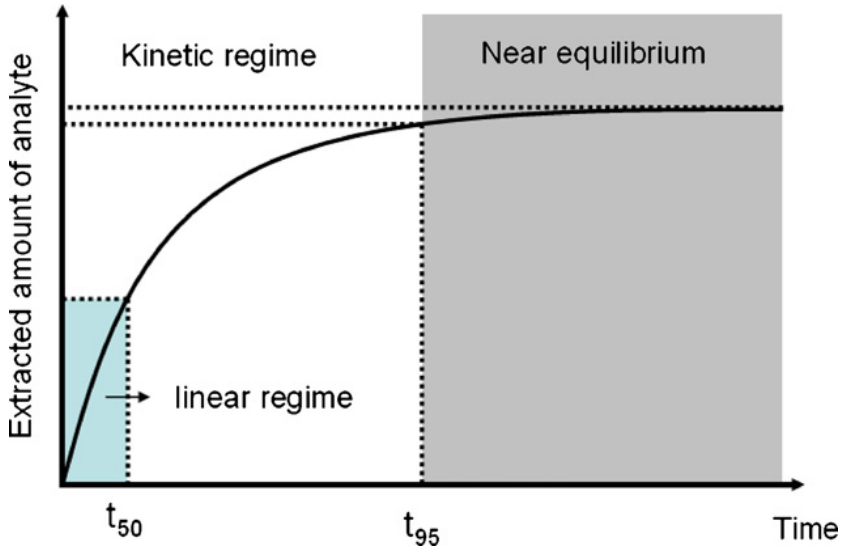


Figure 6 : Profil typique du temps d'extraction des composés volatils par SPME. Copié de l'article Ouyang *et al*. (2011) [2].

L'extraction est un processus cinétique et l'absorption des analytes demeure linéaire lorsque le temps d'échantillonnage est inférieur à t_{50}. Comme le temps requis pour atteindre l'équilibre est infiniment long, le temps d'équilibre est supposé atteint lorsque 95% de la quantité d'un analyte est extraite de la matrice.

Pour comprendre la cinétique du processus d'extraction par SPME, le modèle Prandtl boundary Layer peut été utilisé pour simplifier les équations correspondantes. En effet, ce modèle suppose l'existence d'une couche fine de liaison autour de la fibre pour un fluide sans agitation. Les mouvements du fluide augmentent graduellement quand la distance par rapport à la surface de la fibre augmente, jusqu'à ce que le mouvement du fluide corresponde au flux dans l'échantillon. L'épaisseur de cette couche limite est déterminée par la viscosité du fluide et les conditions d'agitation du système [2].

Lorsque le taux d'extraction est déterminé par la diffusion des analytes sur cette couche autour de la fibre, le temps nécessaire pour que l'équilibre soit atteint peut être estimé par l'équation suivante (équation 4):

$$te = t95\% = 3 \times \frac{\delta \, \mathrm{Kfs} \, (b-a)}{Ds} \quad \text{Equation (4)}$$

δ est l'épaisseur de la liaison autour du film de la fibre, (b-a) est l'épaisseur du film de la fibre, Ds est le coefficient de diffusion des analytes dans l'eau ; K_{fs} est le coefficient de distribution des analytes entre la matrice et la fibre.

La sensibilité de la technique peut être approuvée par l'augmentation de l'épaisseur de la fibre. Cependant, une augmentation significative du temps d'extraction aura lieu. Ainsi, la diminution de l'épaisseur de la fibre entraine l'accélération du processus d'extraction et résulte à un temps d'équilibre plus court.

En mode espace de tête, les analytes volatils doivent être diffusés de la matrice vers l'espace de tête avant d'atteindre la fibre. Par conséquent, le transfert de masse global des analytes sur la fibre est généralement limité par le taux de transfert de masse des composés entre la matrice et l'espace de tête. Les composés volatils sont présents en fortes concentrations dans l'espace de tête et sont donc plus rapidement extraits que les composés semi-volatils.

Par ailleurs, la température a un effet significatif sur la cinétique du processus en déterminant la pression de vapeur des analytes. Par ailleurs, la valeur de K_{fs} diminue avec l'augmentation de la température. Par conséquent, la sensibilité de la méthode diminue à l'équilibe. Etant donné que les coefficients de diffusion augmentent en cas d'une faible viscocité, l'augmentation de la témpérature entraine ainsi une extraction rapide (équation 4), mais une faible sensibilité de la méthode [80].

De même, le temps d'équilibre des composés volatils est plus court en cas d'extraction en espace de tête que par immersion directe sous des conditions d'agitation similaires. Ce résultat peut être expliqué par deux facteurs: (i) une partie de l'analyte se trouve au préalable dans l'espace de tête avant l'extraction, et (ii) les coefficients de diffusion dans la phase gazeuse sont typiquement de l'ordre 4-5 fois plus élevés que ceux dans les milieux liquides [2].

La cinétique d'adsorption des analytes de la matrice vers le film de la fibre peut être décrite par l'équation suivante (équation 5) :

$$n = [1 - \exp(-at)]\, ne = [1 - \exp(-at)] \times \left(\frac{KfsVsVf}{Kfs + Vs}\right) C_0 \quad \text{Equation (5)}$$

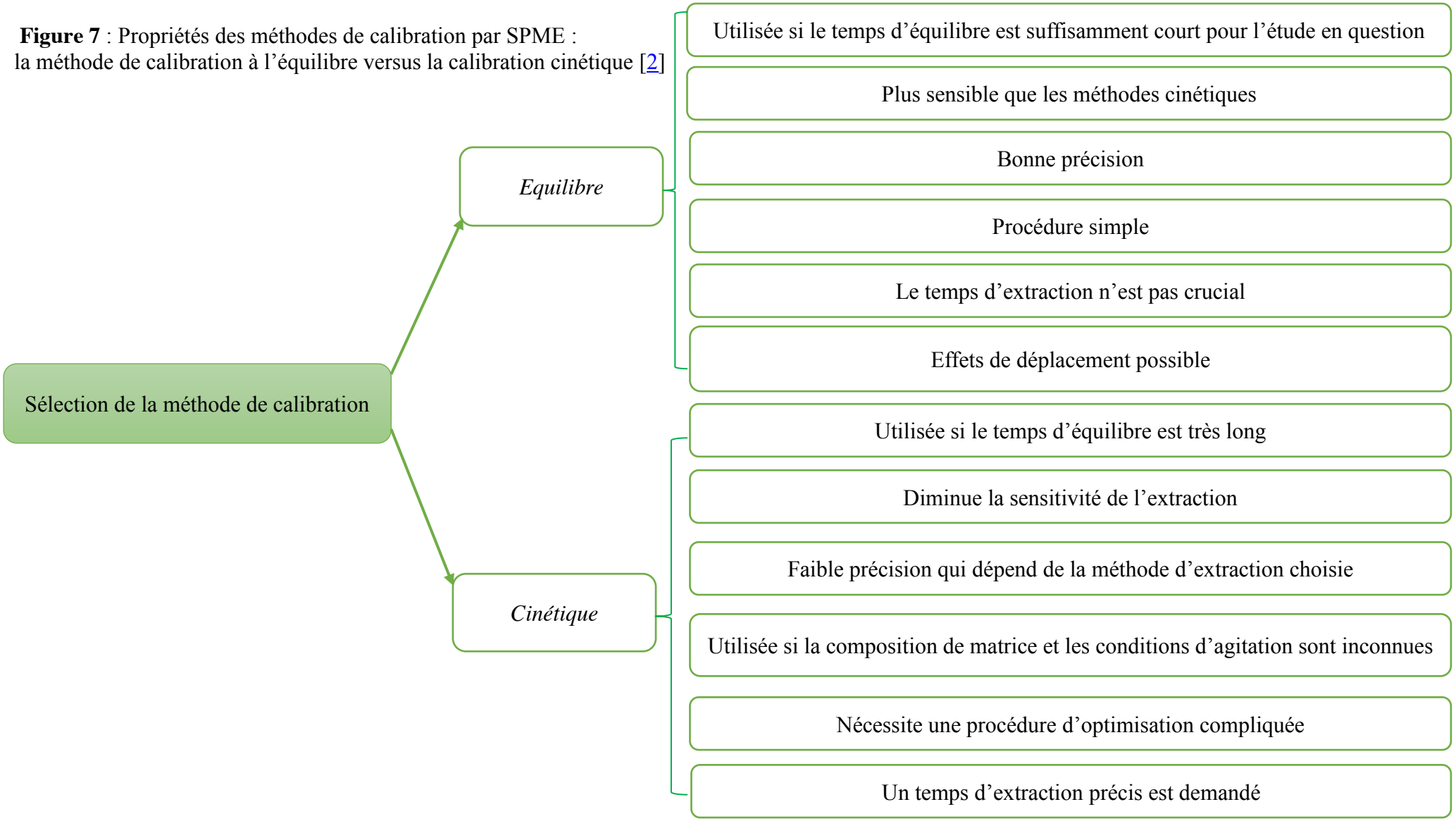
n est la quantité d'analyte extraite à un temps t, ne la quantité d'analyte extraite à l'équilibre, a est un débit constant qui dépend des volumes de la phase d'extraction et de l'échantillon, des coefficients de transfert de masse, des coefficients de distribution et de la surface de la phase d'extraction.

En effet, quand le temps d'extraction est extrêmement long pour que l'équilibre soit atteint, l'équation 5 se simplifie à l'équation 1, ce qui prouve que le modèle dynamique peut être appliqué pour le régime cinétique et le régime à l'équilibre (Figure 6).

III.1.3. Calibration de la SPME

La SPME est une technique d'extraction non exhaustive aux cours de laquelle seule une faible proportion de l'analyte est extraite de la matrice. Par conséquent, une méthode de calibration appropriée est indispensable pour assurer l'aspect quantitatif de l'extraction. Parmi les méthodes de calibration les plus utilisées pour l'extraction des métabolites volatils dans les matrices biologiques, on cite la calibration à l'équilibre et la calibration cinétique (Figure 7).
La méthode d'extraction à l'équilibre est une méthode de quantification largement utilisée au cours de laquelle les quantités d'analytes extraites sont proportionnelles aux concentrations dans la matrice, et sont indépendantes du volume de l'échantillon. Par conséquent, les concentrations des analytes peuvent être facilement déterminées à partir des quantités extraites sur la fibre à l'équilibre [2].

Figure 7 : Propriétés des méthodes de calibration par SPME : la méthode de calibration à l'équilibre versus la calibration cinétique [2]



III.2. Verrous analytique pour l'extraction du volatolome par SPME

Compte tenu des aspects thermodynamiques et cinétiques de l'extraction par SPME, de nombreux paramètres portant sur l'extraction et la préparation de l'échantillon doivent être adaptés pour une extraction efficace des composés volatils dans les matrices biologiques étudiées.

III.2.1. Conditions d'extraction

Les deux principaux paramètres qui peuvent influencer la richesse de l'extrait du foie en composés organiques volatils sont: (i) le type de la fibre qui influence la sélectivité des COVs extraits et (ii) le couple température/temps utilisé pendant l'extraction qui affecte la volatilité et la solubilité des COVs [83].

III.2.1.1.Type de fibre

Les propriétés physicochimiques du film de la fibre SPME influencent considérablement la sélectivité de l'extraction des COVs [84]. Plusieurs types de fibres commerciales sont disponibles, elles sont principalement constituées de polydiméthylsiloxane (PDMS) avec différentes épaisseurs de film (7, 30 and 100 µm), polyacrylate (PA), DVB-PDMS (polydimethylsiloxane-divinylbenzene), CAR-PDMS (carboxen / polydimethylosiloxane), CW-DVB (Carbowax/divinylbenzene) et la DVB/CAR/PDMS (divinylbenzene / carboxen / polydimethylsiloxane).
En effet, les analytes apolaires ont une forte affinité avec les fibres apolaires comme la PDMS qui représente souvent le premier choix en raison de la longue durée de vie de ce type de film. La PA est plus polaire et peut être utilisée pour l'extraction des composés polaires comme les phénols. Deux types de fibres sont largement utilisées pour l'extraction des métabolites volatils traceurs dans les matrices biologiques: (i) la CAR/PDMS qui a été utilisée pour l'extraction des COVs dans le foie [46], l'urine [52] et le sang [40,85], et (ii) la DVB/CAR/PDMS qui a été conçue pour élargir l'éventail des COVs extraits avec la CAR/PDMS [84,86].

III.2.1.2.Température/temps d'extraction

La composition de l'extrait de COVs dépend fortement de la combinaison température/temps choisie pour l'extraction, ces deux paramètres peuvent affecter la volatilité et la solubilité des COVs [83]. Silva *et al*. (2011) [52] ont démontré que l'augmentation de la température d'extraction de 50°C à 60°C entraine une augmentation des abondances des composés volatils extraits mais également leurs standards déviations.

En effet, l'augmentation de la température augmente la diffusion des COVs de la matrice vers l'espace de tête dynamique mais une extraction à haute température risque de provoquer l'oxydation et la dégradation des COVs dans les matrices biologiques. A l'équilibre, les coefficients de distribution des COVs entre la fibre et l'échantillon diminuent avec l'augmentation de la température, ce qui résulte à la diminution de la quantité d'analyte extraite [80]. Ainsi, une température proche de la température physiologique est en faveur de l'extraction des COVs dans les matrices biologiques.

Par ailleurs, le temps d'extraction n'influence pas l'efficacité de l'extraction si les conditions d'équilibre sont déjà établies. D'un autre côté, plusieurs études en métabolomique ont privilégié des temps d'extraction courts pour réduire les risques de dégradation des COVs au cours de l'extraction [53].

III.2.1.3.Agitation

Le temps d'équilibre diminue avec une agitation magnétique optimale de l'échantillon [80]. En effet, un taux d'agitation convenable doit être appliqué à l'échantillon en cas d'une extraction par espace de tête dynamique à cause de la viscosité élevée de la matrice qui induit de faibles coefficients de diffusions des analytes vers l'espace de tête [2].

III.2.2.Préparation des échantillons

En ce qui concerne la préparation de l'échatillon, deux approches qui traitent l'équilibre des composés volatils dans l'espace de tête avant leur adsorption sur la fibre et l'ajout de sel peuvent influencés la variabilité et la sensibilité de l'extraction.

III.2.2.1.Equilibre des COVs

L'extraction des COVs par SPME n'est considérée complète que si les concentrations des analytes entre la matrice et le film de la fibre atteignent l'équilibre. Tant que ce temps

nécessaire pour atteindre l'équilibre n'est pas écoulé, les quantités de COVs disponibles à l'adsorption sur la fibre varient au cours du temps, ceci pourrait induire une variabilité sur les quantités de COVs extraits [87]. D'un autre côté, l'équilibre matrice/fibre est étroitement dépendant de l'équilibre matrice/espace de tête. Dans cette logique, le temps de décongélation des échantillons a été désigné comme un paramètre qui peut influencer l'état d'équilibre des COVs entre la matrice et l'espace de tête. Ainsi, une décongélation des échantillons avant l'extraction semble être une étape indispensable qui peut inévitablement influencer la quantité des COVs extraits et aussi la variabilité analytique.

III.2.2.2. Ajout de sel

Dans le but de favoriser l'extraction des COVs, l'ajout de sel est très recommandé pour les analyses des matrices biologiques comme le plasma et les tissus contenant des composés polymériques [52]. En effet, l'ajout de sel entraine le changement des coefficients d'activité des COVs et favorise leur libération de la matrice par effet salting-out, ce qui augmente considérable la sensibilité d'extraction.

Cependant, l'ajout de sel solide pourrait ralentir le transfert massique des composés entre la matrice et l'espace de tête dynamique en raison de l'effet de viscosité du sel sur l'échantillon. Ceci pourrait empêcher l'état d'équilibre des COVs entre la matrice d'échantillon et le film fibreux, ce qui induira une plus grande variabilité d'extraction [88].

L'objectif est d'améliorer l'efficacité de la chaine analytique en modifiant les conditions de préparation de l'échantillon. Deux paramètres clés ont été étudiés: le temps d'équilibre et l'ajout de sels afin de favoriser l'extractabilité des composés volatils par effet salting-out.

III.3. Verrous du traitement des données volatolomiques

III.3.1. Identification des COVs

Les métabolites volatils peuvent être identifiés à travers la comparaison des spectres de masse expérimentaux avec les spectres de référence avec une similarité élevée (>80%). Par ailleurs, les indices de rétention, ou plus précisément les indices de Kovats, sont habituellement utilisés en GC fournissant plus de confiance aux informations sur la structure des métabolites.

La librairie de la GC contient des spectres EI-MS collectés durant plusieurs décennies et par

conséquent, de nombreuses bibliothèques contenant des milliers de spectres existent.
La création des bibliothèques EI-MS est facilitée grâce à la reproductibilité instrumentale et l'énergie électronique d'ionisation qui est standardisée à 70 eV.
Les plus grandes bibliothèques de spectres de masse sont disponibles chez Wiley (400 000 spectres) et l'Institut National des Normes et Technologie (NIST) (200 000 spectres) ainsi qu'une combinaison des deux avec des spectres supplémentaires chez Palisade (600 000 Spectres).
En outre, des bibliothèques publiques sont disponibles contenant des spectres de masse et des indices de rétention qui améliorent l'identification spectrale des composés volatils.
Par exemple, une base de données pour les analyses effectuées sur un quadripôle a été récemment crée dans le cadre du Golm Metabolome Database (GMD).
A l'issue de cette étape d'identification des COVs, les aires des pics chromatographiques des métabolites volatils identifiés sont intégrées et les résultats sont rassemblés dans une matrice globale qui représente les abondances des COVs dans les différents échantillons analysés.

III.3.2. Prétraitement des données volatolomiques

La fiabilité de la stratégie analytique appliquée depuis la préparation des échantillons jusqu'à l'analyse des données nécessite une attention particulière à chaque étape pour aboutir à une interprétation biologique correcte des données. En effet, les données métabolomiques se caractérisent généralement par leur distribution asymétrique, leur grande dispersion, et la contribution substantielle du bruit instrumental et analytique sur la variabilité biologique entre les groupes. Le prétraitement est parfois nécessaire pour modifier la distribution des données. Les méthodes de transformations peuvent conduire à une distribution normale des données et notamment à l'élimination de la variation dynamique des données [89,90].

III.3.2.1. Transformation des données

La transformation des données métabolomiques est parfois nécessaire pour modifier la distribution des données afin de les préparer aux analyses statistiques ultérieures.
Généralement, les données métabolomiques contiennent des variations d'origine biologique et des variations d'origine non-biologique provenant par exemple de l'échantillonnage, de la préparation de l'échantillon et des erreurs d'analyse.

Les mesures peuvent contenir de fortes fluctuations des abondances de certains métabolites malgré les conditions expérimentales identiques. Cette variation est appelée variation biologique non induite.

Par ailleurs, les données peuvent contenir des variations techniques provenant par exemple de l'échantillonnage, de la préparation de l'échantillon et des mesures analytiques [90].

Pour l'analyse des données, on suppose souvent que la variation totale non-induite est symétrique et de moyenne égale à zéro, avec des écarts-types égaux. Cependant, cette hypothèse d'homoscédasticité n'est généralement pas vraie. Par exemple, l'écart type dû à une variation biologique non-induite varie avec la valeur moyenne de la mesure, donnant lieu à une hétéroscédasticité, et il en résulte la présence d'une structure supplémentaire dans les données [90].

Les méthodes de prétraitement des données sont souvent utilisées pour conduire à une distribution normale des données ou à une réduction de la variation dynamique des données.

Plusieurs méthodes de prétraitement peuvent être appliquées sur les données métabolomiques comme, centering, autoscaling, pareto-scaling, range-scaling, vast-scaling, log transfromation, and power transformation. Chaque méthode de prétraitement souligne des aspects différents des données et se caractérise par ses propres mérites et inconvénients.

Le choix de la méthode de prétraitement dépend de la problématique biologique, des propriétés des données et de la méthode de traitement des données sélectionnée pour réveler les différences biologiques [90].

Le prétraitement par autoscaling permet de supprimer la dépendance des métabolites de leurs concentrations et des variations non-biologiques. La méthode autoscaling est largement appliquée, elle utilise l'écart type comme facteur de scaling. Après l'autoscaling, tous les métabolites ont un écart type égale à 1 et les données sont ainsi analysées en fonction des corrélations au lieu des covariances. La méthode de prétraitement par pareto-scaling est très similaire. Cependant, la racine carrée des écats types est utilisée comme facteur de scaling. Cette méthode réduit l'importance relative des valeurs élevées mais conserve la structure des données et reste plus fidèle aux mesures brutes plus que le traitement par autoscaling [90].

En ce qui concerne les analyses des données métabolomiques par les méthodes exploratoires comme l'Analyse en Composantes Principales (ACP), Van Den Berg *et al*. (2006) [90] ont démontré que le prétraitement par autoscaling abouti à des résultats biologiques pertinents.

III.3.2.2. Normalisation

En métabolomique, la variation des signaux non reliée aux différences biologiques peut être observée aussi bien dans le cas de l'analyse de dizaines que des milliers d'échantillons [91].
Ces sources de variation incluent les changements au niveau des volumes des échantillons au cours de la préparation, l'injection de l'échantillon et la performance de l'instrument (ionisation, transfert d'ions et efficacité du détecteur).
C'est dans ce contexte qu'intervient la normalisation des données visant à réduire ou éliminer ces variations sans intérêt des données et ainsi supprimer les biais analytiques sur les abondances des composés détectés dans les différents échantillons, tout en conservant les variations biologiques d'intérêt [91].
La normalisation peut être effectuée selon l'approche chimique en utilisant un étalon interne comme référence pour éliminer les variations. Des études antérieurs ont développé et utilisé une méthode de normalisation appelée la CCSC (Comprehensive Combinatory Standard Correction) pour corriger les dérives instrumentales des systèmes d'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Cette méthode consiste à analyser simultanément les échantillons avec un mélange de *n* standards et de normaliser l'abondance de chaque analyte par la somme des aires des standards sélectionnés parmi les possibles sommes *n* qui permet de discriminer au mieux les échantillons [92,93].
Les méthodes de normalisation qui ne sont pas basées sur des étalons internes utilisent souvent comme facteur de normalisation, la somme, la moyenne ou la médiane des réponses de tous les métabolites présent dans l'échantillon [94,95]. Ces approches sont nommées SNV (Standard Normal Variate), elles calculent les standards déviations du pool de toutes les variables dans chaque échantillon. Chaque échantillon est alors normalisé par cette valeur, en lui affectant un écart type égale à 1. Cependant, ces approches basées sur le calcul de la somme ou la moyenne peuvent introduire des corrélations artificielles pour un ou quelques métabolites dans le cas de grandes différences entre les groupes d'échantillons [96].
Parmi les approches alternatives, une méthode basée sur le calcul des ratios (Systematic Ratio Normalization, SRN) a été introduite par Lehallier *et al*. (2012) [97] pour normaliser les données collectées par la GC, elle consiste à (i) calculer pour chaque échantillon, les logs de tous les ratios des abondances des différents composés analysés et (ii) sélectionner les logs de ratios qui maximisent la discrimination entre les échantillons.

Par ailleurs, l'utilisation d'un échantillon combiné de tous les échantillons individuels (Quality Control, QC) s'est montrée très performante. En effet, un QC peut être utilisé pour calculer la répétabilité et la précision intermédiaire de tous les métabolites analysés dans les échantillons, mais aussi pour corriger la dérive du détecteur et notamment les variations de la réponse métabolomique dans les échantillons individuels [49].

Récemment, Filzmoser *et al*. (2014) [98] ont décrit le concept de la fermeture induite par la normalisation par la somme totale (Total Sum Normalization, TSN), et ont suggéré la normalisation par le quotient probabiliste (Probabilistic Quotient Normalisation - PQN) comme une méthode fiable pour corriger la variabilité incontrôlée.

Cette méthode est basée sur le calcul de la médiane des rapports des intensités des variables d'un individu sur les intensités des mêmes variables pour un échantillon de référence QC. Cette méthode de normalisation permet de réduire l'impact des variables ayant des variations d'intensités particulières sur toutes les autres variables [99]. La normalisation par PQN a déjà été largement appliquée avec succès pour corriger la variabilité instrumentale sur les données métabolomiques [100-103].

III.3.3. Traitement statistique

Les données métabolomiques étant générées en quantités importantes aussi bien sur le plan qualitatif que quantitatif, il est nécessaire de disposer d'outils mathématiques et statistiques performants pour extraire l'information pertinente. Le but de cette étape est de réduire la dimension des données acquises en filtrant l'ensemble des variables initialement détectées pour aboutir à un nombre réduit de variables portant l'information potentiellement pertinente.

La mise en place d'une matrice est le point de départ de la création d'un modèle statistique. Il devient utile de résumer et de visualiser une grande quantité de données, pour classer, discriminer et enfin trouver des relations quantitatives entre les variables avec la possibilité de prévoir également de nouveaux échantillons.

III.3.3.1. Analyses statistiques univariées

L'analyse statistique univariée a pour objectif de présélectionner des variables montrant des variations statistiquement significatives entre les groupes étudiés par comparaison à un seuil de significativité préalablement défini.

L'analyse de la variance (ANOVA : analysis of variance) est un test statistique permettant de tester si plusieurs échantillons sont issus d'une même population ou non.

Ce test s'applique lorsque l'on mesure une ou plusieurs variables explicatives catégorielles (appelées alors facteurs de variabilité) qui ont une influence sur la distribution d'une variable continue à expliquer.

La forme générale de l'analyse de variance repose sur le test de Fisher et donc sur la normalité des distributions et l'indépendance des échantillons.

L'hypothèse nulle à tester correspond au cas où les distributions de valeurs pour les différents niveaux des 'facteurs de variabilité' suivent une même loi normale (même moyenne et même variance). L'hypothèse alternative est qu'il existe au moins une des distributions dont la moyenne s'écarte des autres moyennes.

En effet, si la valeur calculée de *F* est supérieure au seuil de significativité choisi, on rejette l'hypothèse nulle et on conclut qu'il existe une différence statistiquement significative entre les distributions et que le facteur de variabilité sépare la population étudiée en groupes différentes.

La première étape de l'analyse de la variance consiste à comparer la variance totale sur l'ensemble des échantillons avec la variance due aux facteurs, avec la variance due à l'interaction entre les facteurs et avec la variance résiduelle aléatoire.

D'abord on calcule la variance totale par rapport à la moyenne globale de toutes les mesures, puis la variance inter-groupes (qui est liée aux différences dues aux facteurs). Par différence on obtient la variance intra-groupes (celle qui n'est pas liée aux facteurs). On calcule alors le rapport :

F = variance inter-groupes / variance intra-groupes.

L'analyse de variance permet simplement de répondre à la question de savoir si tous les échantillons suivent une même loi normale. Dans le cas où l'on rejette l'hypothèse nulle, cette analyse ne permet pas de savoir quels sont les échantillons qui s'écartent de cette loi.

Pour identifier les échantillons correspondants, on peut utiliser différents tests « post-hoc » (ou tests de comparaisons multiples).

Dans cette logique, l'application de l'ANOVA trouve son intérêt pour comparer les distributions des échantillons analysées selon différentes modalités pour un ou plusieurs facteurs qui peuvent influencer l'extraction.

D'un autre côté, l'analyse de la variance est une méthode largement utilisée pour révéler des

différences métabolomiques entre un groupe témoin et un groupe qui se caractérise par un traitement particulier ou une pathologie [46,52].

En revanche, pour le traitement des tableaux complexes de données, réunissant de nombreuses variables et souvent de typologie diverse, les méthodes statistiques univariées ne conviennent plus. Une nouvelle approche de traitement et d'interprétation doit être envisagée.

Les analyses multivariées trouvent leur intérêt pour la compréhension des tableaux de grandes dimensions (plusieurs dizaines ou centaines, voire milliers, de lignes et/ou de colonnes) que les traitements statistiques classiques ne peuvent interpréter de façon globale.

III.3.3.2. Analyses statistiques multivariées

Les outils chimiométriques multivariées sont les mieux adaptées pour organiser, extraire et interpréter l'information dans les matrices de données complexes.

Dans de la plupart des analyses métabolomiques, le but final est d'obtenir une liste plausible de métabolites ou de biomarqueurs qui expliquent les phénomènes étudiés. Les analyses multivariées permettent de considérer simultanément l'ensemble des données et d'établir des relations entre les variables, et aussi entre les individus et les variables. Ces méthodes d'analyse sont classées en deux catégories : les méthodes d'analyse non-supervisées et supervisées.

Le traitement des données avec les méthodes non-supervisées ne tiennent pas compte des informations sur les classes des échantillons ou les relations entre eux ; la similitude entre les profils des échantillons est donc déterminée sans orientation des calculs par des connaissances sur les groupes ou l'identité des échantillons. Par contre, dans le cas des méthodes supervisées, l'information sur la classe des échantillons ou sur les relations entre eux est fournie afin d'orienter la rechercher des variables reliées aux différences à étudier. Ces méthodes sont à la base de la construction de modèle de prédiction.

Dans la plupart des études métabolomiques, les méthodes de traitement supervisées (PLS-DA, OPLS-DA,…) [45,104-108] sont généralement appliquées pour identifier les marqueurs en orientant l'extraction des différences par les informations sur les groupes. Cependant, il n'existe aucune étude qui compare la performance des outils chimiométriques exploratoires (non-supervisées) pour révéler des différences dans le volatolome en réponse à une pathologie ou à une exposition aux micropolluants. C'est dans cette optique que s'insère la partie suivante de ce travail de thèse où trois méthodes chimiométriques exploratoires (non-supervisées) seront comparées. Il s'agit de l'Analyse en Composantes Principales (ACP),

l'Analyse en Composantes Indépendantes, et une nouvelle variante de l'Analyse en Composantes Communes et Poids Spécifiques (ComDim) que nous appelons Analyse en Composantes Communes (ACC).

III.3.3.2.1. Analyse en Composantes Principales (ACP)

L'analyse en Composantes Principales (ACP) est un grand classique de l'analyse des données multivariées pour l'étude exploratoire d'une matrice de données. Le principe de cette méthode, qui est commun à presque toutes les méthodes multivariées, est de considérer les individus comme des points dans un espace défini par des variables de la matrice de départ et que les coordonnées d'un individu dans cet espace sont données par ses valeurs pour chacune de ces variables.

L'ACP cherche à trouver les directions de la plus grande dispersion des individus qui sont les directions contenant le plus de variance dans les données. Le principe consiste à remplacer les variables initiales par de nouvelles variables qui sont les combinaisons linéaires des variables d'origine et qui représentent la variance maximale. Ces nouvelles variables, appelées Composantes Principales (PC), définissent des plans factoriels qui servent de base à la projection des variables initiales.

Mathématiquement, l'ACP calcule des combinaisons linéaires des variables de départ donnant de nouveaux axes qui représentent la plus grande partie de la variabilité totale de la matrice de données [109] et qui correspondent aux directions de plus grandes dispersions des individus. Cette méthode non-supervisée émet simplement l'hypothèse que les directions de plus grandes dispersions (Composantes Principales) des échantillons sont les directions les plus intéressantes et que les nouveaux axes associés révèlent l'information contenue dans la matrice de départ.

La décomposition matricielle de l'ACP en k Composantes Principales (PC) permet d'obtenir les coordonnées factorielles (ou «Scores») et les contributions factorielles (ou «Loadings»), selon l'équation **(1)** :

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \times \mathbf{P}^{\mathrm{T}} + \mathbf{E}$$

avec $\mathbf{X}$ (n, p) la matrice initiale, $\mathbf{T}$ (n, k) les scores des individus sur les Composantes Principales, $\mathbf{P}^{\mathrm{T}}$ (k, p) les Loadings des variables, et $\mathbf{E}$ (n, p) est la matrice des écarts ou résidus entre les valeurs originales et la somme des k PCs.

Les premières PCs contenant la plus grande partie de la variance sont d'habitude les plus intéressantes. Tout ce qui n'est pas important pour la description des données se trouve alors dans la matrice des résidus.

En pratique, les PCs ne représentent pas forcément des entités ou phénomènes physico-chimiques réelles présentes dans les données, mais simplement des directions orthogonales de plus grande variabilité.

La quantité de variance contenue dans chaque PC est proportionnelle à sa valeur propre («eigenvalue») donnée dans la matrice diagonale **S** (k, k), calculée par

$$\mathbf{S} = \mathbf{T}^{\mathbf{T}}.\mathbf{T}.$$

Ainsi, la projection des scores renseigne sur les répartitions des individus, la présence de groupes ou d'individus aberrants. Tandis que la projection des loadings souligne les variables qui contribuent à la répartition des individus sur les PCs.

Cette méthode permet d'explorer la structure de n individus avec un nombre élevé p de variables quantitatives. Ainsi, l'analyse propose, à partir d'une matrice contenant p variables pour n individus ($n \times p$), des représentations géométriques de ces individus et de ces variables.

Les représentations des individus sur des plans de 2 PCs permettent de visualiser les relations entre les individus. Chacun de ces plans factoriels est caractérisé par un pourcentage de la variance extraite par les 2 PCs.

Dans le cas de notre étude, l'ACP est appliquée sur la matrice initiale formée par les abondances de p variables correspondants aux composés volatils extraits dans les n échantillons, dans l'espoir de voir la projection des coordonnées factorielles faire ressortir des différences de réponse volatolomique entre les groupes exposés et non-exposés. Par ailleurs, les contributions factorielles des COVs pour chaque PC sont tracées pour visualiser les COVs qui influencent le plus la répartition selon chaque PC.

III.3.3.2.2. Analyse en Composantes Indépendantes (ACI)

L'analyse en Composantes Indépendantes (ACI) est une méthode non-supervisée de séparation de signaux sources qui repose sur l'idée que chaque ligne de la matrice initiale est en fait un signal observé, constitué d'une somme pondérée de signaux sources purs, où les poids sont proportionnels à la contribution de chaque signal source dans ce mélange particulier [110].

ICA tente de récupérer ces sources inconnues ainsi que les proportions inconnues

correspondantes, en appliquant une transformation linéaire qui maximise l'indépendance statistique entre les signaux sources extraits.

Plusieurs hypothèses soulignent l'utilisation d'ICA :

(1) Les variations d'un signal source ne devraient pas être liées aux variations d'un autre signal source. Ainsi, en calculant les variables latentes indépendantes, la détermination des signaux sources est possible.

(2) Etant donné que les signaux sources ont une distribution d'intensités qui n'est pas aléatoire, leur structure ne correspond pas à une distribution gaussienne. Par contre, le théorème central limite (Central Limit Theorem) dit que la somme des signaux indépendants tende à suivre une distribution gaussienne, même si les distributions des signaux individuels ne sont pas gaussiennes.

Les Composantes Indépendantes (ICs) sont des combinaisons linéaires des variables initiales dont la distribution est aussi non-gaussienne que possible, ce qui maximise leur indépendance mutuelle.

Supposons trois mélanges x_1, x_2 et x_3 formés par des combinaisons linéaires de deux signaux sources s_1 et s_2. Ces mélanges linéaires peuvent être notés comme suit :

$x_1 = a_{11}\, s_1 + a_{12}\, s_2$

$x_2 = a_{21}\, s_1 + a_{22}\, s_2$

$x_3 = a_{31}\, s_1 + a_{32}\, s_2$

avec $\begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \\ a_{31} & a_{32} \end{bmatrix}$

$\begin{bmatrix} s_1 \\ s_2 \end{bmatrix}$ $\begin{bmatrix} s_{11}\ s_{12} \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots s_{1p} \\ s_{21}\ s_{22} \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots s_{2p} \end{bmatrix}$

où **S** est la matrice des signaux sources (ICs) et **A** la matrice de leurs proportions dans les signaux observés.

En métabolomique, un signal observé peut correspondre à un spectre de masse d'un mélange de métabolites, ACI peut être utilisée pour extraire les spectres sources des métabolites et la proportion du signal de chaque métabolite dans le mélange.

III.3.3.2.3. Analyse en Composantes Communes (ACC)

L'Analyse en Composante Communes et Poids Spécifiques (Common Components and Specific Weights Analysis, CCSWA ou ComDim) est basée sur une analyse de tableaux multiples et a été développée et utilisée principalement en analyses sensorielles [111].
ComDim cherche à trouver des dimensions orthogonales communes à plusieurs matrices de données obtenues pour les mêmes échantillons.
Le principe de l'algorithme est de calculer une somme pondérée de la matrice de produit scalaire ($X\ X^T$) des échantillons pour chaque tableau et d'extraire la première composante comme la première dimension commune. Les composantes communes (CCs) sont extraites itérativement de façon à ce qu'elles représentent la variance maximale commune au plus grand nombre de tableaux. Les coordonnées factorielles de chaque échantillon (Scores) et les contributions des variables de départ à chacune des CCs (Loadings) sont ainsi calculées. On peut aussi examiner l'importance de chaque tableau initial (Salience) sur chaque CC.
L'algorithme de ComDim est présenté dans la Figure 8:
Pour deux blocs de données centrés et normés, **X1** et **X2**, l'algorithme de ComDim calcule une somme pondérée, $\mathbf{W_G}$, des matrices de produits scalaires des échantillons, $\mathbf{W_i}$, en utilisant une pondération initiale égale à 1 pour tous les tableaux. Le vecteur des Scores de la première composante principale est extrait de $\mathbf{W_G}$ comme une estimation initiale de la première "Composante commune" (CC). La pondération (poids spécifique ou Salience, λ_i), de chaque bloc $\mathbf{W_i}$ est ensuite recalculée à partir de ces scores. L'estimation des Scores globaux et des saliences est optimisée par un calcul itératif jusqu'à la convergence. Après le calcul de la première CC, chaque matrice originale $\mathbf{X_i}$ est déflatée et la procédure est répétée pour le calcul de la seconde CC, et ainsi de suite.

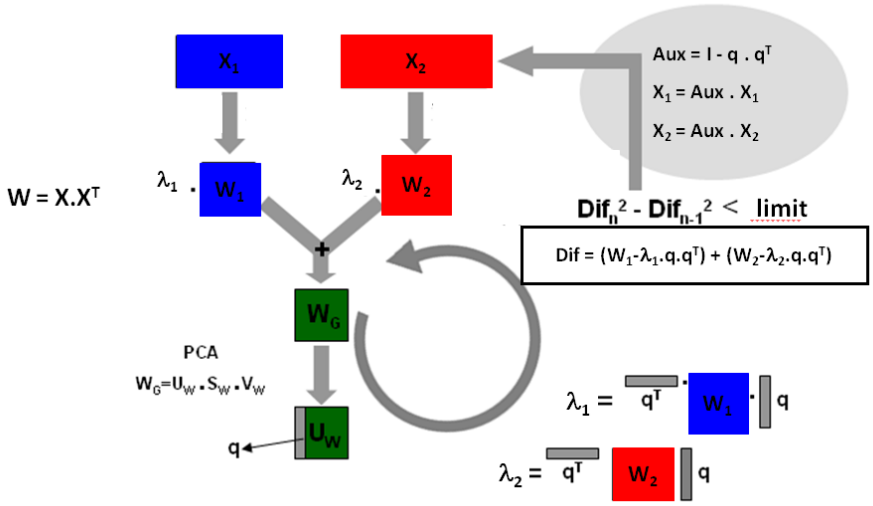


Figure 8 : Description de l'algorithme de ComDim [112]

Depuis peu, ComDim commence à être largement utilisée pour l'extraction de l'information à partir d'une matrice unique en traitant chaque variable comme un tableau individuel [113]. Pour distinguer cette nouvelle extension de l'approche initiale ComDim, on propose de l'appeler ici Analyse en Composantes Communes (ACC). ACC estime une série de composantes communes orthogonales qui sont une combinaison linéaire des variables avec une forte contribution et un effet similaire sur la dispersion des échantillons. Ceci permet de cerner les variables qui contribuent de la même façon en fonction des différences entre les échantillons.

REFERENCES

[1] Engel, E., Ratel, J., Bouhlel, J., Planche, C., Meurillon, M., Novel approaches to improving the chemical safety of the meat chain towards toxicants. Meat Sci. 2015, 109, 75-85.
[2] Ouyang, G.F., Vuckovic, D., Pawliszyn, J., Nondestructive Sampling of Living Systems Using in Vivo Solid-Phase Microextraction. Chem. Rev. 2011, 111(4), 2784-2814.
[3] Gaud Dervilly-Pinel, T.G., Brice Minvielle, Angélique Travel, Jérôme Normand,, Marie Bourin, E.R., Estelle Dubreil, Sophie Mompelat, Frédéric Hommet, Marina Nicolas,, Vincent Hort, C.I., Mailie Saint-Hilaire, Claude Chafey, Julien Parinet,, Ronan Cariou, P.M., Bruno Le Bizec, Eric Verdon, Erwan Engel, Micropollutants and chemical residues in organic and conventional meat. Food Chem. 2017, 232, 218-228.
[4] Li, J.L., Jiang, C.Y., Li, S., Xu, S.W., Cadmium induced hepatotoxicity in chickens (Gallus domesticus) and ameliorative effect by selenium. Ecotox. Environ. Safe. 2013, 96, 103-109.
[5] Digiulio, R.T., Scanlon, P.F., SUBLETHAL EFFECTS OF CADMIUM INGESTION ON MALLARD DUCKS. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1984, 13(6), 765-771
[6] Bernard, A., Renal dysfunction induced by cadmium: biomarkers of critical effects. Biometals 2004, 17(5), 519-523.
[7] De Vos, S., Maervoet, J., Schepens, P., De Schrijver, R., Polychlorinated biphenyls in broiler diets: their digestibility and incorporation in body tissues. Chemosphere 2003, 51(1), 7-11.
[8] Fernandes, A., Mortimer, D., Rose, M., Gem, M., Dioxins (PCDD/Fs) and PCBs in offal: Occurrence and dietary exposure. Chemosphere 2010, 81(4), 536-540.
[9] Donoho, A.L., BIOCHEMICAL-STUDIES ON THE FATE OF MONENSIN IN ANIMALS AND IN THE ENVIRONMENT. J. Anim. Sci. 1984, 58(6), 1528-1539.
[10] Demarco, C.F., Schwegler, E., Brauner, C.C., Ferri, E., Halfen, J., Florio, G., Florio, D., Pedroso, C.E.D., Goncalves, F.M., Correa, M.N., Monensin Controlled-release Capsules do not Change Performance and Metabolic Profile in Unchallenged Beef Cattle. Acta Sci. Vet. 2014, 42.
[11] Bogialli, S., Capitolino, V., Curini, R., Di Corcia, A., Nazzari, M., Sergi, M., Simple and rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for determining amoxicillin and ampicillin in bovine tissues and milk. J. Agric. Food Chem. 2004, 52(11), 3286-3291.
[12] Zhao, M., Xie, K.Z., Guo, H.S., Li, A.H., Xie, X., Zhang, G.X., Dai, G.J., Wang, J.Y., Residue depletion of ampicillin in eggs. J. Vet. Pharmacol. Ther. 2015, 38(5), 508-512.
[13] MacLachlan, D.J., Transfer of fat-soluble pesticides from contaminated feed to poultry tissues and eggs. Br. Poult. Sci. 2008, 49(3), 290-298.
[14] Chandra, N., Jain, N.K., Sondhia, S., Srivastava, A.B., Deltamethrin Induced Toxicity and Ameliorative Effect of Alpha-Tocopherol in Broilers. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2013, 90(6), 673-678.
[15] Kumar, A., Sasmal, D., Bhaskar, A., Mukhopadhyay, K., Thakur, A., Sharma, N., Deltamethrin-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Caspase-Dependent Signaling Pathways in Murine Splenocytes. Environ. Toxicol. 2016, 31(7), 808-819.
[16] Zucchini-Pascal, N., de Sousa, G., Rahmani, R., Lindane and cell death: At the crossroads between apoptosis, necrosis and autophagy. Toxicology 2009, 256(1-2), 32-41.
[17] Xue, M.A., Shen, G.F., Yu, J.L., Zhang, D.Y., Lu, Z.J., Wang, B., Lu, Y., Cao, J., Tao, S., Dynamic changes of alpha-hexachlorocyclohexane and its enantiomers in various tissues of Japanese Rabbits (Oyctolagus cuniculus) after oral or dermal exposure. Chemosphere 2010, 81(11), 1486-1491.
[18] Pathak, R., Mustafa, M.D., Ahmed, T., Ahmed, R.S., Tripathi, A.K., Guleria, K., Banerjee, B.D., Intra uterine growth retardation: Association with organochlorine pesticide residue levels and oxidative stress markers. Reprod. Toxicol. 2011, 31(4), 534-539.
[19] El-Dein, E.M.K., Anees, L.M., Aly, S.M.E., Effects of alpha-Lipoic Acid on gamma-Radiation and Lindane-Induced Heart Toxicity in Rats. Pak. J. Zool. 2016, 48(5), 1523-1529.
[20] Cheng, Y.H., Ding, S.T., Chang, M.H., Effect of fumonisins on macrophage immune functions and gene expression of cytokines in broilers. Arch. Anim. Nutr. 2006, 60(4), 267-276.

[21] Zhu, Y., Hassan, Y.I., Watts, C., Zhou, T., Innovative technologies for the mitigation of mycotoxins in animal feed and ingredients—A review of recent patents. Animal Feed Science and Technology 2016, 216, 19-29.
[22] Tardieu, D., Bailly, J.D., Benlashehr, I., Auby, A., Jouglar, J.Y., Guerre, P., Tissue persistence of fumonisin B1 in ducks and after exposure to a diet containing the maximum European tolerance for fumonisins in avian feeds. Chem.-Biol. Interact. 2009, 182(2-3), 239-244.
[23] Wang, X., Wu, Q.H., Wan, D., Liu, Q.Y., Chen, D.M., Liu, Z.L., Martinez-Larranaga, M.R., Martinez, M.A., Anadon, A., Yuan, Z.H., Fumonisins: oxidative stress-mediated toxicity and metabolism in vivo and in vitro. Arch. Toxicol. 2016, 90(1), 81-101.
[24] Tardieu, D., Bailly, J.D., Skiba, F., Grosjean, F., Guerre, P., Toxicokinetics of fumonisin B1 in Turkey poults and tissue persistence after exposure to a diet containing the maximum European tolerance for fumonisins in avian feeds. Food Chem. Toxicol. 2008, 46(9), 3213-3218.
[25] Gajecka, M., Slawuta, P., Nicpon, J., Kolacz, R., Kielbowicz, Z., Zielonka, L., Dabrowski, M., Szweda, W., Gajecki, M., Nicpon, J., Zearalenone and its metabolites in the tissues of female wild boars exposed per os to mycotoxins. Toxicon 2016, 114, 1-12.
[26] He, M., Li, Y., Pi, F., Ji, J., He, X., Zhang, Y., Sun, X., A novel detoxifying agent: Using rice husk carriers to immobilize zearalenone-degrading enzyme from Aspergillus niger FS10. Food Control 2016, 68, 271-279.
[27] Sangsila, A., Faucet-Marquis, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Itsaranuwat, P., Detoxification of zearalenone by Lactobacillus pentosus strains. Food Control 2016, 62, 187-192.
[28] Eveillard, A., Lasserre, F., de Tayrac, M., Polizzi, A., Claus, S., Canlet, C., Mselli-Lakhal, L., Gotardi, G., Paris, A., Guillou, H., Martin, P.G.P., Pineau, T., Identification of potential mechanisms of toxicity after di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) adult exposure in the liver using a systems biology approach. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2009, 236(3), 282-292.
[29] Madalinski, G., Godat, E., Alves, S., Lesage, D., Genin, E., Levi, P., Labarre, J., Tabet, J.C., Ezan, E., Junot, C., Direct introduction of biological samples into a LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer as a tool for fast metabolome analysis. Anal. Chem. 2008, 80(9), 3291-3303.
[30] Andree, S., Jira, W., Schwind, K.H., Wagner, H., Schwagele, F., Chemical safety of meat and meat products. Meat Sci. 2010, 86(1), 38-48.
[31] Focant, J.F., Dioxin food crises and new POPs: challenges in analysis. Anal. Bioanal. Chem. 2012, 403(10), 2797-2800.
[32] Ibanez, C., Valdes, A., Garcia-Canas, V., Simo, C., Celebier, M., Rocamora-Reverte, L., Gomez-Martinez, A., Herrero, M., Castro-Puyana, M., Segura-Carretero, A., Ibanez, E., Ferragut, J.A., Cifuentes, A., Global Foodomics strategy to investigate the health benefits of dietary constituents. J. Chromatogr. A 2012, 1248, 139-153.
[33] Herrero, M., Simo, C., Garcia-Canas, V., Ibanez, E., Cifuentes, A., Foodomics: MS-based strategies in modern food science and nutrition. Mass Spectrom. Rev. 2012, 31(1), 49-69.
[34] Marrachelli, V.G., Rentero, P., Mansego, M.L., Morales, J.M., Galan, I., Pardo-Tendero, M., Martinez, F., Martin-Escudero, J.C., Briongos, L., Chaves, F.J., Redon, J., Monleon, D., Genomic and Metabolomic Profile Associated to Clustering of Cardio-Metabolic Risk Factors. PLoS One 2016, 11(9).
[35] Duhoux, A., Carrere, S., Gouzy, J., Bonin, L., Delye, C., RNA-Seq analysis of rye-grass transcriptomic response to an herbicide inhibiting acetolactate-synthase identifies transcripts linked to non-target-site-based resistance. Plant Mol.Biol. 2015, 87(4-5), 473-487.
[36] Liu, X.J., Zhu, W.C., Su, Y.B., Guo, C., Zeng, Z.H., Zhu, H., Li, H., Peng, X.X., Characterization of ampicillin-stressed proteomics and development of a direct method for detecting drug-binding proteins in Edwardsiella tarda. J. Proteomics 2015, 116, 97-105.
[37] Rhee, E.P., Gerszten, R.E., Metabolomics and Cardiovascular Biomarker Discovery. Clin. Chem. 2012, 58(1), 139-147
[38] Dettmer, K., Aronov, P.A., Hammock, B.D., Mass spectrometry-based metabolomics. Mass Spectrom. Rev. 2007, 26(1), 51-78.
[39] Watkins, S.M., German, J.B., Toward the implementation of metabolomic assessments of human health and nutrition. Curr. Opin. Biotechnol. 2002, 13(5), 512-516.

[40] Liu, H.J., Wang, H., Li, C.X., Wang, L.C., Pan, Z.F., Wang, L.L., Investigation of volatile organic metabolites in lung cancer pleural effusions by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. J. Chromatogr. B 2014, 945, 53-59.
[41] Griffin, J.L., The Cinderella story of metabolic profiling: does metabolomics get to go to the functional genomics ball? Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci. 2006, 361(1465), 147-161.
[42] Saitoh, W., Yamauchi, S., Watanabe, K., Takasaki, W., Mori, K., Metabolomic analysis of arginine metabolism in acute hepatic injury in rats. J. Toxicol. Sci. 2014, 39(1), 41-50.
[43] Tulipani, S., Palau-Rodriguez, M., Alonso, A.M., Cardona, F., Marco-Ramell, A., Zonja, B., de Alda, M.L., Munoz-Garach, A., Sanchez-Pla, A., Tinahones, F.J., Andres-Lacueva, C., Biomarkers of Morbid Obesity and Prediabetes by Metabolomic Profiling of Human Discordant Phenotypes. Clinica Chimica Acta 2016, 463, 53-61.
[44] Zhang, H.W., Fu, P., Ke, B.L., Wang, S.P., Li, M., Han, L., Peng, C.C., Zhang, W.D., Liu, R.H., Metabolomic analysis of biochemical changes in the plasma and urine of collagen-induced arthritis in rats after treatment with Huang-Lian-Jie-Du-Tang. J. Ethnopharmacol. 2014, 154(1), 55-64.
[45] O'Kane, A.A., Chevglier, O.P., Graham, S.F., Elliott, C.T., Mooney, M.H., Metabolomic Profiling of In Vivo Plasma Responses to Dioxin-Associated Dietary Contaminant Exposure in Rats: Implications for Identification of Sources of Animal and Human Exposure. Environ. Sci. Technol. 2013, 47(10), 5409-5418.
[46] Berge, P., Ratel, J., Fournier, A., Jondreville, C., Feidt, C., Roudaut, B., Le Bizec, B., Engel, E., Use of Volatile Compound Metabolic Signatures in Poultry Liver to Back-Trace Dietary Exposure to Rapidly Metabolized Xenobiotics. Environ. Sci. Technol. 2011, 45(15), 6584-6591.
[47] Anton, A.P., Ferreira, A.M.C., Pinto, C.G., Cordero, B.M., Pavon, J.L.P., Headspace generation coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the automated determination and quantification of endogenous compounds in urine. Aldehydes as possible markers of oxidative stress. J. Chromatogr. A 2014, 1367, 9-15.
[48] Spichiger, M., Muhlbauer, R.C., Brenneisen, R., Determination of menthol in plasma and urine of rats and humans by headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. B 2004, 799(1), 111-117.
[49] Koek, M.M., Jellema, R.H., van der Greef, J., Tas, A.C., Hankemeier, T., Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. Metabolomics 2011, 7(3), 307-328.
[50] Michell, A.W., Mosedale, D., Grainger, D.J., Barker, R.A., Metabolomic analysis of urine and serum in Parkinson's disease. Metabolomics 2008, 4(3), 191-201.
[51] Lokhov, P.G., Dashtiev, M.I., Moshkovskii, S.A., Archakov, A.I., Metabolite profiling of blood plasma of patients with prostate cancer. Metabolomics 2010, 6(1), 156-163.
[52] Silva, C.L., Passos, M., Camara, J.S., Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry. Br. J. Cancer 2011, 105(12), 1894-1904.
[53] Vuckovic, D., Pawliszyn, J., Systematic Evaluation of Solid-Phase Microextraction Coatings for Untargeted Metabolomic Profiling of Biological Fluids by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Anal. Chem. 2011, 83(6), 1944-1954.
[54] Abaffy, T., Moller, M.G., Riemer, D.D., Milikowski, C., DeFazio, R.A., Comparative analysis of volatile metabolomics signals from melanoma and benign skin: a pilot study. Metabolomics 2013, 9(5), 998-1008.
[55] Mochalski, P., Unterkofler, K., Teschl, G., Amann, A., Potential of volatile organic compounds as markers of entrapped humans for use in urban search-and-rescue operations. Trac-Trends Anal. Chem. 2015, 68, 88-106.
[56] Hakim, M., Broza, Y.Y., Barash, O., Peled, N., Phillips, M., Amann, A., Haick, H., Volatile Organic Compounds of Lung Cancer and Possible Biochemical Pathways. Chem. Rev. 2012, 112(11), 5949-5966.
[57] Calenic, B., Miricescu, D., Greabu, M., Kuznetsov, A.V., Troppmair, J., Ruzsanyi, V., Amann, A., Oxidative stress and volatile organic compounds: interplay in pulmonary, cardio-vascular, digestive tract systems and cancer. Open Chem. 2015, 13(1), 1020-1030.

[58] Miekisch, W., Schubert, J.K., Noeldge-Schomburg, G.F.E., Diagnostic potential of breath analysis - focus on volatile organic compounds. Clinica Chimica Acta 2004, 347(1-2), 25-39.
[59] Khalid, T., Aggio, R., White, P., Costello, B., Persad, R., Al-Kateb, H., Jones, P., Probert, C.S., Ratcliffe, N., Urinary Volatile Organic Compounds for the Detection of Prostate Cancer. PLoS One 2015, 10(11).
[60] Bojko, B., Reyes-Garcés, N., Bessonneau, V., Goryński, K., Mousavi, F., Souza Silva, E.A., Pawliszyn, J., Solid-phase microextraction in metabolomics. TrAC Trends in Analytical Chemistry 2014, 61(0), 168-180.
[61] Peralbo-Molina, A., Calderon-Santiago, M., Priego-Capote, F., Jurado-Gamez, B., de Castro, M.D.L., Development of a method for metabolomic analysis of human exhaled breath condensate by gas chromatography-mass spectrometry in high resolution mode. Anal. Chim. Acta 2015, 887, 118-126.
[62] Li, N., Deng, C.H., Yin, X.Y., Yao, N., Shen, X.Z., Zhang, X.M., Gas chromatography-mass spectrometric analysis of hexanal and heptanal in human blood by headspace single-drop microextraction with droplet derivatization. Anal. Biochem. 2005, 342(2), 318-326.
[63] Bianchin, J.N., Nardini, G., Merib, J., Dias, A.N., Martendal, E., Carasek, E., Screening of volatile compounds in honey using a new sampling strategy combining multiple extraction temperatures in a single assay by HS-SPME-GC-MS. Food Chem. 2014, 145, 1061-1065.
[64] Giardina, M., Olesik, S.V., Application of low-temperature glassy carbon-coated macrofibers for solid-phase microextraction analysis of simulated breath volatiles. Anal. Chem. 2003, 75(7), 1604-1614.
[65] Arthur, C.L., Pawliszyn, J., SOLID-PHASE MICROEXTRACTION WITH THERMAL-DESORPTION USING FUSED-SILICA OPTICAL FIBERS. Anal. Chem. 1990, 62(19), 2145-2148.
[66] Ouyang, G., Chen, Y., Setkova, L., Pawliszyn, J., Calibration of solid-phase microextraction for quantitative analysis by gas chromatography. J. Chromatogr. A 2005, 1097(1-2), 9-16.
[67] Song, G., Qin, T., Liu, H., Xu, G.B., Pan, Y.Y., Xiong, F.X., Gu, K.S., Sun, G.P., Chen, Z.D., Quantitative breath analysis of volatile organic compounds of lung cancer patients. Lung Cancer 2010, 67(2), 227-231.
[68] Wang, S., Oakes, K.D., Bragg, L.M., Pawliszyn, J., Dixon, G., Servos, M.R., Validation and use of in vivo solid phase micro-extraction (SPME) for the detection of emerging contaminants in fish. Chemosphere 2011, 85(9), 1472-1480.
[69] Karaconji, I.B., Zimic, L., Brajenovic, N., Skender, L., Optimisation of a solid-phase microextraction method for the analysis of nicotine in hair. J. Sep. Sci. 2011, 34(19), 2726-2731.
[70] Brunton, N.P., Cronin, D.A., Monahan, F.J., Durcan, R., A comparison of solid-phase microextraction (SPME) fibres for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. Food Chem. 2000, 68(3), 339-345.
[71] Costa, R., Tedone, L., De Grazia, S., Dugo, P., Mondello, L., Multiple headspace-solid-phase microextraction: An application to quantification of mushroom volatiles. Anal. Chim. Acta 2013, 770, 1-6.
[72] Ghiasvand, A.R., Setkova, L., Pawliszyn, J., Determination of flavour profile in Iranian fragrant rice samples using cold-fibre SPME-GC-TOF-MS. Flavour Frag. J. 2007, 22(5), 377-391.
[73] Greene, J.L., Sanders, T.H., Drake, M.A., Characterization of volatile compounds contributing to naturally occurring fruity fermented flavor in peanuts. J. Agric. Food Chem. 2008, 56(17), 8096-8102.
[74] Kataoka, H., Saito, K., Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. J. Pharm. Biomed. Anal. 2011, 54(5), 926-950.
[75] Jiang, R.F., Cudjoe, E., Bojko, B., Abaffy, T., Pawliszyn, J., A non-invasive method for in vivo skin volatile compounds sampling. Anal. Chim. Acta 2013, 804, 111-119.
[76] Dixon, E., Clubb, C., Pittman, S., Ammann, L., Rasheed, Z., Kazmi, N., Keshavarzian, A., Gillevet, P., Rangwala, H., Couch, R.D., Solid-Phase Microextraction and the Human Fecal VOC Metabolome. PLoS One 2011, 6(4).
[77] Bojko, B., Cudjoe, E., Wasowicz, M., Pawliszyn, J., Solid-phase microextraction. How far are we from clinical practice? Trac-Trends Anal. Chem. 2011, 30(9), 1505-1512.

[78] Musteata, F.M., Pawliszyn, J., Bioanalytical applications of solid-phase microextraction. Trac-Trends Anal. Chem. 2007, 26(1), 36-45.
[79] Risticevic, S., Chen, Y., Kudlejova, L., Vatinno, R., Baltensperger, B., Stuff, J.R., Hein, D., Pawliszyn, J., Protocol for the development of automated high-throughput SPME-GC methods for the analysis of volatile and semivolatile constituents in wine samples. Nat. Protoc. 2010, 5(1), 162-176.
[80] Ulrich, S., Solid-phase microextraction in biomedical analysis. J. Chromatogr. A 2000, 902(1), 167-194.
[81] Theodoridis, G., Koster, E.H.M., de Jong, G.J., Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. J. Chromatogr. B 2000, 745(1), 49-82.
[82] Ouyang, G., Pawliszyn, J., A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction. Anal. Chim. Acta 2008, 627(2), 184-197.
[83] R. Perestrelo, A.S. Barros, S.M. Rocha, J.S. Camara, Talanta 85 (2011) 1483.
[84] Risticevic, S., Pawliszyn, J., Solid-Phase Microextraction in Targeted and Nontargeted Analysis: Displacement and Desorption Effects. Anal. Chem. 2013, 85(19), 8987-8995.
[85] Deng, C.H., Zhang, X.M., Li, N., Investigation of volatile biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. B 2004, 808(2), 269-277.
[86] Gianelli, M.P., Flores, M., Toldra, F., Optimisation of solid phase microextraction (SPME) for the analysis of volatile compounds in dry-cured ham. Journal of the Science of Food and Agriculture 2002, 82(14), 1703-1709.
[87] Bojko, B., Cudjoe, E., Gomez-Rios, G.A., Gorynski, K., Jiang, R.F., Reyes-Garces, N., Risticevic, S., Silva, E.A.S., Togunde, O., Vuckovic, D., Pawliszyn, J., SPME - Quo vadis? Anal. Chim. Acta 2012, 750, 132-151.
[88] Liu, Y.Z., Muralidhara, S., Bruckner, J.V., Bartlett, M.G., Optimization, validation and application of a method for the determination of trichloroethylene in rat plasma by headspace solid-phase microextraction gas chromatography mass spectrometry. Biomed. Chromatogr. 2008, 22(9), 977-984.
[89] Smilde, A.K., van der Werf, M.J., Bijlsma, S., van der Werff-van-der Vat, B.J.C., Jellema, R.H., Fusion of mass spectrometry-based metabolomics data. Anal. Chem. 2005, 77(20), 6729-6736.
[90] van den Berg, R.A., Hoefsloot, H.C.J., Westerhuis, J.A., Smilde, A.K., van der Werf, M.J., Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. BMC Genomics 2006, 7.
[91] Di Guida, R., Engel, J., Allwood, J.W., Weber, R.J.M., Jones, M.R., Sommer, U., Viant, M.R., Dunn, W.B., Non-targeted UHPLC-MS metabolomic data processing methods: a comparative investigation of normalisation, missing value imputation, transformation and scaling. Metabolomics 2016, 12(5).
[92] Deport, C., Ratel, J., Berdague, J.L., Engel, E., Comprehensive combinatory standard correction: A calibration method for handling instrumental drifts of gas chromatography-mass spectrometry systems. J. Chromatogr. A 2006, 1116(1-2), 248-258.
[93] Engel, E., Ratel, J., Correction of the data generated by mass spectrometry analyses of biological tissues: Application to food authentication. J. Chromatogr. A 2007, 1154(1-2), 331-341.
[94] Martucci, M.E.P., De Vos, R.C.H., Carollo, C.A., Gobbo-Neto, L., Metabolomics as a Potential Chemotaxonomical Tool: Application in the Genus Vernonia Schreb. PLoS One 2014, 9(4).
[95] Martucci, M.E.P., De Vos, R.C.H., Carollo, C.A., Gobbo-Neto, L., Metabolomics as a Potential Chemotaxonomical Tool: Application in the Genus Vernonia Schreb. PLoS One 2014, 9(4).
[96] Amal, H., Leja, M., Funka, K., Lasina, I., Skapars, R., Sivins, A., Ancans, G., Kikuste, I., Vanags, A., Tolmanis, I., Kirsners, A., Kupcinskas, L., Haick, H., Breath testing as potential colorectal cancer screening tool. Int. J. Cancer 2016, 138(1), 229-236.
[97] Lehallier, B., Ratel, J., Hanafi, M., Engel, E., Systematic ratio normalization of gas chromatography signals for biological sample discrimination and biomarker discovery. Anal Chim Acta 2012, 733, 16-22.
[98] Filzmoser, P., Walczak, B., What can go wrong at the data normalization step for identification of biomarkers? J. Chromatogr. A 2014, 1362, 194-205.

[99] Dieterle, F., Ross, A., Schlotterbeck, G., Senn, H., Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in H-1 NMR metabonomics. Anal. Chem. 2006, 78(13), 4281-4290.
[100] Hrydziuszko, O., Viant, M.R., Missing values in mass spectrometry based metabolomics: an undervalued step in the data processing pipeline. Metabolomics 2012, 8(1), S161-S174.
[101] Davies, S.K., Ang, J.E., Revell, V.L., Holmes, B., Mann, A., Robertson, F.P., Cui, N., Middleton, B., Ackermann, K., Kayser, M., Thumser, A.E., Raynaud, F.I., Skene, D.J., Effect of sleep deprivation on the human metabolome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2014, 111(29), 10761-10766.
[102] Cottet, K., Genta-Jouve, G., Fromentin, Y., Odonne, G., Duplais, C., Laprevote, O., Michel, S., Lallemand, M.C., Comparative LC-MS-based metabolite profiling of the ancient tropical rainforest tree Symphonia globulifera. Phytochemistry 2014, 108, 102-108.
[103] Gagnebin, Y., Tonoli, D., Lescuyer, P., Ponte, B., de Seigneux, S., Martin, P.Y., Schappler, J., Boccard, J., Rudaz, S., Metabolornic analysis of urine samples by UHPLC-QTOF-MS: Impact of normalization strategies. Anal. Chim. Acta 2017, 955, 27-35.
[104] Barri, T., Dragsted, L.O., UPLC-ESI-QTOF/MS and multivariate data analysis for blood plasma and serum metabolomics: Effect of experimental artefacts and anticoagulant. Anal. Chim. Acta 2013, 768, 118-128.
[105] Boccard, J., Rutledge, D.N., A consensus orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) strategy for multiblock Omics data fusion. Anal. Chim. Acta 2013, 769, 30-39.
[106] Cozzolino, R., De Magistris, L., Saggese, P., Stocchero, M., Martignetti, A., Di Stasio, M., Malorni, A., Marotta, R., Boscaino, F., Malorni, L., Use of solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for determination of urinary volatile organic compounds in autistic children compared with healthy controls. Anal. Bioanal. Chem. 2014, 406(19), 4649-4662.
[107] Das, M.K., Bishwal, S.C., Das, A., Dabral, D., Varshney, A., Badireddy, V.K., Nanda, R., Investigation of Gender-Specific Exhaled Breath Volatome in Humans by GCxGC-TOF-MS. Anal. Chem. 2014, 86(2), 1229-1237.
[108] Liu, H.J., Li, C.X., Wang, H., Huang, Z.P., Zhang, P.P., Pan, Z.F., Wang, L.L., Characterization of Volatile Organic Metabolites in Lung Cancer Pleural Effusions by SPME-GC/MS Combined with an Untargeted Metabolomic Method. Chromatographia 2014, 77(19-20), 1379-1386.
[109] Wold, S., Esbensen, K., Geladi, P., PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS. Chemometrics Intell. Lab. Syst. 1987, 2(1-3), 37-52.
[110] Rutledge, D.N., Bouveresse, D.J.R., Independent Components Analysis with the JADE algorithm. Trac-Trends Anal. Chem. 2013, 50, 22-32.
[111] E.M. Qannari, I.Wakeling, P. Courcoux, H.J.H. MacFie, Defining the underlying sensory dimensions, Food Qual. Prefer. 11 (2000) 151–154.
[112] Climaco Pinto, R. Development of new chemometric methods - application to the spectroscopic characterisation of food quality. AgroParisTech, 2009.
[113] Dubin, E., Spiteri, M., Dumas, A.S., Ginet, J., Lees, M., Rutledge, D.N., Common components and specific weights analysis: A tool for metabolomic data pre-processing. Chemometrics Intell. Lab. Syst. 2016, 150, 41-50.

Organisation de la thèse

Cette synthèse bibliographique met en lumière les familles chimiques clés de micropolluants retrouvés dans la chaine de production de viande en détaillant tout particulièrement les micropolluants étudiés dans le cadre de ce travail de thèse. Cette synthèse montre ensuite l'intérêt de la volatolomique pour rechercher des marqueurs de l'exposition animale aux différents micropolluants en proposant des mécanismes explicatifs aux changements de composition en COVs de certains tissus et fluides. Le troisième volet de ce chapitre présente enfin les verrous analytiques que ce travail devra lever pour exploiter au mieux l'information utile du volatolome.

Cette synthèse présente les critères qui nous mènent à l'organisation de ce travail de thèse portant sur l'application de la volatolomique dans le foie, le plasma et les tissus adipeux à la recherche de marqueurs d'exposition d'animaux à différents types de micropolluants.

Le chapitre 1 porte sur mise au point méthodologique des paramètres d'extraction par SPME du volatolome hépatique. Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'un article publié dans '*Journal of Chromatography A'* (Article 1), et de la méthode chimiométrique la plus performante pour le traitement des données volatolomiques. Ce travail est présenté dans un article publié dans '*Talanta*' (Article 2).

Le chapitre 2 a porté sur l'application de la volatolomique dans le foie pour rechercher des marqueurs d'exposition d'animaux aux micropolluants. Ce travail a fait l'objet d'un article soumis au journal '*Chemosphere*' (Article 3).

Dans le chapitre 3, on s'est intéressé à la recherche de marqueurs volatils dans le plasma et les tissus adipeux pour révéler l'exposition d'animaux aux différents micropolluants. Ce travail a fait l'objet d'un article préparé pour une soumission au journal '*Metabolomics'* (Article 4).

Chapitre II. Mise au point méthodologique

Comme souligné dans la partie bibliographique, la microextraction en phase solide (SPME) est une méthode particulièrement performante pour l'extraction des composés volatils (COVs) contenus dans les matrices biologiques. Cependant, les paramètres d'extraction doivent être adaptés selon la nature de la matrice et l'objectif de l'étude mise en œuvre [1].

A notre connaissance, les seuls travaux ayant porté sur l'utilisation du volatolome d'échantillons biologiques pour révéler une exposition d'animaux d'élevage à des micropolluants sont ceux de Berge *et al*. (2011) [2]. Dans cette étude preuve de concept, l'analyse par SPME-GC-MS du volatolome du foie d'animaux exposés ou non via leur alimentation à des contaminants chimiques avait permis *in fine* de révéler certaines expositions à risque. Toutefois, les auteurs de ce travail ne mentionnaient pas d'étape préliminaire de mise au point des paramètres SPME utilisés pour extraire les composés volatils du foie et aucune étude récente ne rapporte de tels développements. Compte tenu de l'importance démontrée par la littérature sur la détermination des conditions d'extraction SPME, il semblait indispensable d'évaluer et si nécessaire d'améliorer celles mises en œuvre par Berge *et al*. (2011) [2] pour l'analyse du volatolome du foie. C'est l'objectif des développements méthodologiques qui sont présentés dans **l'article 1** intitulé « Solid-phase microextraction set-up for the analysis of liver volatolome to detect livestock exposure to micropollutants », et publié dans *Journal of Chromatography A*.

Après avoir déterminé les conditions d'analyse du volatolome du foie, le traitement des données volatolomiques générées est une autre étape clé pour exploiter au maximum le potentiel informatif contenu dans ces données. La plupart des travaux métabolomiques s'appuient sur une comparaison de la composition d'échantillons biologiques issus d'un groupe témoin et d'un groupe qui se distingue par une pathologie ou une contamination chimique. Le plus souvent cette comparaison est fondée sur les résultats d'une analyse de la variance (ANOVA) qui permet de cribler les variables pertinentes suivie d'une analyse factorielle non supervisée comme l'Analyse en Composantes Principales qui permet de faire émerger d'éventuelles différences volatolomiques entre les échantillons « cas » et « témoin » [3,4]. Similairement, Berge *et al*. (2011) [2] ont ainsi révélé des différences entre les empreintes volatolomiques de foies d'animaux témoins et celles de foies d'animaux exposés à un type de micropolluant en réalisant

des ACP entre le groupe témoin et le groupe exposé suivant les fragments de masses *m/z* des composés volatils préalablement filtrés par ANOVA.

En revanche, les méthodes de la statistique uni- ou bi-variée ne sont pas adaptées au traitement des tableaux complexes de données, réunissant de nombreuses variables et souvent de typologies diverses. De plus, ces méthodes classiques ne permettent pas d'étudier les interactions entre plusieurs facteurs ni de clarifier l'influence des variables entre plusieurs groupes étudiés simultanément. Ainsi, une nouvelle approche de traitement doit être envisagée pour une meilleure interprétation des données. Dans ce contexte, les analyses multivariées trouvent tout leur intérêt pour la compréhension des tableaux de grande dimensions (plusieurs dizaines ou centaines de lignes et de colonnes) que les traitements statistiques classiques ne peuvent interpréter de façon globale.

Une nouvelle génération de méthodes chimiométriques multivariées exploratoires sont en émergence et de plus en plus utilisées pour traiter les données « omiques », il s'agit des outils d'analyses multi-blocs. Ces méthodes s'adaptent plus au traitement des données complexes, et permettent de mieux tenir en compte des interactions entre les différentes variables et les différents groupes.

Dans le but de déterminer la méthode chimiométrique la plus performante pour traiter les données volatolomiques, la deuxième partie de ce chapitre avait pour objectif de comparer différentes stratégies chimiométriques non-supervisées pour révéler des différences dans le volatolome de foies d'animaux exposés ou non à différentes familles de micropolluants et pour identifier les composés volatils marqueurs associés à chaque type d'exposition : l'Analyse en Composantes Principales (ACP), l'Analyse en Composantes Indépendantes (ACI) et l'Analyse en Composantes Communes (ACC). Ce travail est présenté dans **l'article 2** intitulé « Comparison of Common Components Analysis with Principal Components Analysis and Independent Components Analysis: Application to SPME-GC-MS Volatolomic Signatures », et publié au journal '*Talanta*'.

Partie 1. Détermination des paramètres SPME pour l'extraction du volatolome dans le foie. Article 1

L'ambition de la première partie du travail méthodologique était d'évaluer et le cas échéant d'améliorer les conditions d'extraction par SPME adoptées par Berge *et al*. (2011) [2] dans leur étude « preuve de concept » afin d'obtenir un extrait en COVs le plus représentatif possible, en utilisant notamment une température d'extraction plus proche des conditions physiologiques des animaux, tout en minimisant la variabilité analytique et en maximisant les rendements d'extraction. La première étape du travail consistait à moduler à la fois les conditions d'extraction SPME et la préparation des échantillons de foie. La représentativité d'un extrait SPME peut être influencée par deux paramètres clés : (i) la nature de la fibre SPME utilisée qui influence la sélectivité de l'extraction des COVs extraits et (ii) le couple temps/température adopté qui affecte la volatilité et la solubilité des COVs. En prenant comme conditions de référence le barème temps/température de 30 min / 60°C utilisé par Berge *et al*. (2011) [2] , nous avons cherché à évaluer à la fois l'impact d'une diminution de la température d'extraction (à 40°C), qui nous rapprocherait des conditions physiologiques les plus souvent rencontrées pour les animaux d'élevage (37°C-43°C), et l'incidence d'une réduction du temps d'extraction (à 15 min), qui permettrait de réduire le temps d'analyse et ainsi d'augmenter les cadences analytiques. Concernant les conditions de préparation des échantillons de foie, deux paramètres ont été étudiés dans le but de minimiser la variabilité analytique et de maximiser la sensibilité de l'extraction des COVs : le temps de décongélation des échantillons avant l'analyse qui peut influencer l'état d'équilibre des COVs entre la matrice et l'espace de tête dynamique[5], et l'ajout d'un sel à l'échantillon avant son analyse qui piège les molécules d'eau disponibles dans l'échantillon et diminuent ainsi la solubilité des COVs dans la matrice favorisant ainsi leur libération par effet 'salting out '[3]. La pertinence du protocole SPME révisé sera évaluée par rapport à l'ancien protocole utilisé par Berge *et al*. (2011) en termes des abondances et des coefficients de variations d'une liste de 22 marqueurs candidats qui ont été identifiés dans la littérature comme des marqueurs potentiels de plusieurs types de pathologies.

La deuxième étape de ce travail méthodologique a consisté à évaluer l'apport de ces développements de l'extraction SPME des COVs de la matrice foie pour la recherche de marqueurs volatils d'exposition des animaux d'élevage à des micropolluants.

Pour cela, la méthode d'extraction développée a été couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse (SPME-GC-MS) pour analyser le volatolome de foies de poulets exposés ou non à un pesticide, la déltaméthrine ; une famille de micropolluants environnementaux, les polychlorobiphényles (PCB) ; et un anticoccidien, le monensin.

Cette étude est présentée dans ***l'article 1*** intitulé « Solid-phase microextraction set-up for the analysis of liver volatolome to detect livestock exposure to micropollutants », et publié dans *Journal of Chromatography A*.

Solid-phase microextraction set-up for the analysis of liver volatolome to detect livestock exposure to micropollutants

Jihéne Bouhlel[a,b], Jérémy Ratel[a], Said Abouelkaram[a], Frédéric Mercier[a], Angelique Travel[c], Elisabeth Baéza[d], Catherine Jondreville[d], Gaud Dervilly-Pinel[e], Philippe Marchand[e], Bruno Le Bizec[e,] Eric Verdon[f], Estelle Dubreil[f], Sophie Mompelat[f], Chanthadary Inthavong[g], Thierry Guérin[g], Douglas N. Rutledge[b], Erwan Engel[a*]

[a] *INRA, UR370 QuaPA, MASS laboratory, Saint-Genès-Champanelle, France*
[b] *INRA, UMR GENIAL, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Massy, France*
[c] *INRA, ITAVI, Centre de Tours, Nouzilly, France*
[d] *INRA, URA83, Nouzilly, France*
[e] *Oniris, LABERCA, Nantes, France*
[f] *ANSES, Reference laboratory for veterinary drug residues in food, Fougères, France*
[g] *ANSES, Laboratory for Food Safety, Maisons-Alfort, France*

*Corresponding author: *E-mail: erwan.engel@inra.fr; Phone: +33 (0)4 73 62 45 89.*

ABSTRACT

Starting from a critical analysis of a first "proof of concept" study on the utility of the liver volatolome for detecting livestock exposure to environmental micropollutants (Berge *et al*., 2011), the primary aim of this paper is to improve extraction conditions so as to obtain more representative extracts by using an extraction temperature closer to livestock physiological conditions while minimizing analytical variability and maximizing Volatile Organic Compound (VOC) abundancies.
Levers related to extraction conditions and sample preparation were assessed in the light of both abundance and coefficient of variation of 22 candidate VOC markers identified in earlier volatolomic studies. Starting with a CAR/PDMS fiber and a 30 minutes extraction, the reduction of SPME temperature to 40°C resulted in a significant decrease in the area of 14 candidate VOC markers ($p<0.05$), mainly carbonyls and alcohols but also a reduction in the coefficient of variation for 17 of them. In order to restore VOC abundances and to minimize variability, two approaches dealing with sample preparation were investigated. By increasing sample defrosting time at 4 °C from 0 to 24 h yielded higher abundances and lower variabilities for 15 and 13 compounds, respectively. Lastly, by using additives favouring the release of VOCs (1.2 g of NaCl) the sensitivity of the analysis was improved with a significant increase in VOC abundances of more than 50% for 13 out of the 22 candidate markers. The modified SPME parameters significantly enhanced the abundances while decreasing the analytical variability for most candidate VOC markers. The second step was to validate the ability of the revised SPME protocol to discriminate intentionally contaminated broiler chickens from controls, under case / control animal testing conditions. After verification of the contamination levels of the animals by national reference laboratories, data analysis by a multivariate chemometric method (Common Components and Specific Weights Analysis - ComDim) showed that the liver volatolome could reveal dietary exposure of broilers to a group of environmental pollutants (PCBs), a veterinary treatment (monensin), and a pesticide (deltamethrin), thus confirming the usefulness of this analytical set-up.

Keywords: SPME, Volatolomics, Liver, Micropollutants, Common components and Specific Weight analysis

1. Introduction

The exposure of livestock to xenobiotics through the environment or feed is a major cause of their presence in derived meat products [1], where they may constitute a risk to human health [2]. Mounting evidence suggests that chronic exposure to chemical contaminants may be a cause of many health disorders [3,4]. The analytical methods implemented to test for these contaminants in food are most often based on those used by national reference laboratories that target specifical contaminant residues in foods or tissues. However, these strategies are too costly for the rapid batch-to-batch quality control monitoring required to ensure food safety in the production chain [5]. Promising new approaches have therefore been proposed to identify markers of exposure to micropollutants in livestock.

Among them are toxicogenomic approaches which consist in analysing the different genomic, transcriptomic, proteomic and metabolomic profiles of the tissues and fluids of livestock exposed to toxic substances in order to detect markers of contamination. Several recent studies have shown the particular utility of volatile organic compounds (VOCs) for detecting health disorders [6-8] and exposure of livestock to contaminants [9]. As attested by most of the recent work in volatolomics, solid-phase microextraction (SPME) is usually chosen for its performance and convenience [10,11]. This method, devised by Pawliszyn in 1989, is based on pre-concentrating VOCs on a fiber made from a silica film, which forms the stationary phase onto which the VOCs are adsorbed [12]. SPME is well-adapted to the qualitative identification of heterogeneous, complex mixtures and offers many advantages in terms of sensitivity, rapidity, ready automation, ease of use, and minimal sample handling before analysis thus limiting artefacts [13]. However, there is no general SPME procedure applicable to the extraction of VOCs from all biological matrices, whence the importance of adjusting extraction parameters to ensure the maximum efficiency of the SPME according to the matrix and the purpose of the analysis [14].

A first study conducted by Berge *et al*. [9] demonstrated the utility of the hepatic volatolome for detecting the exposure of livestock to several environmental micropollutants. In their paper, the extraction temperature of VOCs was set at 60 °C. However, since the physiological temperature of livestock animals ranges from 37°C to 43°C [15], an extraction temperature set as high as 60°C may generate a representativity bias in the pattern of extracted VOCs.

According to earlier works investigating food VOCs [16-18], a decrease of the extraction temperature from 60°C to 35 or 40°C may indeed limit the generation of thermally-induced VOCs that may be considered as analytical artefacts. However, a decrease in the peak height of less thermo-sensitive VOCs is generally to be expected when the extraction temperature is decreased from 60 to 40°C [16], which can adversely affect the SPME extraction of these compounds and finally the sensitivity of the SPME-GC-MS method.

Two levers dealing with sample defrosting time and salt addition may compensate for these expected lower abundances while minimizing the extraction variability. In Berge *et al*. [9], liver samples stored at -80°C were placed at 4°C on the autosampler for immediate extraction. Several papers suggest that thawing time may be a key issue to consider prior to SPME analysis [19,20]. Extraction of the volatolome by SPME cannot be considered satisfactory unless the partitioning of the analytes between sample matrix and fiber film reaches a steady state, and the overall mass transfer to the fiber is typically limited by mass transfer rates from the sample to the headspace [21]. Since extraction temperature is to be set close to physiological temperature at 40°C, a longer time may be needed to reach equilibrium state of VOCs, which could reduce the analytical variability of the SPME procedure as implemented by Berge *et al*. (2011). As well, the sensitivity for the detection of certain trace constituents of the volatolome might be improved by increasing the abundances of liver VOCs through the addition of salting out agents to the sample to be extracted by SPME [22,23]. Several studies have shown that adding salt, in particular NaCl [24] and Na_2SO_4 [25], to the sample may be useful. Other studies demonstrated a linear relationship between salt concentration and increase in analyte abundances, up to NaCl saturation [22]. Thus, maintaining a constant ionic strength in the samples by adding a saturated salt solution is crucial to achieving higher and reproducible analyte extractions.

The present work is devoted to improving the SPME protocol proposed by Berge *et al*. [9] so as to obtain more representative extracts by using an extraction temperature closer to the livestock physiological conditions (40°C) while minimizing analytical variability and maximizing VOC abundances. The first part of the paper aims to set up a revised SPME protocol by adjusting extraction conditions and sample preparation. The suitability of the SPME protocol will be assessed using a chicken liver sample in terms of both abundances and the coefficients of variation of 22 VOC candidate markers identified in earlier volatolomic studies.

In the second part, the applicability of the SPME-GC-MS method will be evaluated on a set of liver samples from control chickens, and chickens intentionally fed with diets contaminated by micropollutants potentially found in the meat chain, to reveal markers of livestock exposure to different types of contaminants. The micropollutants under study were : (i) a pesticide, deltamethrin; (ii) a group of environmental contaminants, polychlorobiphenyls (PCBs); and (iii) a coccidiostatic agent, monensin. A multivariate chemometric method named Common Components and Specific Weights Analysis (ComDim) [26] was applied to compare volatolomic signatures in livers of chickens exposed and unexposed to deltamethrin, PCBs, and monensin in order to detect differences that could be associated with the type of contaminant exposure.

2. Experimental section

2.1. Liver samples

Animal experimentation was conducted from 5/11/2013 to 28/01/2014 in PEAT at INRA of Nouzilly (France; Accreditation C37-175-1, delivered on 28/08/2012). Experimentation was evaluated by ethics committee n°19 of Val de Loire and authorized under reference 01012.01 according to rural articles (R. 214-78 and R. 214-126). In this animal test, chickens have been exposed or not to dietary micropollutants. Forty-four male chickens (*Gallus gallus*) (JA 657, Boyé Accouvage, La Boissière-en-Gâtine, France) were raised together until 28 days of age. They were then distributed into four groups, one control group (n=17 chickens) and three other groups each exposed to a diet contaminated with one type of micropollutant (n=9 chickens). The chickens were fed in individual cages for 8 weeks (28–84 days of age) with control or contaminated feed. The feed given to the chickens was a granulated mixture of commercial feed with 5% sunflower oil with or without added micropollutant. The amount of feed distributed each day was the same for all chickens and followed the breeder recommendations. Three contaminants were chosen for their different behaviour in the environment and the body: (i) deltamethrin, known for its persistence and bioaccumulation in animal tissues [27]; (ii) a mixture of PCBs (Arochlor 1260), known for their toxicity and their potential for bioaccumulation in animal products [28]; and (iii) sodium monensin, a coccidiostat authorized as a feed additive by European Commission Regulations.

Table 1 presents the concentrations of contaminants in the feed chosen to be at the maximum levels fixed by the regulations in poultry feed and sufficient to induce a response in the metabolism of exposed livestock. At age 84 days, all the chickens were slaughtered, after fasting for 12 h, by electronarcosis followed by bleeding according to European recommendation standard conditions. Two livers from the control group were dedicated to setting up the SPME parameters for the analysis of liver volatolome, while the rest of the livers were used to validate the SPME extraction protocol for the detection in liver volatolome of candidate markers of livestock exposure to micropollutants. After slaughter, the liver samples were prepared according to Berge *et al*. (2011) [9]. Briefly, livers were immediately excised from the chicken carcasses, immersed in liquid nitrogen, wrapped in aluminium foil, vacuum packed, and stored at −80 °C. Each liver tissue was ground for 3 min under liquid nitrogen using a homemade stainless steel ball mill to obtain a fine homogeneous powder. Powdered liver (1.2 g) was aliquoted into 20 ml SPME vials capped under nitrogen gas flow. The powdered liver samples were stored at −80 °C prior to subsequent analysis.

Table 1
Analysis of micropollutants in feed and tissue samples of control and contaminated chickens: Maximum levels and administered levels of deltamethrin, PCBs and monensin in chickens' feed and muscles.

Contaminant	EU Regulation	ML[b] in feed	Dose dded in feed	Concentrations in feed		Concentrations in muscles	
				Contaminated	*Control*	*Contaminated*	*Control*
Deltamethrin	No 524/2011	2 mg/kg	9 mg/kg	5.6 mg/kg	<LOD[c]	< LOD	<LOD
NDL[a]-PCBs	No 277/2012	10 µg/kg	10 µg/kg	8.2 µg/kg	0.11	49±13 µg/kg lw[d]	4.7±2.1 µg/kg lw
Monensin	No 124/2009	125 mg/kg	125 mg/kg	114 mg/kg	<LOD	1.13±0.4 µg/kg fm[e]	<LOD

[a] NDL: Non Dioxin Like
[b] ML: Maximum levels
[c] LOD: Limit of detection
[d] lw: Lipid weight
[e] fm: Fresh muscle tissue

2.2. Volatolome SPME extraction

Volatolome SPME extraction was performed with a multipurpose sampler (AOC-5000, Shimadzu, Kyoto, Japan) running the following sequence: (i) preheating of the 20 ml vials

containing each liver sample in the stirrer (500 rpm) at controlled temperature, (ii) trapping of VOCs with a SPME fiber, and (iii) desorption of VOCs into the GC inlet.
For setting up the SPME extraction protocol, the parameters liable to impact the representativity, the variability and the efficiency of the VOC extraction were first evaluated from abundances and standard deviations of 22 targeted volatile compounds in liver samples of control chickens. These compounds, which are listed in Table S1 (Supporting information), have already been identified in the literature as candidate VOC markers of metabolic stress or crucial pathologies.

Extraction conditions. In order to ensure a representative extraction of VOCs from the liver, the effect of using an extraction temperature closer to physiological conditions was studied. Two types of fiber were tested for sampling VOCs in liver tissue: 75 µm CAR/PDMS (carboxen / polydimethylosiloxane) and 50/30 µm DVB/CAR/PDMS (divinylbenzene / carboxen / polydimethylsiloxane). Two extraction temperatures (40 °C and 60 °C) and two extraction durations (15 and 30 min) under stirring (500 rpm) were tested with a preheating step of 10 min at the extraction temperature.

Sample preparation conditions. In order to minimize variability and to enhance VOC extraction, two sample preparation approaches were investigated.

Defrosting samples. Because of its strong influence on the equilibrium state of VOCs in the headspace and therefore analytical variability, the effect of defrosting time was studied. Liver samples stored at −80 °C were directly placed on a support cooled to 4°C for SPME-GC-MS analysis or defrosted at 4 °C for 8 h or 24 h before analysis.

Salt addition. To enhance VOC abundances, the effect of adding a salt to the liver powder was studied. Two different salts were tested: sodium chloride (NaCl) [24] and anhydrous sodium sulphate (Na_2SO_4) [25]. A mass of 1.2 g of NaCl prepared in saturated solution, or 1.2 g of powdered anhydrous Na_2SO_4 was added to 1.2 g of powdered liver before defrosting samples for 24 h at 4 °C.

Comparison of the proposed SPME parameters vs. the Berge et al. *(2011) protocol*. For benchmarking the Berge *et al*. [9] set up and the revised SPME set-up, control liver samples were analysed according to these two set-ups.

For all samples, VOCs were extracted with CAR/PDMS fiber from 1.2 g of liver. For the Berge *et al*. set-up, liver samples stored at -80°C were directly placed on a support cooled to 4°C for SPME-GC-MS analysis and VOCs were extracted at 60 °C for 30 min, whereas for the SPME conditions set up in this study, 1.2 g of NaCl prepared in saturated solution was added to powdered liver before defrosting the samples for 24 h at 4 °C and VOCs were extracted at 40 °C for 30 min.

2.3. Volatolome GC-MS analysis

After SPME extraction, VOCs were analysed with a Shimadzu QP2010+ GC-MS system equipped with an Rxi-5SilMS column (60 m × 0.32 mm × 1 µm) (Restek, Bellefonte, PA). Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1 $ml.min^{-1}$. Injection was performed in splitless mode (2 min). The column temperature program was as follows: 40 °C for 5 min, ramp of 3 °C/min to 230 °C, and temperature hold for 10 min. For the MS system, the temperatures of the transfer line, quadrupole, and ionisation source were 230, 200 and 150 °C, respectively. Positive ion electron impact mass spectra at 70 eV were recorded in scan mode over the range m/z = 33–250 amu at 10 scans s^{-1}. Tentative identification of VOCs was performed on the basis of mass spectra, by comparison with the NIST/EPA/NIH mass spectral library (NIST14), and of retention indices (RI), by comparison with published RI values and with those of our in-house database. Peak areas of the volatile compounds were integrated with a home-made automatic algorithm developed under Matlab R2014b (The MathWorks, Natick, USA). For each compound, the algorithm uses the retention time and a mass fragment selected for both being specific of the sought-after molecule and free of any co-elution. In all SPME-GC-MS signals, the peak characterization procedure, based on the derivative of the ionic signals, extracts for each compound its apex starting and ending points after a smoothing step by the Savitzky-Golay method. The area integration process based on the trapeze method includes a simultaneous visualization of the ionic signals for a same compound in all samples in order to check the quality of the automatic integration.

2.4. Micropollutant analysis

The xenobiotics under study were analyzed in feed and tissue samples of control and contaminated groups by French National Reference Laboratories. A representative sample of each of the four experimental feeds was placed in a glass bottle and kept at -20°C.

The two sets of samples (muscle and feed) were subsequently used for the targeted quantification of the xenobiotics by the reference methods. Deltamethrin was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), PCBs were assayed by gas chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (GC-HRMS), and Monensin analysis was performed by liquid chromatography coupled to a UV detector and tandem mass spectrometer (details in Section S3).

2.5. Data analysis

Statistical analysis was carried out with Statistica 12 software (Dell Software, Paris, France) and Matlab R2007b software. The effect of SPME parameters tested for the analysis of liver volatolome was assessed based on Analysis of Variance (ANOVA) and Newman–Keuls *post hoc* test of multiple comparisons ($p<0.05$) performed on the abundances of the targeted VOCs listed in Table S1, to detect possible significant differences between the modalities of each SPME parameter being evaluated.

Regarding the validation of the SPME extraction protocols, SPME-GC-MS signals were assembled into matrices: each row contained the abundances of all the volatile metabolites in a given liver sample of chickens exposed or non-exposed to one type of micropollutant, and each column represented one volatile metabolite extracted from all the liver samples. Common components and specific weights analysis (ComDim) is a method initially designed to simultaneously analyse several different data tables describing the same samples [29] which has already been applied in this way in chemometric studies [30]. ComDim provides a powerful multi-table tool to process the information contained in several matrices corresponding to different VOC abundances [31]. ComDim estimates a common space defined by a series of dimensions (common components) along which the samples present the same dispersion for the largest number of data tables. Each table, or block, has a specific weight or contribution (called salience) to the definition of each dimension of this common space. Significant differences in the values of saliences for a given dimension reflect the fact that not all blocks contribute equally to

the definition of the dimension, i.e. not all blocks give the same dispersion of the samples on that common component. ComDim has also been used to extract information from a single data set by applying it to blocks consisting each of a single variable [32]. This procedure creates a series of common components as combinations of variables with a similar effect on the dispersion of samples. The saliences of the variables are a measure of their importance for the definition of these components.

Thus applied (one variable per table), ComDim highlights variables that behave in the same way as a function of differences among the samples. In our study, the data consisted of 70 tables corresponding to the 70 VOCs extracted from the initial SPME-GC-MS measurements carried out on each of the 42 liver samples contaminated or non-contaminated with micropollutants. ComDim analyses were performed separately on data matrices containing the control group (15 samples) concatenated row-wise to each exposed group (9 samples). For each type of contamination, the analysed data matrix consisted of 24 samples and 70 variables, treated as 70 blocks of size 24 × 1. ComDim estimates the dispersion of the control group and each contaminated group in a series of dimensions in decreasing order of maximum variance common to the largest number of data tables (here, the variables). The data set was treated by ComDim, using Matlab R2007b software (The MathWorks, Natick, USA). Based on their global scores, controls and samples contaminated with each type of micropollutant were projected onto six common components (CCs). Quantile-Quantile plots (Q-Q plot) [33] were drawn on the vectors of loadings of the VOCs for the interesting common components in order to visualise those VOCs that contribute most to the discrimination along that common component. The standard deviations of the ComDim loadings were calculated for each interesting common component and the variables with contributions to the loadings greater than plus or minus two standard deviations were selected as candidate markers for each type of contaminant exposure.

3. Results and discussion

3.1. Set-up of SPME parameters for the extraction of liver volatolome

3.1.1. Extraction conditions

The VOC composition of the liver extract depends on (i) the time/temperature combination used during the extraction, which affects the volatility and solubility of the VOCs [34], and (ii) the

type of polymer-coated fused silica fiber, which influences the selectivity of the VOC extraction [35].

Extraction time/temperature. *The s*tarting point was the conditions (CAR/PDMS fiber, 60°C/ 30 min) used by Berge *et al*. [9]. Table 2 shows the effect of decreasing extraction time and temperature on the averages and the standard deviations of VOC abundances extracted from liver with the same CAR/PDMS fiber.

Most candidate markers were significantly different ($p < 0.05$) when the temperature was changed: exceptions were carbon disulfide, propanoic acid, heptane, and 2-pentyl-furan. This confirms that the extraction of VOCs by SPME is modulated by an effect of temperature, irrespective of extraction time [18,36]. The abundances of most of the VOCs extracted were 2–16 times higher at 60 °C than at 40 °C: short-chain hydrocarbons (butane and pentane), acetic acid and 2-butanol were exceptions. This result can be partly explained by an increase with extraction temperature of the transfer of VOCs from the matrix to the fiber *via* the headspace [21,23]. However, the highly significant increase at 60 °C in compounds marking oxidation, such as aldehydes (e.g. pentanal, octanal and nonanal), suggests that these conditions of extraction could impair the representativity of the extract. In addition, the relative standard deviations (RSDs) for the abundances of most of the compounds were higher at 60 °C than at 40 °C, confirming the observations of Silva *et al*. [23], who showed in urine samples that while increasing the temperature from 50 °C to 60 °C increased the abundances of the VOCs extracted, it collaterally increased their RSDs. Accordingly, to facilitate interpretation of the biological mechanisms responsible for the production of the volatile metabolites marking contamination by toxic substances, an extraction temperature of 40 °C was adopted in subsequent experiments.

Regarding extraction time, table 2 shows no significant variations ($p < 0.05$) in the abundances of the VOCs extracted after 15 minutes and 30 minutes except for acetic acid, 2-butanol, and 2-pentyl-furan. This result is consistent with Ouyang *et al*. [21] who reported that once VOCs reached equilibrium between sample matrix and headspace, the amount of analyte extracted is independent of further increase in extraction time. However, the coefficients of variation of 15 out of the 22 VOCs were lower after 30 minutes extraction. Hence, while reducing the extraction time from 30 minutes to 15 minutes did not influence the extractability of the liver volatolome, it increased the variability of the VOCs extracted, probably because they cannot completely

equilibrate in the shorter time. An extraction time of 30 minutes was thus used in subsequent experiments.

Table 2. Influence of extraction time/temperature on the volatolome extracted from chicken liver: comparison of peak areas (× 10^4) and relative standard deviations of candidate VOC markers in liver samples analyzed by GC-MS after SPME extraction at two extraction temperatures (60 °C and 40 °C) and two extraction times (30 min and 15 min).

Candidate VOC markers[1]	60 °C/30 min [2]	40 °C/30 min [2]	40 °C/15 min [2]
Butane	297.6 (42)[b]	1689.3 (22)[a]	1950.9 (12)[a]
Acetone	6887.7 (44)[a]	4361.6 (21)[ab]	2916.3 (20)[b]
Pentane	1592.8 (24)[b]	2630.7 (14)[a]	2556.6 (5)[a]
Carbon disulfide	338.9 (18)[a]	331.5 (33)[a]	330.0 (24)[a]
Acetic acid	1057.8 (40)[b]	2055.8 (19)[a]	1411.9 (26)[b]
2-Butanone	530.3 (38)[a]	248.2 (33)[b]	211.7 (35)[b]
2-Butanol	76.9 (20)[b]	191.6 (22)[a]	63.1 (34)[b]
Propanoic acid	258.5 (40)[a]	300.9 (25)[a]	172.3 (27)[a]
1-Penten-3-ol	403.9 (51)[a]	137.6 (25)[b]	99.1 (56)[b]
2-Pentanone	177.1 (35)[a]	54.1 (72)[b]	37.1 (84)[b]
Pentanal	1658.6 (46)[a]	101.7 (40)[b]	92.2 (43)[b]
Heptane	240.9 (18)[a]	237.3 (21)[a]	231.0 (10)[a]
1-Pentan-1-ol	274.2 (72)[a]	37.1 (28)[b]	23.9 (36)[b]
Toluene	681.6 (54)[a]	280.8 (11)[b]	225.5 (12)[b]
1-Hexanol	1436.9 (89)[a]	219.7 (66)[b]	109.3 (113)[b]
2-Butyl-furan	16.5 (33)[a]	8.9 (29)[b]	7.3 (29)[b]
Benzaldehyde	2383.0 (39)[a]	166.7 (29)[b]	119.0 (38)[b]
1-Octen-3-one	16.9 (22)[a]	4.4 (50)[b]	3.0 (32)[b]
1-Octen-3-ol	7.9 (22)[a]	1.3 (17)[b]	1.6 (45)[b]
2-Pentyl-furan	1.2 (33)[a]	1.3 (4)[a]	0.8 (13)[b]
Octanal	15.8 (61)[a]	2.4 (22)[b]	1.9 (30)[b]
Nonanal	41.6 (21)[a]	5.9 (14)[b]	4.4 (18)[b]

[1] Compounds listed in Table S1 which have been already identified in the literature as candidate VOC markers of pathologies or exposure to toxic agents.

[2] Area values (× 10^4) are the average of 5 replicates with relative standard deviation (%RSD) in brackets

[a,b] annotate the compounds for which there is statistical difference according to Student t-test ($p<0.05$)

Fibre selection. Two types of fiber were tested: (i) CAR/PDMS, used by Berge *et al*. [9], and which is the fiber most often used to extract volatile marker metabolites in biological matrices, in particular liver, urine [23] and blood [37], and (ii) DVB/CAR/PDMS, designed to extend the range of VOCs extracted with CAR/PDMS [35]. Table S2 shows that the abundance of most of

the VOCs extracted ($p < 0.05$) was significantly influenced by the nature of the fiber: exceptions were ketones (2-pentanone, 1-octen-3-one), alcohols (1-penten-3-ol, 1-pentan-1-ol), and pentanal. A comparison of the two fibers shows that most of the low molecular weight compounds were more efficiently extracted by CAR/PDMS, whereas heavier compounds, such as 1-hexanol, 2-n-butylfuran, benzaldehyde and nonanal, were more efficiently extracted by DVB/CAR/PDMS. This finding confirms the relative selectivity of the two SPME fibers [38], and shows their potential complementarity. However, a critical review of work dealing with disease diagnosis based on volatolomics shows that the main candidate markers are low molecular weight VOCs [39]. For this reason CAR/PDMS was chosen for subsequent work.

3.1.2. Sample preparation

In order to restore VOC abundances while minimizing variability, two approaches dealing with sample preparation were investigated: an increase of sample defrosting time and salt addition.
In order to study the effect of time for defrosting the samples from −80 °C to 4 °C on the abundances and standard deviations of the volatolome VOCs, liver samples stored at −80 °C were either placed directly on the holder for SPME-GC-MS analysis or left to thaw at 4 °C for 8 h or 24 h before analysis. Table 3 shows that 19 out of the 22 VOCs ($p<0.05$) were significantly influenced by the defrosting time. VOC abundances increased after 24 h of defrosting except for ketones (acetone, 2-butanone, and 2-pentanone) and carbon disulfide which are better extracted from non-thawed samples. The coefficients of variation of the volatile compounds were lower after defrosting samples for 24 h for 12 out of these 19 significant VOCs. This finding also suggests good compositional stability of the extract in these conditions, in line with the results of Riazanskaia *et al*. [40] which showed that in the case of skin, the volatile components remain stable for up to 24 h when samples are stored at 4 °C before analysis by SPME-GC-MS. Defrosting of powdered liver samples for 24 h at 4 °C thus allows abundances to be increased and variability to be reduced compared to the protocol proposed by Berge *et al*. (2011).

Table 3. Influence of sample defrosting time on the volatolome extracted by SPME from chicken liver: comparison of peak areas (× 10^4) and relative standard deviations of candidate VOC markers in liver samples analysed by GC-MS after SPME extraction of non-thawed samples or thawed samples for 8 h or 24 h.

Candidate VOC markers [1]	Non-thawed [2]	Thawed for 8 h [2]	Thawed for 24 h [2]
Butane	423.7 (35)[b]	484.6 (18)[b]	636.5 (34)[a]
Acetone	2070.2 (35)[a]	1236.3 (36)[b]	892.7 (19)[b]
Pentane	349.9 (24)[b]	452.8 (16)[b]	1072.0 (20)[a]
Carbon disulfide	22.5 (82)[a]	9.4 (58)[b]	8.5 (18)[b]
Acetic acid	6.6 (77)[a]	11.2 (132)[a]	11.2 (82)[a]
2-Butanone	20.3 (61)[a]	8.4 (24)[b]	14.0 (28)[ab]
2-Butanol	204.9 (32)[b]	191.7 (22)[b]	253.2 (18)[a]
Propanoic acid	1.8 (69)[a]	2.2 (120)[a]	3.4 (65)[a]
1-Penten-3-ol	295.8 (31)[b]	341.8 (15)[b]	886.0 (24)[a]
2-Pentanone	14.6 (106)[a]	3.6 (22)[b]	5.7 (28)[b]
Pentanal	2.7 (40)[b]	4.8 (40)[b]	50.1 (39)[a]
Heptane	47.2 (29)[b]	39.7 (30)[b]	71.1 (28)[a]
1-Pentan-1-ol	33.4 (24)[b]	57.8 (23)[b]	278.7 (34)[a]
Toluene	45.3 (48)[a]	37.3 (23)[a]	45.9 (20)[a]
1-Hexanol	165.8 (30)[b]	240.5 (13)[b]	714.6 (25)[a]
2-Butyl-furan	5.2 (42)[c]	3.5 (15)[b]	11.5 (19)[a]
Benzaldehyde	3.5 (27)[b]	4.5 (35)[b]	50.7 (41)[a]
1-Octen-3-one	5.3 (33)[b]	5.5 (24)[b]	37.4 (37)[a]
1-Octen-3-ol	7.6 (43)[b]	8.9 (44)[b]	126.2 (44)[a]
2-Pentyl-furan	3.7 (44)[b]	3.3 (20)[b]	27.1 (30)[a]
Octanal	2.2 (23)[b]	2.3 (21)[b]	17.4 (44)[a]
Nonanal	2.5 (23)[b]	2.3 (24)[b]	18.9 (41)[a]

[1]Compounds listed in Table S1 which have been already identified in the literature as candidate VOC markers of pathologies or exposure to toxic agents.
[2] Area values (×104) are the average of 12 replicates with the relative standard deviation (%RSD) in brackets.
[a] annotate the compounds for which there is statistical significant differences according to Student t-test ($p < 0.05$).
[b] annotate the compounds for which there is statistical significant differences according to Student t-test ($p < 0.05$).
[c] annotate the compounds for which there is statistical significant differences according to Student t-test ($p < 0.05$).

In order to salt out the VOCs and so favour extraction relative to the study of Berge *et al*. (2011) [9], sodium chloride (NaCl) [24] or anhydrous sodium sulphate (Na_2SO_4) [25] were added to liver powder. Table 4 shows significant increases in the abundances of 12 out of the 22 VOCs ($p < 0.05$) with the addition of NaCl or Na_2SO_4 to liver powder, with an increase in abundance of more than 50% in all cases. This result confirms the utility of salting-out to improve the sensitivity of the SPME-GC-MS analysis of VOCs [23].

For 10 compounds, the abundance obtained after adding NaCl significantly exceeded that obtained after adding Na_2SO_4: exceptions were acetic and propanoic acids. As regards variability, adding a salt increased the standard deviations by a factor of 1.1–2.5 with NaCl and 1.1–13.2 with Na_2SO_4. This result was possibly explained by Liu *et al*. [41], who demonstrated that salt could slow down the mass transfer of compounds between the matrix and the dynamic headspace owing to the viscosity effect of the salt on the sample. This may prevent attaining the equilibrium state of VOCs between sample matrix and fiber film resulting in higher extraction variability. In the present study, saturated NaCl solution was chosen, as it significantly improved the extractability of VOCs from the liver.

Table 4. Influence of salt addition on the volatolome extracted by SPME from chicken liver: comparison of peak areas ($\times 10^4$) and relative standard deviations of candidate VOC markers in liver samples analysed by GC-MS after SPME extraction and with or without prior NaCl or Na_2SO_4 addition.

Candidate VOC markers [1]	Salt free [2]	+ NaCl [2]	+ Na_2SO_4 [2]
Butane	150.2 (42)[a]	225.4 (25)[a]	168.1 (48)[a]
Acetone	735.0 (9)[a]	466.7 (13)[a]	1368.7 (61)[a]
Pentane	157.1 (9)[a]	202.8 (22)[a]	162.4 (36)[a]
Carbon disulfide	13.3 (9)[a]	10.8 (24)[ab]	7.8 (27)[b]
Acetic acid	109.2 (62)[b]	30.3 (64)[b]	376.2 (40)[a]
2-Butanone	135.2 (8)[a]	204.7 (6)[a]	187.1 (108)[a]
2-Butanol	57.3 (13)[a]	59.2 (14)[a]	67.9 (25)[a]
Propanoic acid	26.1 (50)[b]	12.5 (64)[b]	152.2 (39)[a]
1-Penten-3-ol	306.7 (16)[b]	649.3 (24)[a]	394.1 (67)[ab]
2-Pentanone	7.5 (12)[b]	29.2 (25)[a]	10.4 (93)[b]
Pentanal	3.1 (22)[b]	170.7 (56)[a]	5.0 (60)[b]
Heptane	10.0 (18)[a]	11.9 (29)[a]	17.1 (35)[a]
1-Pentan-1-ol	43.4 (31)[b]	84.1 (39)[a]	34.0 (68)[b]
Toluene	41.5 (17)[a]	54.2 (34)[a]	42.6 (32)[a]
1-Hexanol	40.5 (38)[a]	80.1 (33)[a]	55.4 (49)[a]
2-Butyl-furan	0.6 (28)[b]	2.0 (15)[a]	0.9 (56)[b]
Benzaldehyde	35.8 (42)[a]	109.8 (86)[a]	26.6 (169)[a]
1-Octen-3-one	4.2 (29)[b]	19.9 (18)[a]	5.2 (34)[b]
1-Octen-3-ol	0.3 (32)[b]	9.3 (66)[a]	2.8 (56)[b]
2-Pentyl-furan	0.3 (22)[b]	3.1 (14)[a]	0.4 (40)[b]
Octanal	0.3 (58)[b]	2.3 (49)[a]	0.2 (24)[b]
Nonanal	0.5 (30)[b]	3.9 (43)[a]	0.5 (26)[b]

[1] Compounds listed in Table S1 which have been already identified in the literature as candidate volatile markers of pathologies or exposure to toxic agents.
[2] Area values ($\times 10^4$) are the average of 5 replicates with the relative standard deviation (%RSD) in brackets.
[a] annotate the compounds for which there is statistical significant differences according to Student t-test ($p < 0.05$).
[b] annotate the compounds for which there is statistical significant differences according to Student t-test ($p < 0.05$).

3.1.3. Benchmarking of the revised protocol

Table 5 summarizes the benchmarking of the revised SPME protocol compared to the Berge *et al*. [9] set-up. The revised protocol gave a significant increase of abundance for 14 of the 22 VOCs. Exceptions were acetone and carbon disulfide which are seen in Table 3 to be better extracted from non-defrosted samples, and benzaldehyde and 2-butanone which are seen in Table 2 to be better extracted at 60°C. The significant decrease in acetic and propanoic acids cannot be explained by any single factor studied in Tables 2-4 but confirms the trends observed in response to NaCl addition in Table 4. Moreover, VOC RSD decreased when the revised protocol is applied except for acetone and acetic and propanoic acids, which increase in variability after adding NaCl to liver sample. In conclusion, the proposed SPME conditions improved the SPME extraction of liver volatolome in terms of representativity, sensitivity and variability.

Table 5. Benchmarking of the revised SPME protocol: comparison of peak areas ($\times 10^4$) and relative standard deviations of targeted volatile compounds in liver samples analysed by GC-MS after SPME extraction according to Berge *et al*. [9] or to the revised protocol.

Candidate VOC markers [a]	Berge et al. SPME protocol [b]	Revised SPME protocol [b]
Butane	49.9 (34)	613.7 (18)*
Acetone	2594.1 (39)	847.0 (53)*
Pentane	19.2 (62)	872.8 (14)*
Carbon disulfide	52.0 (88)	7.2 (23)*
Acetic acid	214.0 (50)	18.5 (153)*
2-Butanone	71.9 (46)	8.5 (31)*
2-Butanol	112.8 (39)	178.7 (16)*
Propanoic acid	16.3 (62)	3.6 (109)*
1-Penten-3-ol	15.8 (61)	572.7 (22)*
2-Pentanone	3.4 (54)	4.1 (24)
Pentanal	4.2 (157)	7.5 (37)
Heptane	2.4 (76)	52.0 (38)*
1-Pentan-1-ol	8.9 (66)	120.2 (27)*
Toluene	11.4 (53)	34.0 (20)*
1-Hexanol	34.5 (85)	374.5 (18)*
2-Butyl-furan	1.7 (140)	4.6 (24)*
Benzaldehyde	49.0 (71)	12.6 (45)*
1-Octen-3-one	1.8 (58)	9.9 (27)*
1-Octen-3-ol	6.3 (54)	23.1 (45)*
2-Pentyl-furan	1.3 (38)	7.9 (38)*
Octanal	1.3 (42)	3.2 (27)*
Nonanal	2.3 (44)	3.2 (33)*

[a] Compounds listed in Table S1 which have been already identified in the literature as candidate VOC markers of pathologies or exposure to toxic agents.
[b] Area values ($\times 10^4$) are the average of 20 replicates with the relative standard deviation (%RSD) in brackets.
* annotate the compounds for which there is statistical significant differences according to Student t-test ($p < 0.05$).

3.2. Assessment of SPME conditions for chicken liver volatolome analysis to back-trace exposure to micropollutants

In view of the changes made in the extraction conditions of Berge *et al*. [9], it was necessary to make sure that the revised protocol would confirm the informative potential of the liver volatolome as a way to detect markers of livestock exposure to different types of contaminants. To this end, the liver volatolomes of chickens either fed with the control diet or the contaminated diets were analysed by SPME-GC-MS. ComDim was applied separately to three data matrices composed of 24 samples and 70 VOCs determined in control chickens and chickens exposed to deltamethrin, PCBs, and monensin.

3.2.1. Exposure to deltamethrin

As shown in Table 1, deltamethrin concentration reached 5.6 mg/kg in contaminated feed which is close to the targeted concentration of 9 mg/kg and validates the efficiency of the contamination protocol. In contrast, deltamethrin was not detectable in control feed confirming the absence of cross contamination during experimental breeding. In addition, deltamethrin was detected neither in control nor in the muscles from exposed broilers. The non-detection of deltamethrin in muscles of exposed animals may be explained by the limit of detection of the method (1 µg/kg). In an earlier study, Chandra *et al*. [42] showed that chicken exposure to deltamethrin for 42 days at 100 and 150 mg/kg feed leads to a detectable accumulation of deltamethrin in their breast muscles at 47 and 39 µg/kg, respectively. However, the administrated dose was more than 25-fold lower in the present experiment which may, together with animal-related factors, explain the non-detection of deltamethrin.

Fig. 1 presents the projection of the ComDim scores of control and deltamethrin-contaminated samples along six common components (CCs). CC4 gives a separation of the samples into two groups and so reflects changes in chicken liver volatolome in response to dietary exposure to deltamethrin. These results are in accordance with a recent study published by Arora *et al*. [43] who noted histological and liver function alterations in deltamethrin-treated animals and suggested the hepatotoxic potential of deltamethrin on acute exposure.

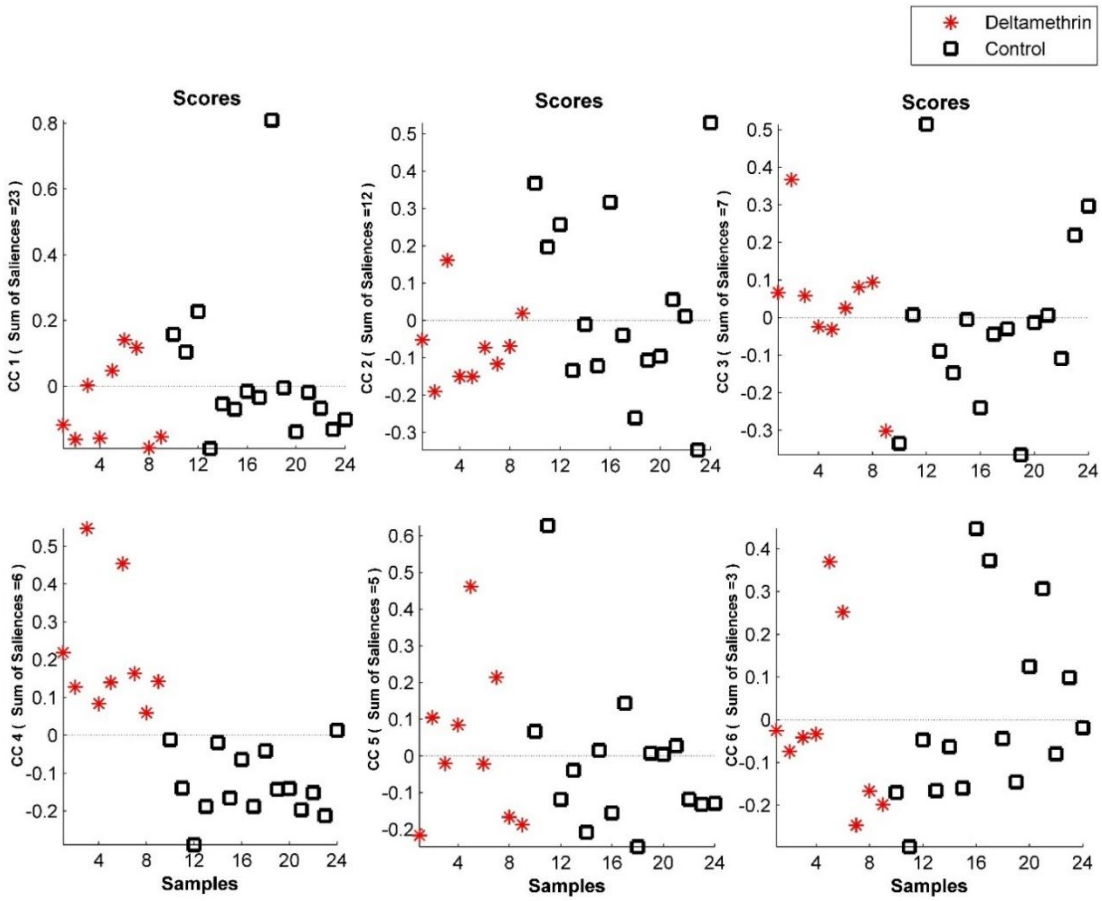


Fig. 1. ComDim scores of control group (n=15) and deltamethrin-contaminated group (n=9) onto the first six Common Components (CC). Black squares denote control chickens and red asterisks denote chickens contaminated with deltamethrin. The sum of the saliences of the contributing variables is given for each Common Component.

ComDim loadings revealed the contribution of many variables to the separation along CC4. The main VOCs influencing the discrimination of chickens exposed and non-exposed to deltamethrin along CC4 were selected based on the Q-Q plot analysis and the standard deviation of the loadings (Fig. S4.A); these VOCs correspond to 3-penten-2-ol, 4-hexen-1-ol, nonanal, carbon disulfide, alpha-methylstyrene, dihydro-5-ethyl-2(3H)-furanone, and 1,3,3-trimethyl-2-vinyl-1-cyclohexene. Primary and secondary alcohols, aldehydes, aromatic compounds and sulfur compounds have already been shown as candidate markers of diseases which strengthen the relevance of these compounds as potential makers of animal exposure to deltamethrin [39,44]. This result gives an initial validation of the SPME conditions set in the first part of this study, and shows that the liver volatolome can offer valuable information to detect animal exposure to

deltamethrin despite this contaminant being undetectable in exposed animal tissues by reference methods.

Moreover, this result is consistent with Berge *et al*. [9] who demonstrated the relevance of the liver volatolome to detect animal exposure to PAHs although these were not detectable by targeted analysis in chicken liver.

3.2.2. Exposure to polychlorobiphenyls (PCBs)

As shown in Table 1, PCB concentration reached 8.2 µg/kg in contaminated feed which is close to the targeted concentration (10 µg/kg feed) and validates the efficiency of the feed contamination protocol. PCB concentration of 0.11 µg/kg feed was found in control feed due to background environmental pollution. PCB concentration was much higher in muscles of contaminated chickens than in the control group (49.3±12.7 vs 4.7± 2.1 µg/kg lipid weight), confirming transfer from the feed to animal tissues [9,45,46].

Fig. 2 presents the projection of the ComDim scores of the control and PCB-contaminated groups along the first 6 CCs. CC4 gives a separation of control and PCB-contaminated samples into two groups and so reflects changes in chicken liver volatolome in response to a dietary exposure to PCBs. This result is not consistent with the study of Berge *et al*. [9] which showed no influence of animal exposure to PCBs on the liver volatile compound composition. However, the dietary PCB load used to contaminate chickens in the present study was 100 fold higher, suggesting a dose-dependent release of VOCs in response to PCB exposure. Most important VOCs for the discrimination along CC4 were selected based on the Q-Q plot analysis and the loadings standard deviations (Fig. S4.B). The key VOCs were 2-propanol, dimethylsulfone, 3-ethylcyclopentanone, alpha-methylstyrene, 2-pentylfuran, 2,2,6-trimethylcyclohexanone, 3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one, and dihydro-5-ethyl-2(3H)-furanone. As with deltamethrine, some of these VOCs belong to chemical families like primary and secondary alcohols (2-propanol), aromatic compounds (2-pentyl-furan, alpha-methylstyrene), sulfur compounds (dimethyl-sulfone) that have been proposed previously as candidate markers of diseases [39,47]. This result gives a second validation of the revised SPME protocol set in the first part of this study, and demonstrates its relevance for detecting changes in liver volatolome of animals exposed to relatively high doses of PCBs.

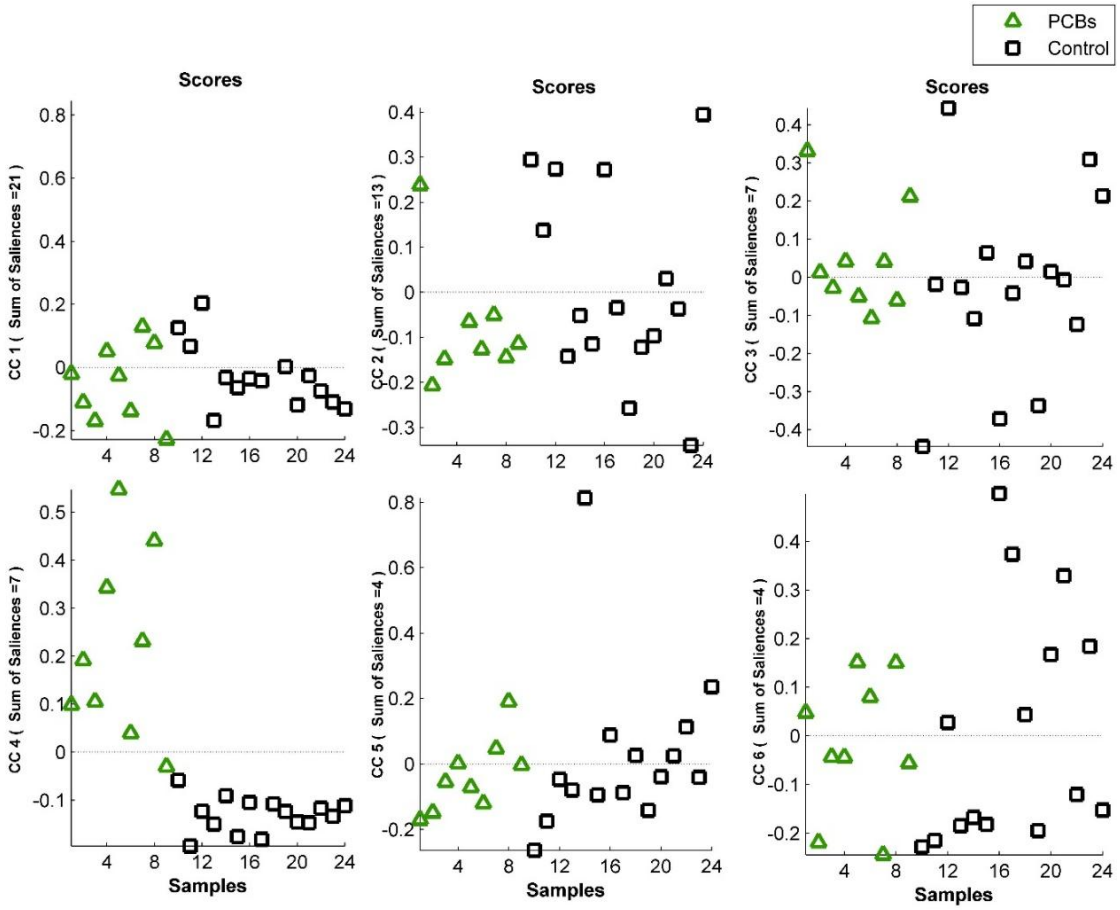


Fig. 2. Comdim scores of control group (n=15) and PCB-contaminated group (n=9) onto the first six Common Components. Black squares denote control chickens and green triangles denote chickens contaminated with PCBs. The sum of the saliences of the variables is given for each Common Component.

3.2.3. Exposure to monensin

Table 1 shows that the monensin concentration reached 114 mg/kg in contaminated feed which is close to the targeted concentration (125 mg/kg). In contrast, monensin was not detectable in the control feed confirming the absence of cross contamination during experimental breeding. While monensin was not detectable in control animals, its concentration in muscles of contaminated animals reached 1.13 µg/kg, confirming its transfer from the feed to animal tissues [9,45,46]. This concentration in muscle tissues after monensin exposure is far below the maximum residue level (8 µg/kg), which is consistent with Donoho *et al*. [48] who reported that monensin is rapidly absorbed, metabolized and excreted, and that it is accumulated preferentially in liver with much lower residues in other tissues.

Fig. 3 shows the projection of ComDim scores of control and monensin-treated group along the 6 CCs. CC5 gives a separation of control and monensin-treated samples into two groups and so reflects changes in chicken liver volatolome in response to dietary administration of monensin. This result is consistent with literature data since Berge *et al*. [9] showed that chickens exposed to nicarbazin and narasin were discriminated from controls by their liver volatolome. The most important VOCs for the discrimination along CC5 were selected based on the Q-Q plot analysis and the loadings standard deviations (Fig. S4.C). These key VOCs included 2-propanol, 2-butanol, 4-hexen-1-ol, propanoic acid, dihydro-5-ethyl-2(3H)-furanone, alpha-methylbenzene methanol, and 1,3,3-trimethyl-2-vinyl-1-cyclohexene. As with deltamethrin and PCBs, some of these VOCs are secondary alcohols (2-propanol, 2-butanol), aromatic compounds (alpha-methylbenzene methanol) or carboxylic acids (propanoic acid) that have previously been proposed as candidate markers of diseases [39,49,50] . This result is consistent with the work of Hermo *et al*. [51] who found metabolic changes in the muscle, kidney and liver of chickens after an exposure to an antibiotic (amoxicillin), and suggested that endogenous compounds underwent changes from normal levels as a consequence of the pharmacological treatment, by up- and down- regulation. These data also validate the revised SPME protocol, and demonstrates its relevance for detecting changes in liver volatolome of monensin-administrated animals.

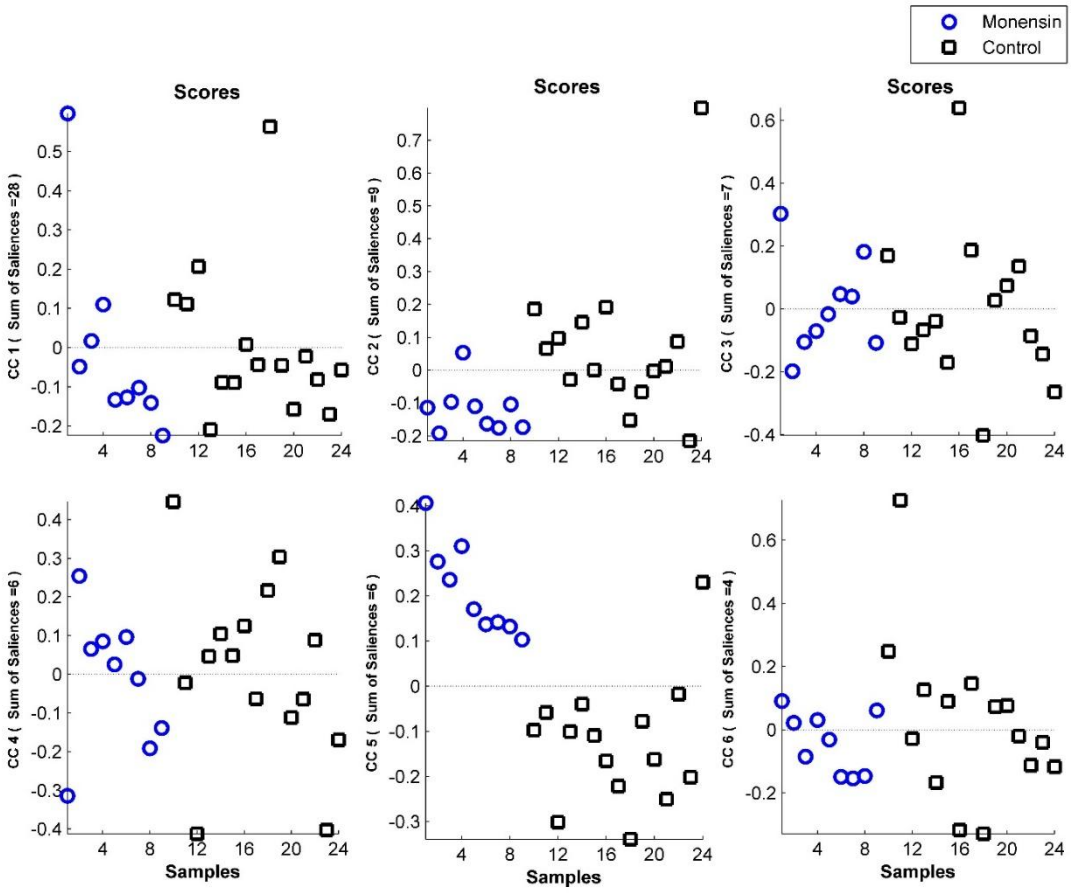


Fig.3. Comdim scores of control group (n=15) and monensin-contaminated group (n=9) onto the first six Common Components. Black squares denote control chickens and bleu circles denote chickens contaminated with monensin. The sum of the saliences of the variables is given for each Common Component

4. Conclusion

The aim of this work was to improve the operating conditions of liver volatolome analysis for the determination of markers that could serve to back-track animal exposure to contaminants. Focusing on an SPME set-up, new conditions were proposed giving better extraction of liver VOCs, less analytical variability, and improved sensitivity. These new SPME conditions followed by GC-MS analysis generated signals that could be used to highlight changes in liver volatolome in response to exposure of chickens to three types of micropollutant: deltamethrin, PCBs and monensin. The next step will be to assess the robustness of the VOC markers detected in this paper and to elucidate the biological mechanisms underlying their over- or under- expression.

This volatolomic approach could also be extended to a wider range of micropollutants and to other biological media, such as plasma in order to have a less invasive sampling methods.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the French National Research Agency, project SOMEAT. Contact No. ANR-12-1LID-0004. Safety of Organic Meat. Available at http://www.so-meat.fr

REFERENCES

[1] S. Andree, W. Jira, K.H. Schwind, H. Wagner, F. Schwagele, Chemical safety of meat and meat products, Meat Sci 86 (2010) 38-48.
[2] E. Engel, J. Ratel, J. Bouhlel, C. Planche, M. Meurillon, Novel approaches to improving the chemical safety of the meat chain towards toxicants, Meat Sci 109 (2015) 75-85.
[3] C.H. Richter, B. Custer, J.A. Steele, B.A. Wilcox, J.C. Xu, Intensified food production and correlated risks to human health in the Greater Mekong Subregion: a systematic review. Environ. Health 14 (2015).
[4] T.K. Udeigwe, J.M. Teboh, P.N. Eze, M.H. Stietiya, V. Kumar, J. Hendrix, H.J. Mascagni, T. Ying, T. Kandakji, Implications of leading crop production practices on environmental quality and human health. J. Environ. Manage 151 (2015) 267-279
[5] J.F. Focant, Dioxin food crises and new POPs: challenges in analysis, Anal. Bioanal. Chem 403 (2012) 2797-2800.
[6] S. Khatib, J.P.M. Finberg, F. Artoul, Y. Lavner, S. Mahmood, U. Tisch, H. Haick, Y. Aluf, J. Vaya, Analysis of volatile organic compounds in rats with dopaminergic lesion: Possible application for early detection of Parkinson's disease, Neurochem. Int 76 (2014) 82-90.
[7] M. Kusano, E. Mendez, K.G. Furton, Development of headspace SPME method for analysis of volatile organic compounds present in human biological specimens, Anal. Bioanal. Chem 400 (2011) 1817-1826.
[8] T. Khalid, R. Aggio, P. White, B. Costello, R. Persad, H. Al-Kateb, P. Jones, C.S. Probert, N. Ratcliffe, Urinary Volatile Organic Compounds for the Detection of Prostate Cancer, PLoS One 10 (2015) e0143283.
[9] P. Berge, J. Ratel, A. Fournier, C. Jondreville, C. Feidt, B. Roudaut, B. Le Bizec, E. Engel, Use of Volatile Compound Metabolic Signatures in Poultry Liver to Back-Trace Dietary Exposure to Rapidly Metabolized Xenobiotics, Environ. Sci. Technol 45 (2011) 6584-6591.
[10] M. Giardina, S.V. Olesik, Application of low-temperature glassy carbon-coated macrofibers for solid-phase microextraction analysis of simulated breath volatiles, Anal. Chem 75 (2003) 1604-1614.
[11] Q.-H. Zhang, L.-D. Zhou, H. Chen, C.-Z. Wang, Z.-N. Xia, C.-S. Yuan, Solid-phase microextraction technology for in vitro and in vivo metabolite analysis, Trac-Trends Anal. Chem. 80 (2016) 57-65.
[12] G. Ouyang, J. Pawliszyn, A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction, Anal. Chim. Acta 627 (2008) 184-197.
[13] F.M. Musteata, J. Pawliszyn, J., Bioanalytical applications of solid-phase microextraction, Trac-Trends Anal. Chem 26 (2007) 36-45.
[14] C.L. Silva, M. Passos, J.S. Camara, Solid phase microextraction, mass spectrometry and metabolomic approaches for detection of potential urinary cancer biomarkers-A powerful strategy for breast cancer diagnosis, Talanta 89 (2012) 360-368.
[15] D. Robertshaw, Temperature regulation and the thermal environment. In: Reece WO, editor. Dukes' Physiology of Domestic Animals, 12th ed, Ithaca and London, Cornell University Press, 2004.
[16] J. Ruiz, R. Cava, J. Ventanas, M.T. Jensen, Headspace solid phase microextraction for the analysis of volatiles in a meat product: Dry-cured Iberian ham, J. Agric. Food Chem 46 (1998) 4688-4694.
[17] M. Garcia-Esteban, D. Ansorena, I. Astiasarán, J. Ruiz, Study of the effect of different fiber coatings and extraction conditions on dry cured ham volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME), Talanta 64 (2004) 458-466.
[18] S. Bogusz, A.D.T. de Melo, C.A. Zini, H.T. Godoy, Optimization of the extraction conditions of the volatile compounds from chili peppers by headspace solid phase micro-extraction, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 3345-3350.

[19] M. Xu, A.V. Terry, M.G. Bartlett, Determination of diisopropylfluorophosphate in rat plasma and brain tissue by headspace solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry, Rapid Commun. Mass. Spectrom 22 (2008) 3069-3075.
[20] G. Flores, M.L.R. del Castillo, G.P. Blanch, M. Herraiz, Effect of sample freezing on the SPME performance in the analysis of chiral volatile compounds in foods, Food Chem. 96 (2006) 334-339.
[21] G.F. Ouyang, D. Vuckovic, J. Pawliszyn, Nondestructive Sampling of Living Systems Using in Vivo Solid-Phase Microextraction, Chem. Rev 111 (2011) 2784-2814.
[22] H.L. Lord, J. Pawliszyn, Method optimization for the analysis of amphetamines in urine by solid-phase microextraction, Anal. Chem 69 (1997) 3899-3906.
[23] C.L. Silva, M. Passos, J.S. Camara, Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry, Br. J. Cancer 105 (2011) 1894-1904.
[24] A.P. Anton, A.M.C. Ferreira, C.G. Pinto, B.M. Cordero, J.L.P. Pavon, Headspace generation coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the automated determination and quantification of endogenous compounds in urine. Aldehydes as possible markers of oxidative stress, J. Chromatogr A. 1367 (2014) 9-15.
[25] A. Rivas-Canedo, C. Juez-Ojeda, M. Nunez, E. Fernandez-Garcia, Volatile compounds in low-acid fermented sausage "espetec" and sliced cooked pork shoulder subjected to high pressure processing. A comparison of dynamic headspace and solid-phase microextraction, Food. Chem 132 (2012) 18-26.
[26] J.C. Martin, M. Maillot, G. Mazerolles, A. Verdu, B. Lyan, C. Migne, C. Defoort, C. Canlet, C. Junot, C. Guillou, C. Manach, D. Jabob, D.J.R. Bouveresse, E. Paris, E. Pujos-Guillot, F. Jourdan, F. Giacomoni, F. Courant, G. Fave, G. Le Gall, H. Chassaigne, J.C. Tabet, J.F. Martin, J.P. Antignac, L. Shintu, M. Defernez, M. Philo, M.C. Alexandre-Gouaubau, M.J. Amiot-Carlin, M. Bossis, M.N. Triba, N. Stojilkovic, N. Banzet, R. Molinie, R. Bott, S. Goulitquer, S. Caldarelli, D.N. Rutledge, Can we trust untargeted metabolomics? Results of the metabo-ring initiative, a large-scale, multi-instrument inter-laboratory study, Metabolomics 11 (2015) 807–821.
[27] D.J. MacLachlan, Transfer of fat-soluble pesticides from contaminated feed to poultry tissues and eggs, Br. Poult. Sci 49 (2008) 290-298.
[28] EFSA (European Food Safety Authority), Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (poultry), EFSA. J. 10 (2012). doi/10.2903/j.efsa.2012.2741.
[29] E.M. Qannari, I.Wakeling, P. Courcoux, H.J.H. MacFie, Defining the underlying sensory dimensions, Food Qual. Prefer. 11 (2000) 151–154.
[30] G. Mazerolles, M.F. Devaux, E. Dufour, E.M. Qannari, P. Courcoux,Chemometric methods for the coupling of spectroscopic techniques and for the extraction of the relevant information contained in the spectral data table, Chemometrics Intell. Lab. Syst 63 (2002) 57-68.
[31] J. Maalouly, N. Hayeck, A. Kassouf, D.N. Rutledge, V. Ducruet, Chemometric Tools to Highlight Possible Migration of Compounds from Packaging to Sunflower Oils, J. Agric. Food. Chem 61 (2013) 10565-10573.
[32] E. Dubin, M. Spiteri, A.S. Dumas, J. Ginet, M. Lees, D.N. Rutledge, Common components and specific weights analysis: A tool for metabolomic data pre-processing, Chemometrics Intell. Lab. Syst 150 (2016) 41-50.
[33] M.B. Wilk, Gnanades.R, Probabolity ploting methods for analysis of data, Biometrika 55 (1968) 1-17.
[34] R. Perestrelo, A.S. Barros, S.M. Rocha, J.S.Camara, Optimisation of solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry based methodology to establish the global volatile signature in pulp and skin of Vitis vinifera L. grape varieties, Talanta 85 (2011) 1483-1493.
[35] S. Risticevic, J. Pawliszyn, Solid-Phase Microextraction in Targeted and Nontargeted Analysis: Displacement and Desorption Effects, Anal. Chem 85 (2013) 8987-8995.
[36] J. Ruiz, J. Ventanas, R. Cava, New device for direct extraction of volatiles in solid samples using SPME, J. Agric. Food. Chem 49 (2001) 5115-5121.
[37] H.J. Liu, H. Wang, C.X. Li, L.C. Wang, Z.F. Pan, L.L. Wang, Investigation of volatile organic metabolites in lung cancer pleural effusions by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry, J. Chromatogr. B 945 (2014) 53-59.

[38] M.P. Gianelli, M. Flores, F. Toldra, Optimisation of solid phase microextraction (SPME) for the analysis of volatile compounds in dry-cured ham, J.Sci. Food. Agric 82 (2002) 1703-1709.
[39] M. Hakim,Y. Y. Broza, O. Barash, N. Peled, M. Phillips, A. Amann, H. Haick, Volatile Organic Compounds of Lung Cancer and Possible Biochemical Pathways, Chem. Rev 112 (2012) 5949-5966.
[40] S. Riazanskaia, G. Blackburn, M. Harker, D. Taylor, C.L.P. Thomas, The analytical utility of thermally desorbed polydimethylsilicone membranes for in-vivo sampling of volatile organic compounds in and on human skin, Analyst 133 (2008) 1020-1027.
[41] Y.Z. Liu, S. Muralidhara, J.V. Bruckner, M.G. Bartlett, Optimization, validation and application of a method for the determination of trichloroethylene in rat plasma by headspace solid-phase microextraction gas chromatography mass spectrometry, Biomed. Chromatogr 22 (2008) 977-984.
[42] N. Chandra, N.K. Jain, S. Sondhia, A.B. Srivastava, Deltamethrin Induced Toxicity and Ameliorative Effect of Alpha-Tocopherol in Broilers. Bull, Environ. Contam. Toxicol 90 (2013) 673-678.
[43] D. Arora, M.H. Siddiqui, P.K. Sharma, S.P. Singh, A. Tripathi, P. Mandal, U.S. Singh, P.K. Singh, Y. Shukla, Evaluation and physiological correlation of plasma proteomic fingerprints for deltamethrin-induced hepatotoxicity in Wistar rats, Life Sci 160 (2016) 72-83.
[44] J. Rudnicka, T. Kowalkowski, T. Ligor, B. Buszewski, Determination of volatile organic compounds as biomarkers of lung cancer by SPME-GC-TOF/MS and chemometrics, J. Chromatogr. B 879 (2011) 3360-3366.
[45] A. Fernandes, D. Mortimer, M. Rose, M. Gem, Dioxins (PCDD/Fs) and PCBs in offal: Occurrence and dietary exposure, Chemosphere 81 (2010) 536-540.
[46] J. Maervoet, S.G. Chu, S. De Vos, A. Covaci, S. Voorspoels, R. De Schrijver, P. Schepens, Accumulation and tissue distribution of selected polychlorinated biphenyl congeners in chickens, Chemosphere 57 (2004) 61-66.
[47] T. Abaffy, R. Duncan, D.D. Riemer, O. Tietje, G. Elgart, C. Milikowski, R.A. DeFazio. Differential Volatile Signatures from Skin, Naevi and Melanoma: A Novel Approach to Detect a Pathological Process. PLoS One 5 (2010) e13813.
[48] A.L. Donoho, R.J. Herberg, L.L. Zornes, R.L. Vanduyn, Excretion and tissue distribution of C-14-labeled monensin in chickens, J. Agric. Food Chem 30 (1982) 909-913.
[49] C. Wang, R.N. Feng, Y.Y. Li, Y.B. Zhang, Z. Kang, W. Zhang, D.J. Sun, The metabolomic profiling of serum in rats exposed to arsenic using UPLC/Q-TOF MS, Toxicol. Lett 229 (2014) 474-481.
[50] C.S. Wang, R. Dong, X.Y. Wang, A.L. Lian, C.J. Chi, C.F. Ke, L. Guo, S.S. Liu, W. Zhao, G.W. Xu, E.Y. Li, Exhaled volatile organic compounds as lung cancer biomarkers during one-lung ventilation, Sci Rep 4 (2014) 7312/ doi: 10.1038/srep07312.
[51] M.P. Hermo, J. Saurina, J. Barbosa, D. Barron, High-resolution mass spectrometry applied to the study of metabolome modifications in various chicken tissues after amoxicillin administration, Food Chem 153 (2014) 405-413.

Supplementary data for

Solid-phase microextraction set-up for the analysis of liver volatolome to detect livestock exposure to micropollutants

Jihéne Bouhlel [a,b], Jérémy Ratel [a], Said Abouelkaram [a], Frédéric Mercier [a], Angelique Travel [c], Elisabeth Baéza [d], Catherine Jondreville [d], Gaud Dervilly-Pinel [e], Philippe Marchand [e], Bruno Le Bizec [e,] Eric Verdon [f], Estelle Dubreil [f], Sophie Mompelat [f], Chanthadary Inthavong [g], Thierry Guérin [g], Douglas N. Rutledge[b], Erwan Engel [a*]

[a] *INRA, UR370 QuaPA, MASS laboratory, Saint-Genès-Champanelle, France*
[b]*INRA, UMR GENIAL, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Massy, France*
[c]*INRA, ITAVI, Centre de Tours, Nouzilly, France*
[d]*INRA, URA83, Nouzilly, France*
[e]*Oniris, LABERCA, Nantes, France*
[f]*ANSES, Reference laboratory for veterinary drug residues in food, Fougères, France*
[g]*ANSES, Laboratory for Food Safety, Maisons-Alfort, France*

Table S1. List of volatile organic compounds selected from literature data as candidate markers of pathologies or toxic agents

Compound	LRI [1]	Matrix	Study	Reference [2]
Butane	427	Breath	Lung cancer	Ulanowska *et al*., 2011 [52]*
Acetone	513	Breath	Lung cancer	Bajtarevic *et al*., 2009 [53]*
Pentane	466	Breath and cancer cells	Lung cancer	Hakim *et al*., 2012 [39]
Carbon disulfide	497	Breath	Lang cancer	Rudnicka *et al*., 2011 [44]
Acetic acid	521	Breath and cancer cells	Lung cancer	Hakim *et al*., 2012 [39]
2-Butanone	542	Breath and cancer cells	Lung cancer	Hakim *et al*., 2012 [39]
2-Butanol	551	Breath	Lung cancer	Song *et al*., 2010 [54]*
Propanoic acid	636	Breath and cancer cells	Lung cancer	Hakim *et al*., 2012 [39]
1-Penten-3-ol	640	Breath	Colorectal cancer	Amal *et al*., 2016 [55]*
2-Pentanone	651	Breath and cancer cells	Lung cancer	Hakim *et al*., 2012 [39]
Pentanal	654	Breath and cancer cells	Lung cancer	Hakim *et al*., 2012 [39]
Heptane	658	Pleural effusions	Lung cancer	Huang *et al*., 2016 [56]*
1-Pentan-1-ol	723	Breath	Colorectal cancer	Amal *et al*., 2016 [55]*
Toluene	730	Breath	Lung cancer	Poli *et al*., 2005 [57]*
1-Hexanol	823	Pleural effusions	Lung cancer	Liu *et al*., 2014 [37]
2-Butyl-furan	849	Breath and cancer cells	Lung cancer	Hakim *et al*., 2012 [39]
Benzaldehyde	923	Urine	Oxidative stress	Anton *et al*., 2014 [24]
1-Octen-3-one	930	Blood	Exposure to genotoxic agents	Carlsson *et al*., 2016 [58]*
1-Octen-3-ol	932	Blood	Parkinson's disease	Khatib *et al*., 2014 [6]
2-Pentyl-furan	945	Breath and cancer cells	Lung cancer	Hakim *et al*., 2012 [39]
Octanal	953	Breath and cancer cells	Lung cancer	Hakim *et al*., 2012 [39]
Nonanal	1054	Breath and cancer cells	Smoking habits	Hakim *et al*., 2012 [39]

[1] Linear retention indices determined on a Rxi-5SilMS capillary column
[2] Literature references where compounds were stated as candidate markers

* References for Table S1 only

[52] A. Ulanowska, T. Kowalkowski, E. Trawinska, B. Buszewski, The application of statistical methods using VOCs to identify patients with lung cancer, J. Breath Res 5 (2011) 046008.
[53] A. Bajtarevic, C. Ager, M. Pienz, M. Klieber, K. Schwarz, M. Ligor, T. Ligor, W. Filipiak, H. Denz, M. Fiegl, W. Hilbe, W. Weiss, P. Lukas, H. Jamnig, M. Hackl, A. Haidenberger, B. Buszewski, W. Miekisch, J. Schubert, A. Amann, Noninvasive detection of lung cancer by analysis of exhaled breath, BMC Cancer 9 (2009) 348.
[54] G. Song, T. Qin, H. Liu, G.B. Xu, Y.Y. Pan, F.X. Xiong, K.S. Gu, G.P. Sun, Z.D. Chen, Quantitative breath analysis of volatile organic compounds of lung cancer patients, Lung Cancer. 67 (2010) 227-231.
[55] H. Amal, M. Leja, K. Funka, I. Lasina, R. Skapars, A. Sivins, G. Ancans, I. Kikuste, A. Vanags, I. Tolmanis, A. Kirsners, L. Kupcinskas, H. Haick, Breath testing as potential colorectal cancer screening tool, Int. J. Cancer 138 (2016) 229-236.
[56] Z.P. Huang, J. Zhang, P.P. Zhang, H. Wang, Z.F. Pan, L.L. Wang, Analysis of volatile organic compounds in pleural effusions by headspace solid-phase microextraction coupled with cryotrap gas chromatography and mass spectrometry, J. Sep. Sci 39 (2016) 2544-2552.
[57] D. Poli, P. Carbognani, M. Corradi, M. Goldoni, O. Acampa, B. Balbi, L. Bianchi, M. Rusca, Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study, Respir. Res 6 (2005) 71.
[58] H. Carlsson, M. Törnqvist, Strategy for identifying unknown hemoglobin adducts using adductome LC-MS/MS data: Identification of adducts corresponding to acrylic acid, glyoxal, methylglyoxal, and 1-octen-3-one, Food Chem. Toxicol 92 (2016) 94-103.

Table S2. Influence of the type of SPME fiber on the volatolome extracted from chicken liver: comparison of peak areas (× 10^4) and relative standard deviations of VOCs in liver samples analyzed by GC-MS after extraction for 30 minutes at 40°C with CAR-PDMS or DVB-CAR-PDMS SPME fibers

Candidate VOC markers [1]	CAR-PDMS [2]	DVB-CAR-PDMS [2]
Butane	1689.3 (22)	37.6 (21)
Acetone	4361.6 (21)	4104.6 (18)
Pentane	2630.6 (14)	62.4 (16)
Carbon disulfide	337.9 (25)	104.4 (16)
Acetic acid	2055.8 (19)	358.3 (50)
2-Butanone	226.2 (53)	41.3 (40)
2-Butanol	62.3 (19)	7.9 (23)
Propanoic acid	300.9 (25)	49.2 (72)
1-Penten-3-ol	117.6 (74)	70.3 (20)*
2-Pentanone	54.1 (72)	25.8 (22)*
Pentanal	101.7 (40)	71.9 (27)*
Heptane	237.3 (21)	95.5 (10)
1-Pentan-1-ol	33.1 (49)	21.6 (38)*
Toluene	280.8 (11)	164.6 (21)
1-Hexanol	219.7 (66)	616.3 (43)
2-Butyl-furan	8.8 (29)	17.2 (20)
Benzaldehyde	166.7 (29)	486.5 (39)
1-Octen-3-one	4.4 (50)	2.6 (25)*
1-Octen-3-ol	1.3 (22)	2.4 (34)
2-Pentyl-furan	0.3 (16)	0.9 (51)
Octanal	2.4 (22)	6.5 (39)
Nonanal	5.9 (14)	42.5 (45)

[1] Compounds listed in Table S1 which have been already identified in the literature as candidate volatile markers of pathologies or exposure to toxic agents.
[2] Values (× 10^4) are the average of 5 replicates with relative standard deviation (%RSD) in brackets.
* annotate the compounds for which there is statistical difference according to Student t-test ($p<0.05$).

Section S3. Details on the set-up of the xenobiotic analysis (deltamethrin, NDL-PCB, monensin) by reference methods in feed and tissue samples.

Deltamethrin was analyzed by ANSES (Maisons-Alfort, France) according to method CPG-SM NF EN 15662 for feed (LOD=0.02 mg/kg feed) and method ANSES PBM Pest LSA-INS-0179 for muscle tissue (LOD=0.001 mg/kg fresh muscle tissue); isotopic dilution as well as matrix matched calibration were implemented for quantification purposes.

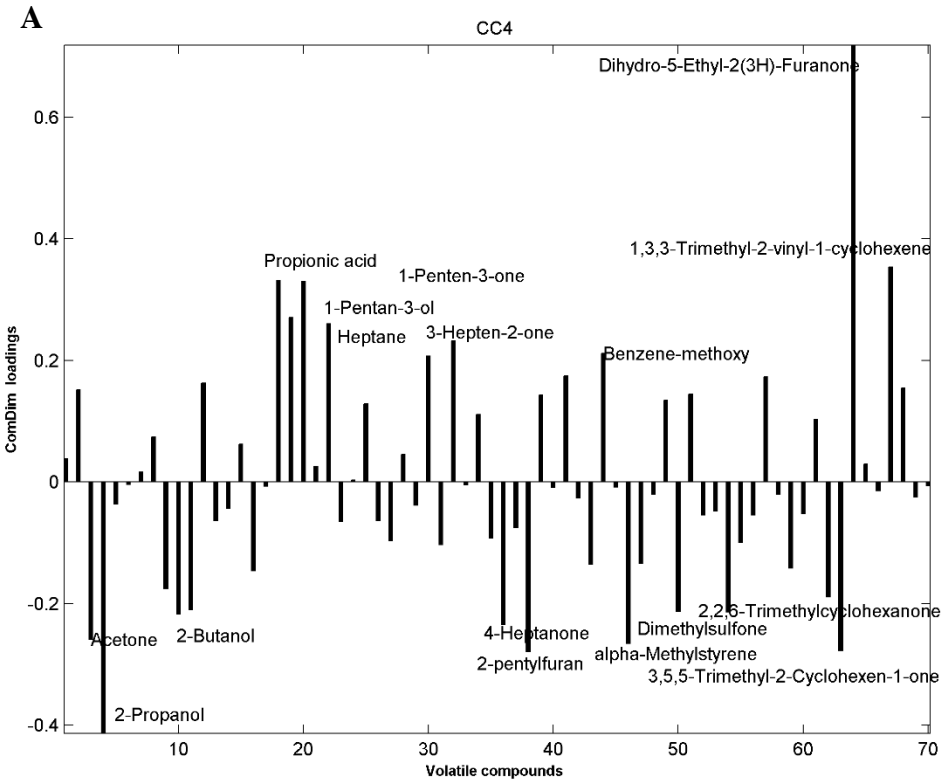
PCB-NDL congeners were analyzed by LABERCA (Nantes, France) by GC-HRMS in feed (LOD=0.01µg/kg feed) and muscle samples (LOD=0.3µg/kg lipid weight) through the implementation of validated and ISO17025 accredited methods, as fully described elsewhere (Cariou et al., 2010). 13C-labeled internal standards corresponding to each monitored congener were introduced into all samples before extraction for accurate quantification as required by the isotope dilution strategy.

Monensin was assayed by ANSES (Fougères, France) in feed samples according to the method CLHP-UV NF EN ISO 14183 (LOD=0.2 mg/kg feed) and in leg muscles according to method ANSES F/CHIM/SM/PTC/002 (LOQ=0.5 µg/kg fresh muscle tissue). The method has been validated according to the Decision 2002/657/CE and accredited against ISO17025. The required performance criteria of the method, as according to the Decision 2002/657/EC, were carefully examined and all quantitative results in terms of concentration were expressed in µg/kg fresh muscle tissue.

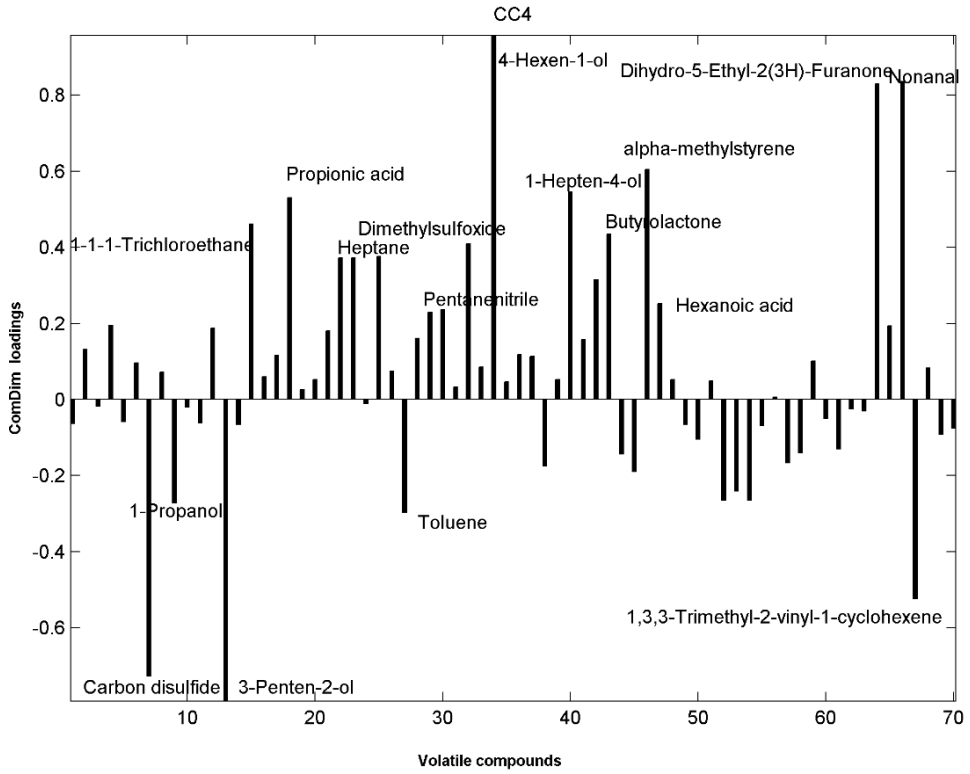
REFERENCE

R. Cariou, P. Marchand, A. Venisseau, A. Brosseaud, D. Bertrand, E. Qannari, J.P. Antignac, B. Le Bizec, Prediction of the PCDD/F and dl-PCB 2005-WHO-TEQ content based on the contribution of six congeners: Toward a new screening approach for fish samples, Environ. Pollut. 158 (2010) 941-947.

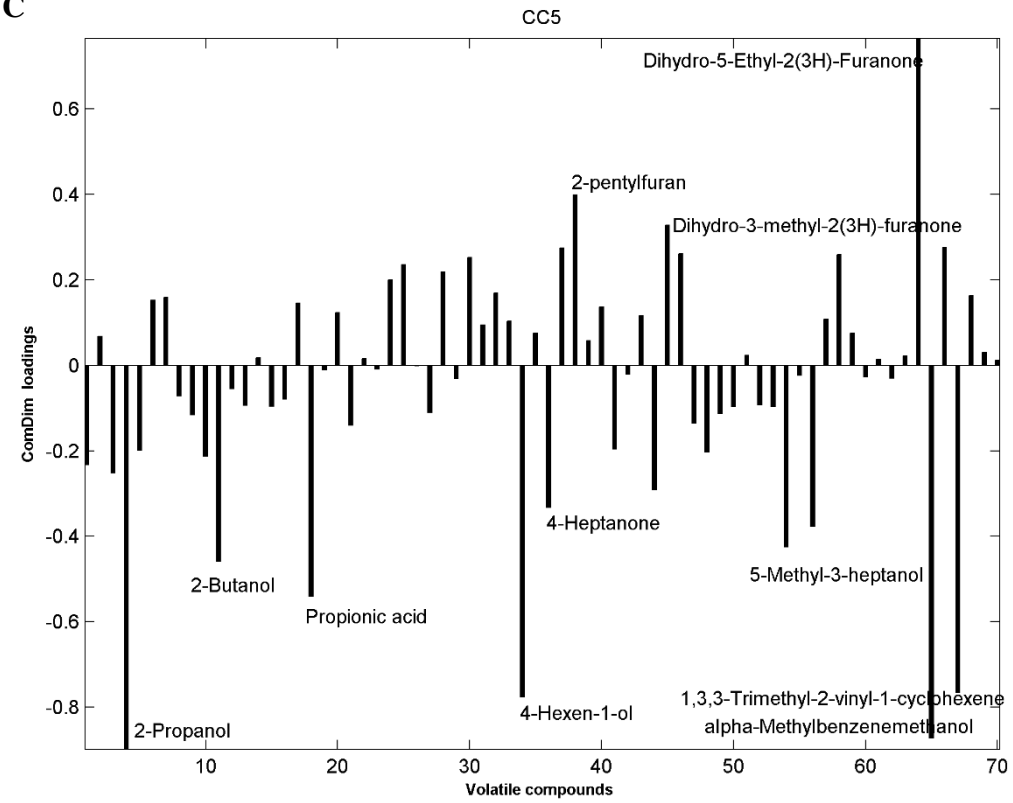
Figure S4. Contribution of ComDim loadings to each Common Component which separated an exposed group from the non-exposed group. The VOCs most contributing to each separation were selected based on standard deviations (±2×SD) of the loadings. **(A)** deltamethrin **(B)** PCBs **(C)** monensin



B


CC4
4-Hexen-1-ol
Dihydro-5-Ethyl-2(3H)-Furanone
Nonanal
alpha-methylstyrene
Propionic acid
1-Hepten-4-ol
Butyrolactone
Dimethylsulfoxide
Heptane
1-1-1-Trichloroethane
Pentanenitrile
Hexanoic acid
1-Propanol
Toluene
1,3,3-Trimethyl-2-vinyl-1-cyclohexene
Carbon disulfide
3-Penten-2-ol
ComDim loadings
Volatile compounds

C


CC5
Dihydro-5-Ethyl-2(3H)-Furanone
2-pentylfuran
Dihydro-3-methyl-2(3H)-furanone
4-Heptanone
2-Butanol
5-Methyl-3-heptanol
Propionic acid
1,3,3-Trimethyl-2-vinyl-1-cyclohexene
4-Hexen-1-ol
alpha-Methylbenzenemethanol
2-Propanol
ComDim loadings
Volatile compounds

Partie 2. Comparaison de stratégies chimiométriques non-supervisées pour révéler des discriminations et des marqueurs d'exposition dans des données volatolomiques. Article 2

Les méthodes chimiométriques multivariées exploratoires présentent un grand potentiel pour le traitement des données métabolomiques complexes telles que celles acquises par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse [6-8].

Afin d'identifier les marqueurs volatils distinctifs des groupes exposés et non exposés aux micropolluants, une mise au point méthodologique de la méthode de traitement des données a été réalisée dans le cadre de ce travail. En effet, les signatures volatolomiques collectées par SPME-GC-MS dans le foie des animaux exposés et non-exposés ont été traitées par trois méthodes chimiométriques non-supervisées ou exploratoires (c'est-à-dire sans information *a priori* sur l'identification des groupes d'individus).

Il s'agit de l'Analyse en Composantes Communes (ACC) [9], l'Analyse en Composantes Principales (ACP) [10] et l'Analyse en Composantes Indépendantes (ACI) [11]. En effet, l'ACP cherche les directions orthogonales de la plus grande dispersion des échantillons dans l'espace multidimensionnel défini par les variables d'origine. Les coordonnées des observations sur ces directions sont appelées 'Scores' et les contributions des variables d'origines à chaque direction ou composante principale sont appelées 'Loadings'. D'un autre côté, ACI vise à extraire les signaux sources mélangés dans des proportions inconnues dans les signaux observés constituant les lignes de la matrice des données. Les signaux sources sont comparables aux Loadings d'ACP et les proportions sont analogues aux Scores d'ACP. Quant à l'ACC, il s'agit d'une méthode d'analyse de données multi-blocs (ou multi-tables) qui calcule un espace commun à toutes les tables qui correspondent aux COVs, défini par un ensemble de dimensions orthogonales (composantes communes, CC). Chaque CC est le premier vecteur des scores normalisés extrait d'une matrice qui est la somme pondérée de la matrice de produit scalaire ($X X^T$) calculée à partir des tableaux d'origines.

Dans le cadre de ce travail de thèse, une nouvelle application de la méthode multi-blocs (ComDim) consiste à traiter chaque variable dans la matrice initiale par table. Ainsi, chaque table qui représente un COV est normalisée de sorte que les tables aient toutes la même importance initiale dans le calcul. Un processus itératif est appliqué pour estimer le poids ou la contribution

spécifique appelé 'Salience' de chaque tableau à la définition de chaque CC.

En outres, l'effet du prétraitement par autoscaling et pareto-scaling sur les données volatolomiques a été évalué. En effet, le prétraitement des données est bien connu dans le domaine métabolique comme une étape nécessaire qui peut avoir un impact significatif sur le résultat d'analyse des données [12]. Ces méthodes de prétraitement pondèrent les valeurs de chaque variable par un facteur de scaling qui donne plus de poids aux faibles intensités qui varient significativement. Le prétraitement par autoscaling consiste à diviser chaque variable centrée par son écart-type alors que la méthode pareto-scaling divise chaque variable centrée par la racine carrée de son écart-type, de sorte que les petits changements ne soient pas largement amplifiés [13].

Ces deux types de prétraitements ont été uniquement appliqués sur les données volatolomiques avant l'analyse par ACP et ACI, étant donné que le modèle d'ACC comporte une première étape de normalisation des variables.

Cette étude est présentée dans ***l'article 2*** intitulé « Comparison of Common Components Analysis with Principal Components Analysis and Independent Components Analysis: Application to SPME-GC-MS Volatolomic Signatures », et publié au journal *Talanta*.

Comparison of Common Components Analysis with Principal Components Analysis and Independent Components Analysis: Application to SPME-GC-MS Volatolomic Signatures

Jihéne Bouhlel[a,b], Delphine Jouan-Rimbaud Bouveresse[a], Said Abouelkaram[b], Elisabeth Baéza[c], Catherine Jondreville[c], Angélique Travel[c], Jérémy Ratel[b] , Erwan Engel[b], Douglas N. Rutledge[a,*]

[a] *INRA, UR370 QuaPA, MASS laboratory, Saint-Genès-Champanelle, France*
[b] *INRA, UMR GENIAL, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Massy, France*
[c] *INRA, ITAVI, Centre de Tours, Nouzilly, France*

*Corresponding author: Phone: + (33)144081648; E-mail: douglas.rutledge@agroparistech.fr

ABSTRACT

The aim of this work is to compare a novel exploratory chemometrics method, Common Components Analysis (CCA), with Principal Components Analysis (PCA) and Independent Components Analysis (ICA). CCA consists in adapting the multi-block statistical method known as Common Components and Specific Weights Analysis (CCSWA or ComDim) by applying it to a single data matrix, with one variable per block. As an application, the three methods were applied to SPME-GC-MS volatolomic signatures of livers in an attempt to reveal volatile organic compounds (VOCs) markers of chicken exposure to different types of micropollutants.

An application of CCA to the initial SPME-GC-MS data revealed a drift in the sample Scores along CC2, as a function of injection order, probably resulting from time-related evolution in the instrument. This drift was eliminated by orthogonalization of the data set with respect to CC2, and the resulting data are used as the orthogonalized data input into each of the three methods. Since the first step in CCA is to norm-scale all the variables, preliminary data scaling has no effect on the results, so that CCA was applied only to orthogonalized SPME-GC-MS data, while, PCA and ICA were applied to the "orthogonalized", "orthogonalized and Pareto-scaled", and "orthogonalized and autoscaled" data. The comparison showed that PCA results were highly dependent on the scaling of variables, contrary to ICA where the data scaling did not have a strong influence. Nevertheless, for both PCA and ICA the clearest separations of exposed groups were obtained after autoscaling of variables. The main part of this work was to compare the CCA results using the orthogonalized data with those obtained with PCA and ICA applied to orthogonalized and autoscaled variables. The clearest separations of exposed chicken groups were obtained by CCA. CCA Loadings also clearly identified the variables contributing most to the Common Components giving separations. The PCA Loadings did not highlight the most influencing variables for each separation, whereas the ICA Loadings highlighted the same variables as did CCA. This study shows the potential of CCA for the extraction of pertinent information from a data matrix, using a procedure based on an original optimization criterion, to produce results that are complementary, and in some cases may be superior, to those of PCA and ICA.

Keywords: Common Components Analysis (CCA), Independent Components Analysis (ICA), Principal Components Analysis (PCA), SPME-GC-MS, Volatolomic, Liver Markers

1. Introduction

The objective of the present work is to compare three exploratory multivariate data analysis methods, Principal Components Analysis (PCA), Independent Components Analysis (ICA) and Common Components Analysis (CCA), which are based on very different optimisation criteria.
The multi-block statistical method known as Common Components and Specific Weights Analysis (CCSWA, or ComDim) is normally applied to a set of different matrices describing the same samples [1]. The method may also be applied to a single data matrix segmented into blocks. The ultimate segmentation procedure would consist in having just one variable in each "block". This yields a novel multivariate method. The authors propose to call this method Common Components Analysis (CCA) in order to highlight the communality of the 3 methods (PCA, ICA and CCA) and also clearly distinguish this single-block method from the standard multi-block Common Components and Specific Weights Analysis procedure.
The three methods PCA, ICA and CCA will be applied to a data set of GC-MS spectral features for metabolites generated in the livers of chickens exposed to different types of micropollutants. It will be shown that Common Components Analysis improves the non-oriented extraction of information from the data. As with PCA and ICA, no prior information concerning the groups of samples is required for the calculations, but it may be used for subsequent interpretation of the Scores.
Livestock exposure to xenobiotics from the environment or feed is a major route for their transfer to animal-derived products which could then constitute a risk to human health [2]. Omics approaches have become a key tool in many research fields including disease diagnoses (e.g. cancers) [3,4], natural product discovery [5] and toxicology [6]. They can be used in analysing the different transcriptomic [7], proteomic [8] and metabolomic [9] profiles of the tissues and fluids of livestock exposed to toxic substances in order to identify markers of contamination. Several recent studies have shown the particular utility of volatile organic compounds (VOCs) for detecting health disorders [10-12] and exposure of livestock to contaminants [13].
Gas chromatography coupled to mass spectrometry has been shown to be useful to identify VOC markers responsible for the differences between exposed and non-exposed chickens [14].
In this study, a solid-phase microextraction coupled to gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) procedure was used to collect the volatolomic signatures of a set of liver samples from control chickens and chickens intentionally fed with diets contaminated by micropollutants [14]. The contaminants under study were a heavy metal, cadmium; an

environmental micropollutant, a mixture of non-dioxin-like polychlorinated biphenyls (NDL-PCBs); two pesticides, lindane and deltamethrin; two mycotoxins, fumonisins and zearalenone; a coccidiostatic agent, sodium monensin; and an antibiotic, ampicillin.

The collected SPME-GC-MS signatures were treated by applying three unsupervised chemometrical methods, Common Components Analysis (CCA) [15], Principal Components Analysis (PCA) [16] and Independent Components Analysis (ICA) [17a, 17b]. The objective was to compare the results obtained using CCA with those to be had with the two other more commonly used exploratory multivariate methods, PCA and ICA.

As the latter two methods have been widely used, they will only be presented briefly below. Suffice it to say here that PCA searches for orthogonal directions of greatest dispersion of the samples within the multidimensional space defined by the original variables. The coordinates of the observations on these PCA directions are called 'Scores' and the contributions of the original variables to the definition of these directions are the 'Loadings'. ICA on the other hand aims to extract the unknown source signals mixed together in unknown proportions in the observed signals that form the rows of the data matrix. The ICs or Source Signals are analogous to PCA Loadings and the corresponding Proportions (also called "mixing coefficients") are analogous to PCA Scores. Common Components and Specific Weights Analysis (CCSWA or ComDim) is an unsupervised, multi-block (or multi-table) data analysis method developed in the context of sensory profiling for the simultaneous analysis of several data tables describing the same observations [1]. The method has also been applied in chemometrics [18,19], and metabolomics [20]. ComDim calculates a space, common to all the tables, defined by a set of orthogonal dimensions (common components, CCs). Each CC is the first normed Scores vector of a weighted sum of matrices calculated from the original data tables (as will be explained in section 2.3.1). Each table is normed so that they all have the same initial importance in the calculations. An iterative process is used to estimate a specific weight or contribution (called *Salience*) for each table to the definition of each CC. Significant differences in the values of Saliences of the tables for a given CC reflect the fact that they do not all contribute equally to the construction of that dimension. The coordinates of the observations on the ComDim directions are called 'Scores'. The contributions of the variables in the normalized tables to the definition of these directions are the 'Loadings'. Within the context of this paper, Common Components Analysis corresponds to using ComDim for the analysis of a single data matrix, with a single variable in each table, so that each Common Component is the result of a weighted combination of variables where the weighting is greatest for variables giving the same dispersion of the observations; in other words each CC will group together variables that have

the same effect on the dispersion of the observations.

2. Materiel and Methods

2.1. Case-Control Animal Test

Animal experimentation was conducted from 5/11/2013 to 28/01/2014 in PEAT at INRA of Nouzilly (France; Accreditation C37-175-1, delivered on 28/08/2012) and was evaluated by ethics committee n°19 of Val de Loire and authorized under reference 01012.01 according to rural articles (R. 214-78 and R. 214-126). Ninety-six male chickens (*Gallus gallus*) (JA 657, Boyé Accouvage, La Boissière-en-Gâtine, France) were raised together until 28 days of age. They were then distributed into ten groups, one control group (n=15 chickens) and nine case groups, each being exposed to a diet contaminated with one type of micropollutant (n=9 chickens). The contaminants under study were chosen for the differences in their behaviour in the environment and the body (Supplementary Table 1). The concentrations in the feed were chosen to be at the maximum levels fixed by the regulations in poultry feed and sufficient to induce a response in the metabolism of exposed livestock. Animals showed no sign of any recognizable symptoms of toxicity throughout the course of the study and were found to consume feed materials normally, except for the death of one chicken exposed to zearalenone during breeding. At age 84 days, all the chickens were slaughtered, after fasting for 12 h, by electronarcosis followed by bleeding according to European recommendation standard conditions

2.2. Liver Volatolome Analysis

SPME-GC-MS signatures were collected in the livers of exposed and non-exposed chickens according to Bouhlel *et al*. [14]. Briefly, 1.2 g of NaCl prepared in saturated solution was added to 1.2 g of powdered liver before defrosting the samples for 24 h at 4°C and VOCs were extracted at 40°C for 30 min with CAR/PDMS SPME fibre. Volatolome SPME extraction was performed with a multipurpose sampler (AOC-5000, Shimadzu, Kyoto, Japan) and the desorbed VOCs were analyzed with a GC-MS QP2010+ (Shimadzu) equipped with Rxi-5SilMS column (60 m × 0.32 mm I.D × 1 µm film thickness) (Restek, Bellefonte, PA). Tentative identification of VOCs was performed on the basis of mass spectra, by comparison with the NIST/EPA/NIH mass spectral library (NIST14), and of retention indices (RI), by comparison with published RI values and with those of our in-house database. Peak areas of the volatile compounds were integrated with a home-made automatic algorithm developed under Matlab R2014b (The

MathWorks, Natick, USA) [14].

2.3. Chemometric Analysis

SPME-GC-MS signals were assembled into a (95 samples ×79 variables) matrix: each row contained the abundances of all the detected volatile metabolites in a given chicken liver, and each column represented one volatile metabolite extracted from all the liver samples.

The chemometric methods were performed using functions written in Matlab R2007b software (The MathWorks, Natick, USA).

2.3.1. Common Components and Specific Weights Analysis (CCSWA, or ComDim)

The objective of the original ComDim algorithm is to describe *m* data tables observed for the same *n* samples (i.e. a set of *m* data matrices, $\mathbf{X}_i$, with $1 \leq i \leq m$, each with *n* rows, but not necessarily the same number of columns). Components are iteratively extracted so as to correspond to the maximum amount of variance that is common to the largest number of tables. The method consists in determining a common space for all *m* data tables, with each matrix having a specific contribution ("Salience") to the definition of each dimension of this common space. The procedure iteratively calculates for each successive Common Component a common Scores vector (coordinates of the *n* samples along the direction defined by that Common Component).

The main idea of the ComDim procedure, as shown in Fig. 1 [21] for the case of two centered and normalized data blocks $\mathbf{X}_1$ and $\mathbf{X}_2$, is to calculate a matrix which is the weighted sum, $\mathbf{W_G}$, of the scalar matrices, $\mathbf{W_i}$, which may be seen as variance–covariance matrices based on the samples rather than the variables. The initial weighting for all tables being set to 1, the vector of Scores of the first normed Principal Component extracted from $\mathbf{W_G}$ is an initial estimate of the first Common Component. The weight, or Salience (λ_i), of each block $\mathbf{W_i}$ is then recalculated from these Scores. The estimation of the common Scores vector and the Saliences is optimized by iterative recalculations until convergence. After computation of the first CC, each original matrix $\mathbf{X_i}$ is deflated, and the procedure repeated for the calculation of the second CC, and so forth [1].

The algorithm is described step-by-step in Fig. 1:

Step 1. Centre each table and divide each value by the table norm.

Step 2. Calculate the matrix $\mathbf{W_i} = \mathbf{X_i}\,\mathbf{X_i}^T$, for each table.

Step 3. Multiply each matrix $\mathbf{W_i}$ by its Salience λ_i (for the first iteration, all $\lambda_i = 1$), then sum the *m* weighted matrices to give $\mathbf{W_G}$.

Step 4. Calculate the first normed Scores vector CC of the matrix $\mathbf{W_G}$, $\mathbf{q}$, which corresponds to an estimation of the first CC.

Step 5. Recalculate the Saliences λ_i by pre- and post-multiplying each matrix $\mathbf{W_i}$ by the vector $\mathbf{q}$. The calculation of $\mathbf{W_G}$ and $\mathbf{q}$ are iterated until convergence, at which point the Scores of the first CC and the corresponding Saliences of all the blocks have been calculated.

Step 6. Once the first CC is calculated, the matrices $\mathbf{X_i}$ are all deflated and the process is repeated until the required number of CCs, *ndim*, is extracted. All $\mathbf{q}$ vectors obtained can be grouped into a Scores matrix $\mathbf{Q}$.

Finally, the dimensions obtained correspond to an optimal compromise among all data tables. Therefore, the projection of the Scores reflects the greatest dispersions of the samples common to the greatest number of data tables.

In order to study the contribution of the original variables to the directions described by the CCs, Loadings can be calculated as in PCA: $\mathbf{P}^T = (\mathbf{T}^T\mathbf{T})^{-1}\,\mathbf{T}^T\,\mathbf{X}$, where $\mathbf{T}$ is the PCA Scores matrix, and $\mathbf{P}$ is the PCA Loadings matrix.

Replacing the PCA Scores matrix $\mathbf{T}$ by the CCA Scores matrix $\mathbf{Q}$, and taking into account the fact that, by construction, $\mathbf{Q}$ is orthonormal, the Loadings matrix corresponding to the centered and normalized data table *i* is defined as: $\mathbf{P}_i = \mathbf{X}_i^T\,\mathbf{Q}$

This result gives a collection of Loadings matrices $\mathbf{P}_i$, each with as many rows as variables in the corresponding $\mathbf{X}_i$ data table, *ndim* columns.

To clearly distinguish this single-block method from the standard multi-block CCSWA procedure, the authors propose to call the method Common Components Analysis (CCA). Although the abbreviation CCA is already used for several methods (Canonical Correlation Analysis [22], Curvilinear Component Analysis [23], Constrained Components Analysis [24], Connected Component Analysis [25], Correlated Component Analysis [26], Correlative Component Analysis [27], ...), the authors believe that as long as the definition is clearly stated within the text, this should not be a problem for the reader.

CCA estimates a series of orthogonal Common Components (CCs) that are linear combinations with strong weighting of those variables with a similar effect on the dispersion of the samples, thus highlighting variables that behave in the same way as a function of differences among the samples. CCA calculates enough CCs which cover all sources of variations. As there is only one variable per table, the Saliences are directly related to the Loadings as their square. For this reason, although the iterative optimisation of the Saliences is the basis of the calculation of the Common Components in both CCSWA and CCA, in the latter case only the Loadings need to be examined.

In our study, the Scores of the control and exposed chickens were plotted to detect those CCs giving a separation of the groups. Furthermore, we use as many PCs and ICs for PCA and ICA analyses respectively, as the number of CCs determined with CCA.

The Loadings for each CC were plotted to visualize the influential variables corresponding to VOCs giving rise to group separations. The VOCs considered as contributing most to the discrimination for the separated group were those variables with contributions greater than ± 2×SD (Standard Deviation) of the vectors of Loadings.

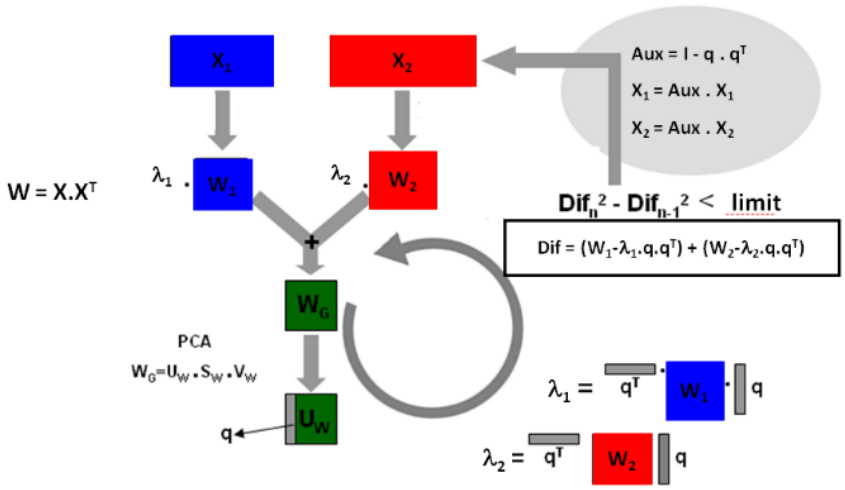


Fig. 1. Algorithm of the ComDim analysis in the case of two data blocks [21].

2.3.2. Principal Components Analysis (PCA)

PCA is an unsupervised exploratory method, which calculates a series of orthogonal axes (the Principal Components - PCs) as linear combinations of all the original variables, corresponding to the maximum dispersion of the samples in the original variables space. PCA produces orthogonal components by decomposing the initial data matrix **X** into a matrix product $\mathbf{T}.\mathbf{P}^T$ (the superscript "T" in $\mathbf{P}^T$ means "transposed matrix"). **T** is commonly named the Scores matrix. The Loadings matrix, **P**, shows which variables are responsible for the sample dispersions found in the Scores, **T** [28]. The Loadings of the VOCs for each PC were plotted to visualize the contribution of the VOCs to those PCs that discriminated the groups. The standard deviations of the PCA Loadings were calculated and the variables with contributions beyond plus or minus two standard deviations (± 2×SD) were selected as candidate markers for the corresponding separated groups.

2.3.3. Independent Components Analysis (ICA)

Independent Components Analysis is a blind source separation (BSS) technique.

It aims to extract the Source Signals (the Independent Components - ICs) and their Proportions (or mixing coefficients) from the matrix of mixture signals, by calculating a linear transformation that maximizes a criterion measuring the statistical independence among the sources [29]. ICs are in fact linear combinations of the original variables that have maximum non-gaussianity and therefore maximum independence.

In the present study, Joint Approximate Diagonalization of Eigenmatrices (JADE) [17a, 17b] is used to calculate the ICs. JADE performs a joint diagonalization of matrices of the fourth-order cumulants calculated from the data and does not require any gradient searches, thus avoiding the convergence problems encountered with other procedures. If the volatolomic signature of a group contains a characteristic source signal, the corresponding proportions for the observations in that group will be different from the others. This could help in distinguishing exposed chickens from the controls and in identifying promising VOC markers.

The choice of the number of components to use in ICA is a crucial point in the analysis. In this work, the number of ICs extracted was set to the same value as the number of CCs in the CCA. ICA Source Signals (ICs) corresponding to VOCs were plotted for each IC. Candidate markers for the separated groups were identified in the same way as for PCA and CCA.

2.3.4. Autoscaling and Pareto Scaling of the SPME-GC-MS Data

Data pretreatment is well-known in the metabolomic field as a necessary step which may have a significant impact on the outcome of metabolomic data analysis [30,31]. Scaling methods are data pretreatment approaches that weight the values for each variable by a scaling factor with the aim of giving more weight to small but potentially significant changes in intensity. For example, one type of regularly-used scaling, called autoscaling (also called Unit variance scaling, Studentising, Standardization or Z-transformation), is performed by dividing the centered variables by their standard deviation. Pareto scaling [32] is a pretreatment method that is very similar to autoscaling, except that the square root of the standard deviation is used so that small changes are not amplified as much [30].

Since the first step in CCA is to norm-scale each variable, preliminary data scaling has no effect on the results, whereas PCA and ICA were tested on Pareto-scaled and autoscaled variables.

2.3.5. Comparison of PCA, ICA and CCA Results

One-way ANOVA tests ($p<0.05$) were performed to compare the observed separations [13]. An F-test was applied to compare the inter-group and intra-group variances of the Scores along the interesting components for CCA, PCA and ICA. Higher F values indicate better discrimination of the groups. For the Loadings vectors corresponding to each separation, an empirical Signal/Noise ratio was also calculated by dividing the highest absolute peak contribution by the standard deviation of the contributions of all the other peaks. If a small number of peaks contribute a lot to the Loadings while the rest are of very low intensity, this ratio will be high. Thus, this Signal/Noise criterion could be an indicator to distinguish simpler Loadings vectors with a small number of relatively intense peaks from complex, possibly noisy, vectors with many peaks of comparable intensities.

3. Results and discussion

3.1. Common Components Analysis

16 CCs were extracted to be sure to detect all the interesting sample dispersions. An initial application of CCA to the data revealed a drift in the sample Scores along CC2, as a function of injection order, probably resulting from time-related evolution in the instrument (Supplementary Fig .1). Before proceeding further, this drift was eliminated by orthogonalization of the data set with respect to CC2 using the procedure developed by Dubin *et al*. [15]. CCA was then applied using 16 CCs to detect all the interesting sample dispersions (Supplementary Fig .2). CCA split the samples into two subgroups along CC6 (Fig. 2a). The first subgroup contains groups exposed to cadmium, PCB50 (50 µg NDL PCBs/kg), lindane, and ampicillin and the second subgroup includes the control, deltamethrin, PCB10, fumonisins, zearalenone, and monensin groups. This distribution suggests similarities in the liver volatolomic responses after exposure of chickens to contaminants in the first subgroup and similarities among those in the second subgroup and differences between the liver VOC signatures of the two subgroups. In particular, CC6 shows a separation of chickens exposed to PCB50 from the controls and the PCB10 group. A previous study has shown that animal exposure to PCBs had no influence on the liver volatile compound composition [13]. However, PCB10 and PCB50 levels used to spike chicken feeds in the present study were 100 and 500 fold higher than in that work, suggesting a dose-dependent release of VOCs in response to PCB exposure.

Thus, cadmium, PCB50, lindane, and ampicillin being together in the same subgroup would indicate they have a high toxic effect in the liver of exposed chickens, whereas deltamethrin, PCB10, fumonisins, zearalenone, and monensin induce a less toxic effect since these chickens were clustered with the controls. The plot of the CCA Loadings along CC6 (Fig. 2b) revealed the contribution of many variables to the subgroup separation. As seen in Fig. 2c, the VOCs that contributed most to the separation along CC6 (±2×SD) are 2-propanol, 1-penten-3-one, 2,5-dimethyl-1,5-hexadien-3-ol, butyrolactone, alpha-methylstyrene, and 1,3-dimethylcyclohexanol. These compounds have already been proposed as candidate markers of diseases, strengthening their potential as candidate makers to distinguish animal exposure to high toxic contaminants in the 1st subgroup from those of lower toxic effect in the 2nd subgroup [33,34].

Furthermore, the projection of the CCA Scores in Fig. 2a clearly separated the deltamethrin group from the others along CC7. The Loadings of CC7 (Fig. 2b) highlighted the contribution of several VOCs to the separation of the deltamethrin-exposed group, suggesting that specific differences in VOC levels occurred in the liver of chickens exposed to deltamethrin. Fig. 2c shows the projection of the most important VOCs for the separation of the deltamethrin group, corresponding to 2-propanol, carbon disulfide, 3-penten-2-ol, 4-hexen-1-ol, nonanal, and 1,3,3-trimethyl-2-vinyl-1-cyclohexene.

The projection of the CCA Scores along CC10 revealed a discrimination of the PCB10 group (Fig. 2a). The CCA Loadings along CC10 (Fig. 2b) show the contribution of many VOCs to the separation of the PCB10 group, the most important are annotated in Fig. 2c and correspond to 2-propanol, dimethylsulfone, methoxy-phenyl-oxime, dihydro-5-ethyl-furanone, 1,2,3-trimethyl-2-cyclohexane, and 3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one.

Similarly, CCA discriminated the monensin group and slightly separated the cadmium group along CC12 (Fig. 2a). The Loadings of CC12 (Fig. 2b) involved the contribution of many variables to the separation of the monensin and cadmium groups from the controls and the other exposed groups. The VOCs contributing most to CC12 (Fig. 2c) are 2-propanol, 2-methyl-1-propanol, o-xylene, 1,3,3-trimethyl-2-vinyl-1-cyclohexene, dihydro-3-methyl-2(3H)-furanone, and alpha-methylbenzenmethanol.

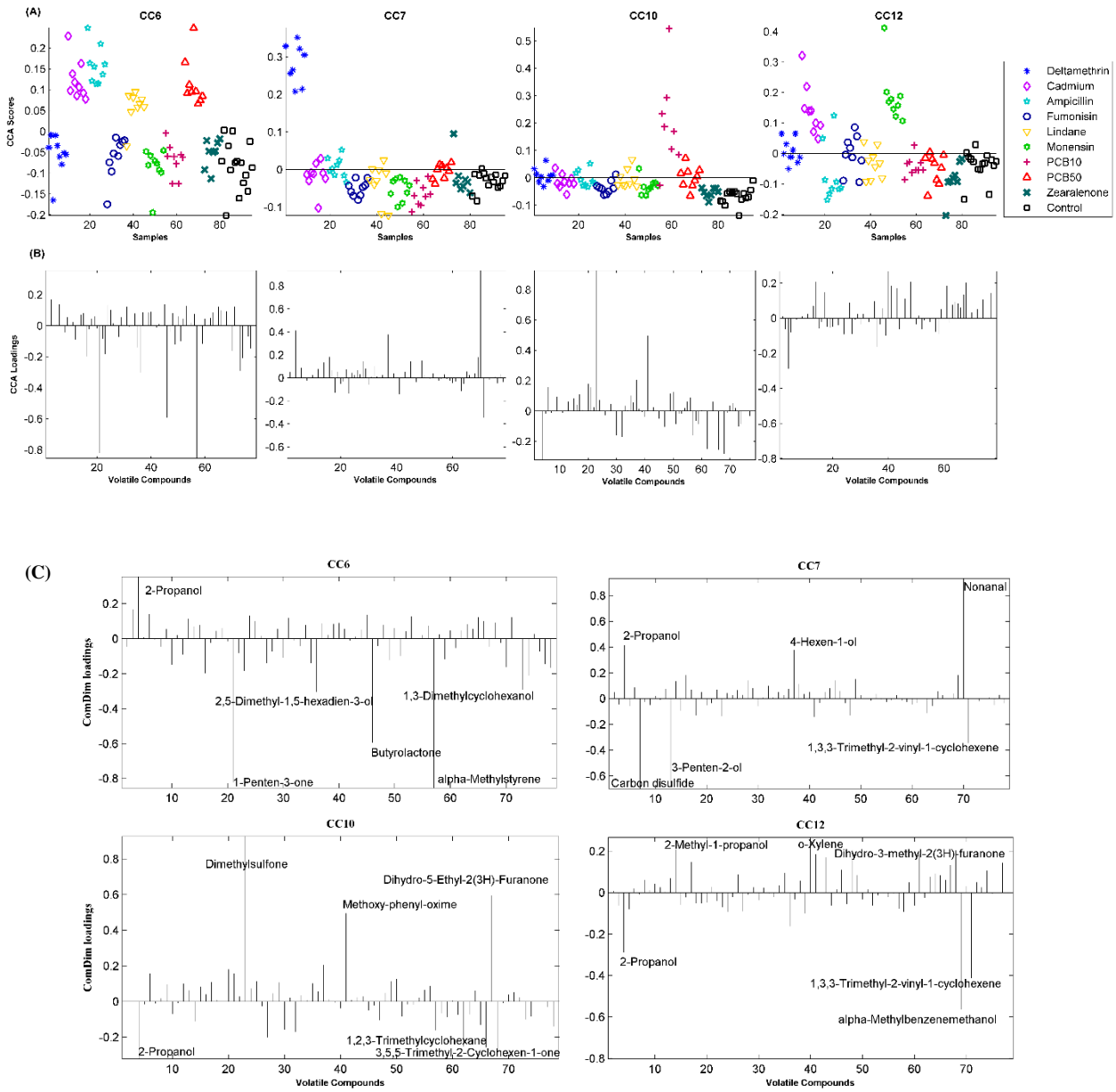


Fig. 2. Result of CCA on the orthogonalized SPME-GC-MS data in control and exposed chicken livers: (a) CCA Scores of control group and exposed groups along the interesting Common Components (CCs) CC6, CC7, CC10 and CC12; (b) CCA Loadings along CC6, CC7, CC10 and CC12; and (c) Labeled plots of CCA Loadings along CC6, CC7, CC10 and CC12.

3.2. Principal Components Analysis

PCA was first applied to the orthogonalized, the orthogonalized and Pareto-scaled, and the orthogonalized and autoscaled data. 16 Components were extracted, as in CCA. The quality of the separations of the groups of chickens clearly showed that autoscaling gave a better discrimination than no scaling and Pareto-scaling (Supplementary Table 2).

The projection of PCA Scores after autoscaling showed a separation of the PCB10 group on PC6, the deltamethrin group on PC7, deltamethrin, monensin and PCB10 on PC8 and a little separation of the cadmium and monensin groups on PC12 (Fig. 3a). The plot of the Loadings extracted by PCA for the autoscaled variables is given in Fig. 3b, showing the contribution of many variables (VOCs) for the interesting separations.

The results demonstrate the contribution of many variables (VOCs) to each separation along PC6, PC7, PC8 and PC12 (±2×SD) (Supplementary Fig .3). Thus, it is difficult to extract specific information about the most influential VOCs using PCA.

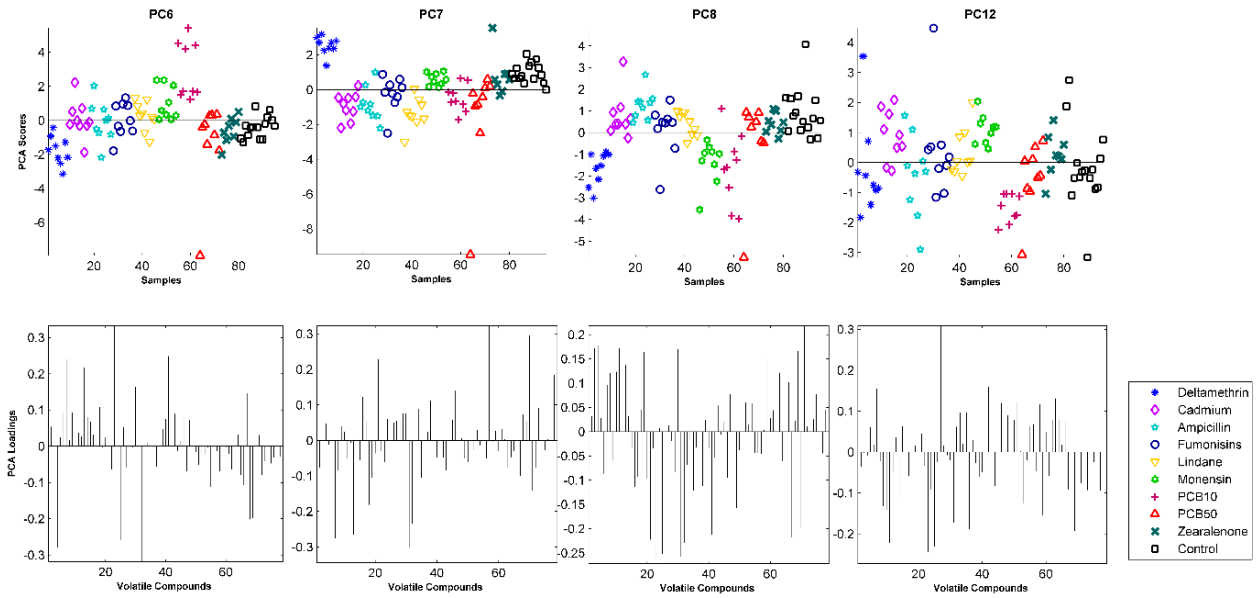


Fig. 3. Results of PCA on the orthogonalized and autoscaled SPME-GC-MS data collected in control and exposed chicken livers: (a) PCA Scores of control group and exposed group along the interesting Principal Components (PCs) PC6, PC7, PC8 and PC12; and (b) PCA Loadings along PC6, PC7, PC8 and PC12.

3.3. Independent Components Analysis

The ICA Proportions ('Scores') obtained for the orthogonalized, the orthogonalized and Pareto-scaled, and the orthogonalized and autoscaled data showed that the scaling had little effect on the separation of the chicken groups (Supplementary Table 2). Nevertheless, the clearest discriminations of the exposed groups are obtained using autoscaled variables. The projection of the ICA proportions calculated on autoscaled data along 16 ICs again showed a slight separation of the fumonisin, monensin and PCB10 groups along IC3 (Fig. 4a). In addition, there is a clear distinction of the group treated with deltamethrin along IC8 (Fig. 4a). The PCB10 group is clearly separated along IC10 (Fig. 4a).

The plots of Source Signals ('Loadings') extracted by ICA for the autoscaled variables are

given in Fig. 4b, showing the contribution of many variables (VOCs) for the interesting separations on IC3, IC8 and IC10.

As seen in Fig. 4c, the contributions to IC3 that were highly significant (±2×SD) correspond to 2-propanol, 1-penten-3-one, 4-hexen-1-ol, butyrolactone, alpha-methylstyrene, and 1,3-dimethylcyclohexanol, 2,5-dimethyl-1,5-hexadien-3-ol. For IC8, the most important contributions correspond to 2-propanol, carbon disulfide, 3-penten-2-ol, 4-hexen-1-ol, nonanal, and 1,2,3-trimethyl-2-vinyl-1-cyclohexene. As for IC10, the most important VOCs are 2-propanol, dimethylsulfone, 1,2,3-trimethylcyclohexene, dihydro-5-ethyl-2(3H)-furanone, methoxy-phenyl-oxime, and 3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one.

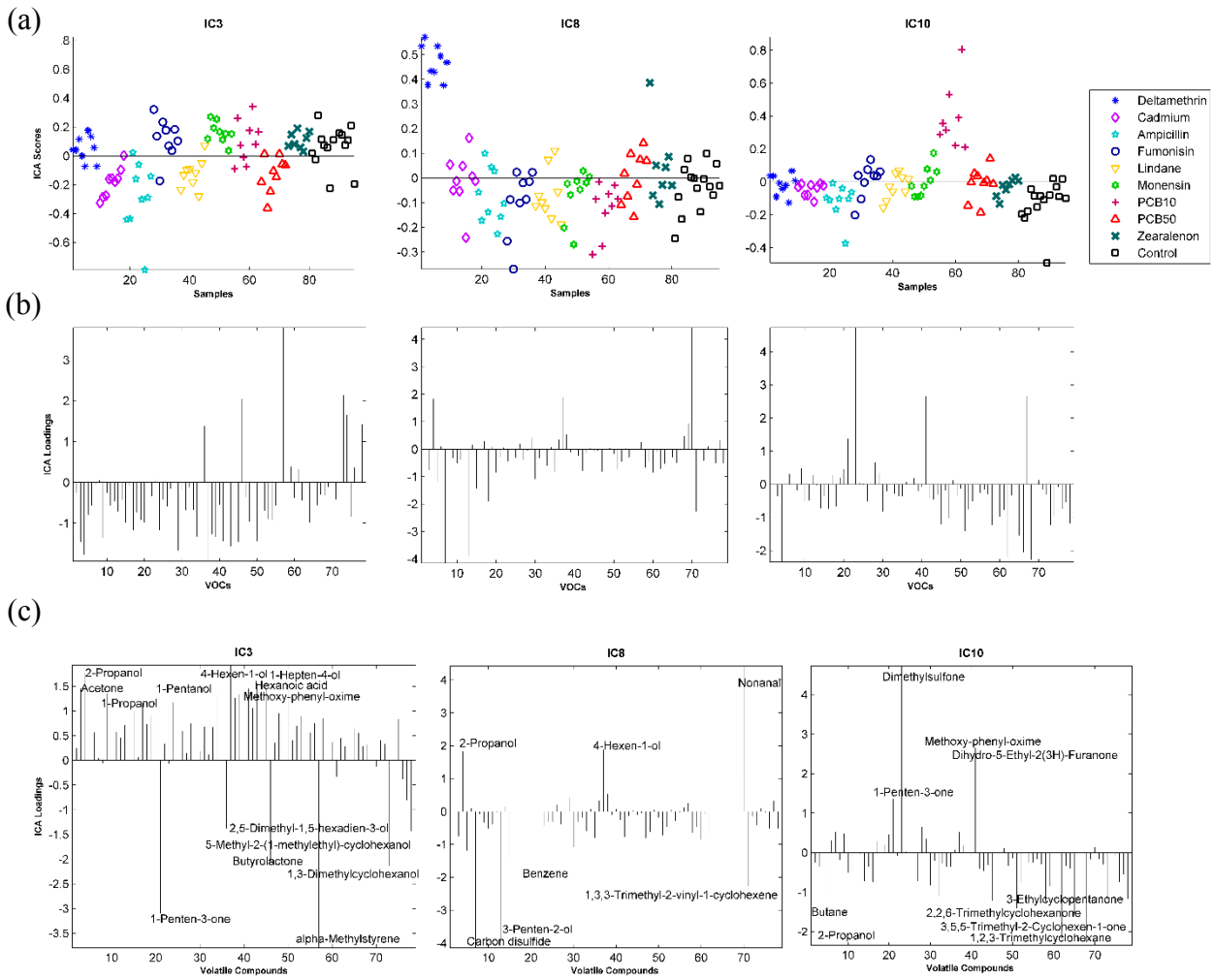


Fig. 4. Results of ICA on the orthogonalized and autoscaled SPME-GC-MS data in control and exposed chicken livers: (a) ICA proportions of control and exposed groups along the interesting Independent Components (ICs) IC3, IC8 and IC10; (b) ICA Source Signals along IC3, IC8 and IC10; and (c) Labeled plots of ICA Source Signals along IC3, IC8 and IC10.

3.4. Comparison of separations observed using PCA, ICA and CCA

The results of CCA applied on orthogonalized data were compared to PCA and ICA results for orthogonalized and autoscaled variables, which gave the clearest separations. Fig. 5 summarizes the projection of the Scores and the Loadings of each interesting separation obtained by CCA, PCA, and ICA.

To compare the discriminations obtained using CCA, PCA, and ICA, F values of the sub-group separations along CC6, PC8, and IC3 were calculated. The results in Table 1 show that the highest F value was obtained for CC6 (F = 280.37, compared to 78.26 for IC3 and 57.78 for PC8).

The projection of CCA Loadings and ICA Source Signals along CC6 and IC3 respectively, shows the relevance of the influencing variables (Fig. 5a). These results show that the influencing variables were similarly selected by CCA and ICA, and correspond to 2-propanol, 1-penten-3-one, butyrolactone, alpha-methylstyrene, 2,5-dimethyl-1,5-hexadien-3-ol, and 1,3-dimethyl-cyclohexanol. Furthermore, ICA Source Signals contained other less abundant variables along IC3 (Fig. 4c), which may explain the unclear separation shown in IC3 compared to that obtained along CC6. The empirical Signal/ Noise ratio of the Loading vectors corresponding to the separation along CC6 and IC3 were close but that for CC6 was slightly higher, and they were much higher than the ratio obtained for PC8 (Table 1).

In fact, the PC8 Loadings vectors showed many variables with strong contributions, making it difficult to extract specific information about the most influential VOCs.

Fig. 5b illustrated that deltamethrin exposed group was specifically separated by CCA long CC7, PCA along PC7, and ICA along IC8. As shown in Table 1, this separation of the deltamethrin group was better highlighted by CCA (F=518.45) and ICA (F=170.93) than by PCA (F=29.86).

In addition, the projection of the Loadings vectors along PC7 showed that many variables seem to influence the sample dispersion, thus the identification of the most influencing VOCs for the discrimination of deltamethrin group is difficult with PCA Loadings (Supplementary Fig .3). In contrast, the projections of the Loading vectors for CC7 (Fig. 2c) and IC8 (Fig. 4c) revealed the same influencing VOCs for the separation of the deltamethrin-exposed group. Table 1 showed that the S/N ratios obtained for CC7 and IC8 were close (5.73 and 5.16, respectively), and much higher than the value for PCA (3.21).

On the other hand, the results (Fig. 5c) showed a specific separation of the PCB10 group along PC6 (F=43.00), IC10 (F=137.41), and CC10 (F=165.26), respectively.

Again the PCA Loadings of PC6 did not highlight a small number of influential VOCs (Supplementary Fig .3).

The projection of the variables to IC10 (Fig. 4c) showed strong contributions similar to those in CC10, but with many other variables. Table 1 showed that the S/N ratios obtained for CC10 and IC10 were close (5.37 and 5.67, respectively), and much higher than the value for PC6 (3.10).

The results (Fig. 5d) show also that cadmium and monensin groups are slightly separated by PCA along PC12, but these groups are clearly discriminated by CCA along CC12, while no such separation was visible with ICA. The result in Table 1 show that the F value calculated on the Scores of CC12 is much higher (F=140.04) than that obtained for the separation of these groups along PC14 (F=15.49).

Based on the CCA Loadings vectors, the most influencing VOCs for the separation of the monensin and cadmium groups along CC12 are clearly identified (Fig. 2c). Again, the S/N ratio for CC12 (5.27) is higher than that for PC12 (2.86).

All these results show the interest of PCA, ICA, and CCA as exploratory chemometrical methods to reveal differences in liver volatolomic responses after exposure to different micropollutants, but the clearest separations were obtained for CCA Scores, and CCA Loadings highlighted better the most important variables contributing to the group separations. These results confirm the potential of CCA for clearly revealing significant differences in volatolomic signatures in response to chicken exposure to several types of contaminants, and to identify the VOCs contributing most to the Common Components giving separations.

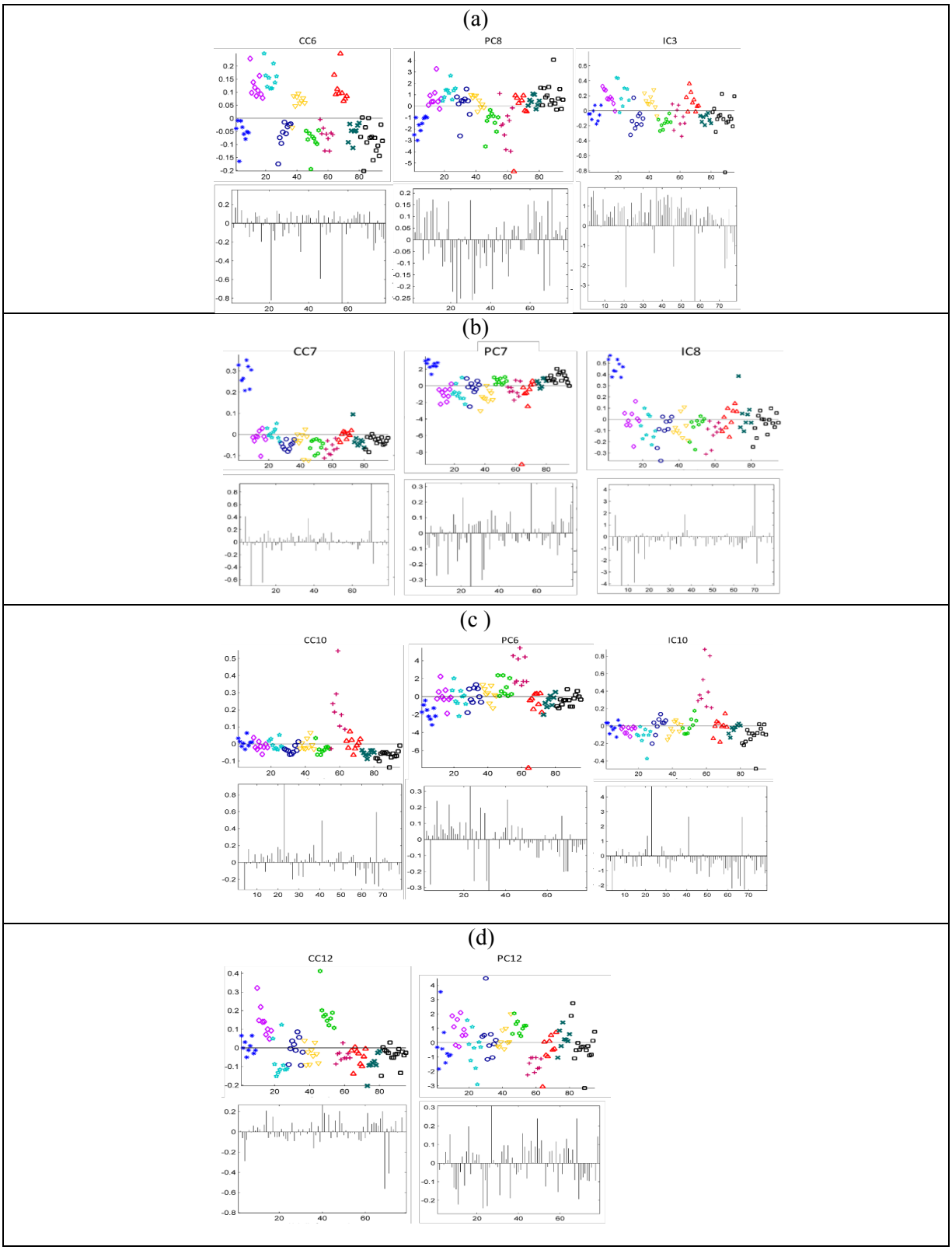


Fig. 5. Comparison of CCA results on the orthogonalized data with PCA and ICA result on the orthogonalized and autoscaled variables: (a) CCA, PCA, and ICA Scores and Loadings along CC6, PC8, and IC3, respectively; (b) CCA, PCA, and ICA Scores and Loadings along CC7, PC7, and IC8, respectively; (c) CCA, PCA, and ICA Scores and Loadings along CC10, PC6, and IC10, respectively; and (d) CCA and PCA Scores and Loadings along CC12 and PC12, respectively.

All these results show the interest of PCA, ICA, and CCA as exploratory chemometrical methods to reveal differences in liver volatolomic responses after exposure to different micropollutants, but the clearest separations were obtained for CCA Scores, and CCA Loadings highlighted better the most important variables contributing to the group separations. These results confirm the potential of CCA for clearly revealing significant differences in volatolomic signatures in response to chicken exposure to several types of contaminants, and to identify the VOCs contributing most to the Common Components giving separations.

Table 1. Comparison of the F values for one-way ANOVA ($p<0.05$) applied to the Scores and the empirical Signal/ Noise ratios of the Loadings corresponding to each group separation for CCA applied to orthogonalised data and for PCA and ICA applied to orthogonalised and autoscaled data.

	CCA[a]	**PCA**[b]	**ICA**[c]
2 Subgroups	*CC6*	*PC8*	*IC3*
F [d]	280.37	57.78	78.26
S/N [e]	4.63	2.48	4.25
Deltamethrin	*CC7*	*PC7*	*IC8*
F	518.45	29.86	170.93
S/N	5.73	3.21	5.16
PCB10	*CC10*	*PC6*	*IC10*
F	165.26	43.00	137.41
S/N	5.37	3.10	5.67
Cadmium+ Monensin	*CC12*	*PC12*	-
F	140.04	15.49	-
S/N	5.27	2.86	-

[a] Common Components Analysis

[b] Principal Components Analysis

[c] Independent Components Analysis

[d] calculation of the F value based on the variances of the scores obtained for each corresponding separated group or subgroup from the others.

[e] Empirical Signal/ Noise ratio based on the Loadings corresponding to each group separation for CCA, PCA and ICA.

4. Conclusion

PCA, ICA and CCA are unsupervised, exploratory multivariate data analysis methods based on entirely different optimisation criteria: PCA calculates Loadings vectors defining orthogonal directions in the multivariate space along which the samples are maximally dispersed; ICA extracts maximally non-gaussian, and therefore maximally independent, Loadings vectors; CCA calculates orthogonal Loadings that are weighted combinations of the largest number of variables for which the samples have the same maximal dispersion in the multivariate space. All three methods being exploratory, no information is introduced into the calculations concerning the existence of any groups of samples within the data set, their presence being decided *a posteriori* by the user examining the Scores plots.

This work compared the pertinence of the three methods to reveal differences in the SPME-GC-MS signatures of liver volatolome in response to animal exposure to a wide range of micropolluants.

Firstly, an orthogonalization was applied to the original data matrix in order to eliminate instrumental drifts.

The result of PCA showed that, in this particular application, autoscaled variables performed better than unscaled and Pareto-scaled variables, giving a clear separation of 4 exposed chicken groups. For ICA, data scaling did not strongly influence the results, but the clearest discriminations (4 groups) were also obtained using autoscaled variables.

Only CCA clearly revealed a special distribution of chicken groups into two subgroups.

PCA, ICA, and CCA similarly separated the deltamethrin- and PCB10-exposed groups. PCA and CCA separated the monensin- and cadmium-exposed groups, but these groups were not separated by ICA.

The Loadings plots of PCA did not clearly highlight the most influencing variables for each separation, but ICA and CCA both tended to highlight the same variables as promising volatile markers. However, the Source Signals extracted by ICA did not as clearly distinguish variables having a major contribution from those that are less significant, contrary to the CCA Loadings which revealed much more clearly the most contributing variables. As illustrated in this work, CCA modeling can be a powerful unsupervised, exploratory method.

An important point to be noted is that, as with PCA and ICA, the Loadings extracted by CCA can be used to calculate the Scores for new samples, which means that Common Components models can be used as the basis of Cross-Validation procedures or for prediction purposes to class new samples.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the French National Research Agency, project SOMEAT. Contact No. ANR-12-
1LID-0004. Safety of Organic Meat. Available at http://www.so-meat.fr.

REFERENCES

[1] E.M. Qannari, I.Wakeling, P. Courcoux, H.J.H. MacFie, Defining the underlying sensory dimensions, Food Qual. Prefer. 11 (2000) 151–154.

[2] E. Engel, J. Ratel, J. Bouhlel, C. Planche, M. Meurillon, Novel approaches to improving the chemical safety of the meat chain towards toxicants, Meat Sci. 109 (2015) 75-85.

[3] C.L. Silva, M. Passos, J.S. Camara, Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry, Br. J. Cancer. 105 (2011) 1894-1904.

[4] T. Basak, S. Varshney, S. Akhtar, S. Sengupta, Understanding different facets of cardiovascular diseases based on model systems to human studies: A proteomic and metabolomic perspective, J. Proteomics. 127 (2015) 50-60.

[5] J.W. Allwood, R. Goodacre, An Introduction to Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Instrumentation Applied in Plant Metabolomic Analyses, Phytochem. Anal. 21 (2010) 33-47.

[6] Y. Tang, R. He, J. Zhao, G. Nie, L. Xu, B. Xing, Oxidative stress-induced toxicity of CuO nanoparticles and related toxicogenomic responses in Arabidopsis thaliana, Environmental pollution. 212 (2016).

[7] M.E. Benarbia, D. Macherel, S. Faure, C. Jacques, R. Andriantsitohaina, Y. Malthiery, Plasmatic concentration of organochlorine lindane acts as metabolic disruptors in HepG2 liver cell line by inducing mitochondrial disorder, Toxicol. Appl. Pharmacol. 272 (2013) 325-334.

[8] D. Arora, M.H. Siddiqui, P.K. Sharma, S.P. Singh, A. Tripathi, P. Mandal, U.S. Singh, P.K. Singh, Y. Shukla, Evaluation and physiological correlation of plasma proteomic fingerprints for deltamethrin-induced hepatotoxicity in Wistar rats, Life Sci. 160 (2016) 72-83.

[9] A.A. O'Kane, O.P. Chevglier, S.F. Graham, C.T. Elliott, M.H. Mooney, Metabolomic Profiling of In Vivo Plasma Responses to Dioxin-Associated Dietary Contaminant Exposure in Rats: Implications for Identification of Sources of Animal and Human Exposure, Environ. Sci. Technol. 47 (2013) 5409-5418.

[10] S. Khatib, J.P.M. Finberg, F. Artoul, Y. Lavner, S. Mahmood, U. Tisch, H. Haick, Y. Aluf, J. Vaya, Analysis of volatile organic compounds in rats with dopaminergic lesion: Possible application for early detection of Parkinson's disease, Neurochem. Int. 76 (2014) 82-90.

[11] M. Kusano, E. Mendez, K.G. Furton, Development of headspace SPME method for analysis of volatile organic compounds present in human biological specimens, Anal. Bioanal. Chem. 400 (2011) 1817-1826.

[12] T. Khalid, R. Aggio, P. White, B. Costello, R. Persad, H. Al-Kateb, P. Jones, C.S. Probert, N. Ratcliffe, Urinary Volatile Organic Compounds for the Detection of Prostate Cancer, PLoS One. 10 (2015).

[13] P. Berge, J. Ratel, A. Fournier, C. Jondreville, C. Feidt, B. Roudaut, B. Le Bizec, E. Engel, Use of Volatile Compound Metabolic Signatures in Poultry Liver to Back-Trace Dietary Exposure to Rapidly Metabolized Xenobiotics, Environ. Sci. Technol. 45 (2011) 6584-6591.

[14] J. Bouhlel, J. Ratel, S. Abouelkaram, F. Mercier, A. Travel, E. Baéza, C. Jondreville, G. Dervilly-Pinel, P. Marchand, B.L. Bizec, E. Dubreil, S. Mompelat, E. Verdon, C. Inthavong, T. Guérin, D.N. Rutledge, E. Engel, Solid-phase microextraction set-up for the analysis of liver volatolome to detect livestock exposure to micropollutants, J. Chromatogr. A. (2017).

[15] E. Dubin, M. Spiteri, A.S. Dumas, J. Ginet, M. Lees, D.N. Rutledge, Common components and specific weights analysis: A tool for metabolomic data pre-processing, Chemometrics Intell. Lab. Syst. 150 (2016) 41-50.

[16] G. Musumarra, M. Fichera, Chemometrics and cultural heritage, Chemometrics Intell. Lab. Syst. 44 (1998) 363-372.

[17a] D.N. Rutledge, D.Jouan-Rimbaud Bouveresse, Independent Components Analysis with the JADE algorithm, Trac-Trends Anal. Chem. 50 (2013) 22-32.

[17b] D.N. Rutledge, D.Jouan-Rimbaud Bouveresse, Corrigendum to "Independent Components Analysis with the JADE algorithm", Trac-Trends Ananl. Chem. 67 (2015) 220.

[18] G. Mazerolles, M.F. Devaux, E. Dufour, E.M. Qannari, P. Courcoux, Chemometric methods for the coupling of spectroscopic techniques and for the extraction of the relevant information contained in the spectral data tables, Chemometrics Intell. Lab. Syst. 63 (2002) 57-68.

[19] J. Blackman, D.N. Rutledge, D. Tesic, A. Saliba, G.R. Scollary, Examination of the potential for using chemical analysis as a surrogate for sensory analysis, Anal. Chim. Acta. 660 (2010) 2-7.

[20] J.C. Martin, M. Maillot, G. Mazerolles, A. Verdu, B. Lyan, C. Migne, C. Defoort, C. Canlet, C. Junot, C. Guillou, C. Manach, D. Jabob, D. Jouan-Rimbaud Bouveresse, E. Paris, E. Pujos-Guillot, F. Jourdan, F. Giacomoni, F. Courant, G. Fave, G. Le Gall, H. Chassaigne, J.C. Tabet, J.F. Martin, J.P. Antignac, L. Shintu, M. Defernez, M. Philo, M.C. Alexandre-Gouaubau, M.J. Amiot-Carlin, M. Bossis, M.N. Triba, N. Stojilkovic, N. Banzet, R. Molinie, R. Bott, S. Goulitquer, S. Caldarelli, D.N. Rutledge, Can we trust untargeted metabolomics? Results of the metabo-ring initiative, a large-scale, multi-instrument inter-laboratory study, Metabolomics. 11 (2015) 807-821.

[21] R. Climaco Pinto, R, Development of new chemometric methods - application to the spectroscopic characterisation of food quality, AgroParisTech. (2009).

[22] Hotelling, H., 1936: Relations between two sets of variants, Biometrika, 28, 321-377

[23] P. Demartines and J. Hérault, The curvilinear component analysis, Int. Comput. Sci. Inst., Tech. Rep. TR-96-036, Sept. 1996

[24] Henk A. L. KiersYoshio TakaneJos M. F. ten Berge, The analysis of multitrait-multimethod matrices via constrained components analysis, Psychometrika (1996), 61, 4, 601–628

[25] A. Rosenfeld and J. L. Pfaltz, Sequential operations in digital picture processing, Journal of the ACM, (1966) 13, 471–494

[26] Bedini L., Salerno E. (2007) Extracting Astrophysical Sources from Channel-Dependent Convolutional Mixtures by Correlated Component Analysis in the Frequency Domain. In: Apolloni B., Howlett R.J., Jain L. (eds) Knowledge-Based Intelligent Information and Engineering Systems. KES 2007. Lecture Notes in Computer Science, vol 4694. Springer, Berlin, Heidelberg

[27] Yan Xuefeng, Yu Juan, Qian Feng, The feature-preserving map of high-dimensional complex chemical objects using non-linear map integrated with correlative component analysis, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 75 (2005) 13 – 22

[28] S. Wold, K. Esbensen, P. Geladi, Principal Component Analysis, Chemometrics Intell. Lab. Syst. 2 (1987) 37-52.

[29] G.Q. Wang, Q.Z. Ding, Z.Y. Hou, Independent component analysis and its applications in signal processing for analytical chemistry, Trac-Trends Anal. Chem. 27 (2008) 368-376.

[30] R.A. van den Berg, H.C.J. Hoefsloot, J.A. Westerhuis, A.K. Smilde, M.J. van der Werf, Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data, BMC Genomics. 7 (2006).

[31] A.K. Smilde, M.J. van der Werf, S. Bijlsma, B.J.C. van der Werff-van-der Vat, R.H. Jellema, Fusion of mass spectrometry-based metabolomics data, Anal. Chem. 77 (2005) 6729-6736.

[32] J. Xu, S.R. Van Doren, Binding Isotherms and Time Courses Readily from Magnetic Resonance, Anal. Chem. 88 (2016) 8172-8178.

[33] M. Hakim, Y.Y. Broza, O. Barash, N. Peled, M. Phillips, A. Amann, H. Haick, Volatile Organic Compounds of Lung Cancer and Possible Biochemical Pathways, Chem. Rev. 112 (2012) 5949-5966.

[34] J. Rudnicka, T. Kowalkowski, T. Ligor, B. Buszewski, Determination of volatile organic compounds as biomarkers of lung cancer by SPME-GC-TOF/MS and chemometrics, J. Chromatogr. B. 879 (2011) 3360-3366.

Supporting data for

Comparison of Common Components Analysis with Principal Components Analysis and Independent Components Analysis: Application to SPME-GC-MS Volatolomic Signatures

Jihéne Bouhlel[a,b], Delphine Jouan-Rimbaud Bouveresse[a], Said Abouelkaram[b], Elisabeth Baéza[c], Catherine Jondreville[c], Angélique Travel[c], Jérémy Ratel[b] , Erwan Engel[b], Douglas N. Rutledge[a,*]

[a] *INRA, UR370 QuaPA, MASS laboratory, Saint-Genès-Champanelle, France*
[b] *INRA, UMR GENIAL, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Massy, France*
[c] *INRA, ITAVI, Centre de Tours, Nouzilly, France*

Table 1. Analysis of micropollutant residues in feed of control and contaminated chickens: Maximum Levels and administered levels of the different micropollutants investigated in the current study.

Contaminant	EU legislation	ML[2]	Dose administrated
Cadmium	Directive. 2002/32/EC	0.5 mg kg^{-1}	7.5 mg kg^{-1}
Deltamethrin	Regulation. (EU) 524/2011	2 mg kg^{-1}	9 mg kg^{-1}
Lindane	Directive. 2002/32/EC	0.2 mg kg^{-1}	0.3 mg kg^{-1}
NDL[1] PCBs	Regulation. (EU) 277/2012	10 µg kg^{-1}	10 µg kg^{-1}
NDL PCBs	Regulation. (EU) 277/2012	10 µg kg^{-1}	50 µg kg^{-1}
Fumonisin	Recommendation 2006/576/EC	20 mg kg^{-1}	20 mg kg^{-1}
Zearalenone	Recommendation 2006/576/EC	0.5 mg kg^{-1}	0.5 mg kg^{-1}
Monensin	Regulation. (EC) 124/2009	125 mg kg^{-1}	125 mg kg^{-1}
Ampicillin	Recommended dosage	10 mg kg^{-1} body weight daily during 3 days	10 mg kg^{-1} body weight daily during the 3 days preceding slaughter

[1] NDL: non-dioxin-like

[2] ML: Maximum Levels

Table 2. Application of CCA, PCA, and ICA on the orthogonalized liver SPME-GC-MS signatures with respect to CC2: comparison of CCA applied for orthogonalized data, PCA and ICA used for orthogonalized, orthogonalized and Pareto-scaled, and orthogonalized and autoscaled data.

	CCA[a]	**PCA[b]**			**ICA[c]**		
	Orthogonalized	Orthogonalized	Orthogonalized +Pareto-scaled	Orthogonalized +autoscaled	Orthogonalized	Orthogonalized +Pareto-scaled	Orthogonalized +autoscaled
Cadmium	+++[G]			+[G]			
Deltamethrin	+++[S]			++[S]	++[S]	++[S]	+++[S]
Lindane	+++[G]						
PCB10	+++[S]	+[G]	+[G]	++[S]	++[S]	+++[S]	+++[S]
PCB50	+++[G]						
Fumonisin	+++[G]		+[G]		++[S]	++[S]	++[G]
Zearalenone	+++[G]						
Monensin	+++[G]	+[G]	+[G]	++[G]	++[G]	++[G]	++[G]
Ampicillin	+++[G]						

[a] Common Components Analysis
[b] Principal Components Analysis
[c] Independent Components Analysis
+ annotate a slight separation of the corresponding chicken group
++ annotate a good separation of the corresponding chicken group
+++ annotate a clear separation of the corresponding chicken group
[S] specific separation of the corresponding chicken group
[G] separation of the corresponding chicken group in a sub-group

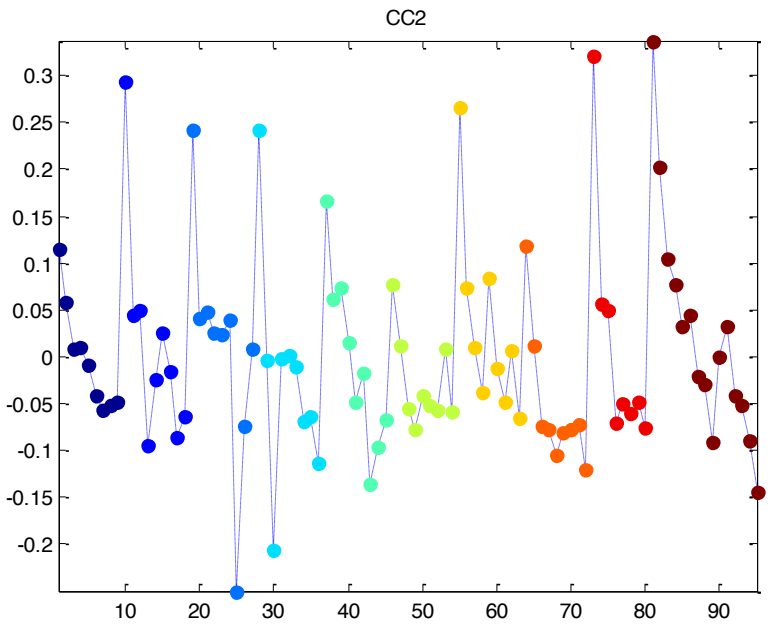


Fig. S1. Result of CCA on raw SPME-GC-MS data in control and exposed chicken livers: CCA scores along Common Component 2 as a function of injection order within each group.

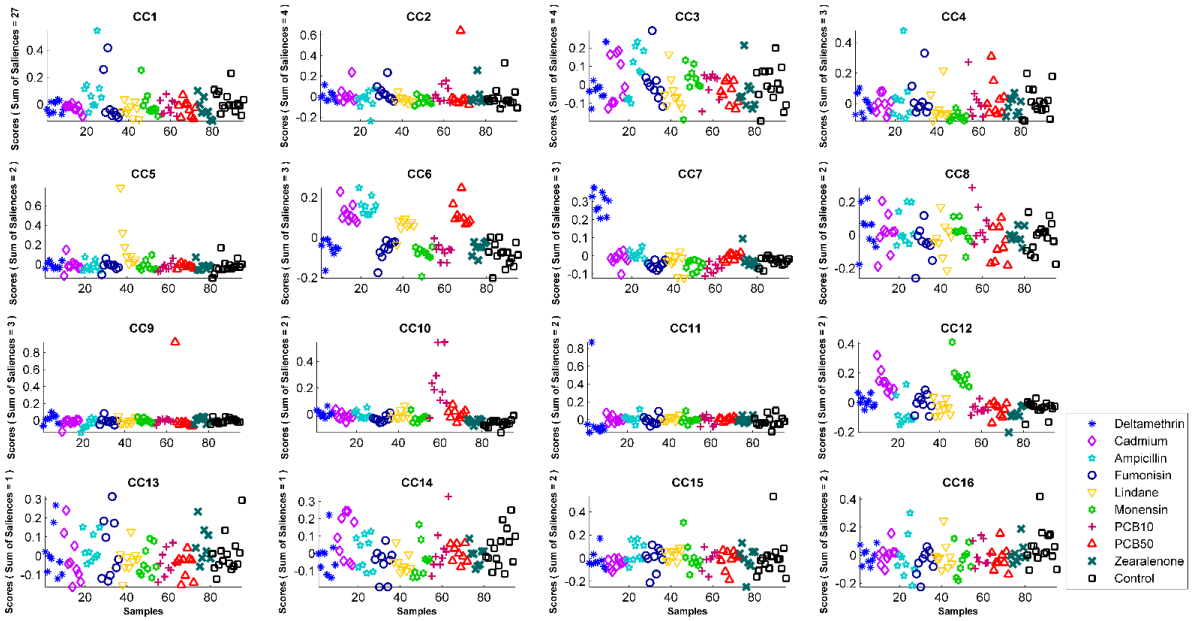


Fig. S2. Result of CCA of orthogonalized SPME-GC-MS data in control and exposed chicken livers: CCA scores along the first sixteen Common Components (CCs).

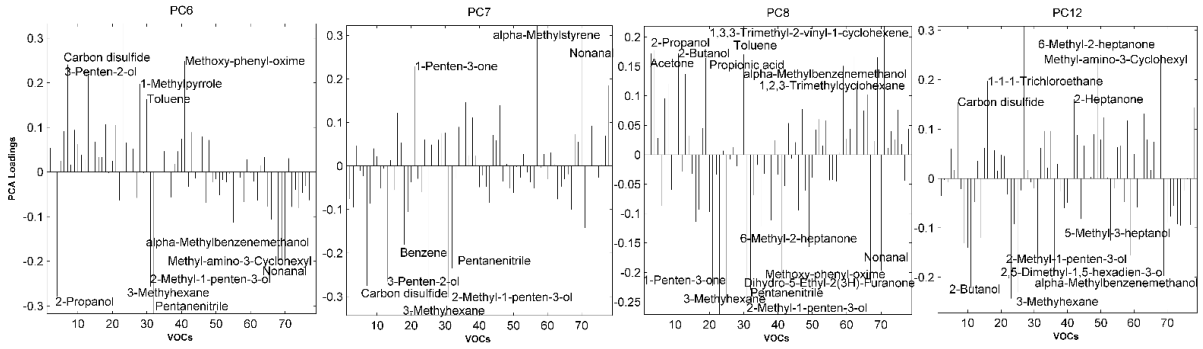


Fig. S3. Results of PCA on the orthogonalised and autoscaled data: Labeled plots of PCA loadings (greater than ±2×SD) along the interesting Principal Components PC6, PC7, PC8, and PC12.

Conclusion du chapitre II

Les développements méthodologiques présentés dans ce chapitre ont permis de mettre au point les méthodes d'extraction du volatolome dans le foie et d'analyse chimiométrique des données volatolomiques adaptées à la recherche de marqueurs volatils susceptibles de tracer l'exposition des animaux aux micropolluants.

Dans la première partie de ce chapitre, l'objectif consistait à améliorer les conditions d'extraction des COVs du foie proposées par Berge *et al*.(2011) en cherchant à améliorer la représentativité des extraits tout en minimisant la variabilité analytique et en maximisant la sensibilité de l'extraction. Les résultats ont démontré que la diminution de la température d'extraction de 60 à 40°C améliore la représentativité de l'extrait, et facilite notamment l'interprétation de l'origine biochimique de la production des marqueurs candidats de l'exposition aux différents micropolluants.

Malgré cette baisse de la température d'extraction, la fibre SPME de type CAR/PDMS permet en 30 minutes une extraction efficace des composés volatils hépatiques de faibles poids moléculaires. En termes de variabilité, cette étude montre qu'une étape de décongélation des échantillons de poudre de foie à 4°C pendant 24h permet d'augmenter les abondances des COVs extraits tout en réduisant la variabilité de leur extraction.

Par ailleurs, l'ajout à l'échantillon d'une solution aqueuse saturée en NaCl favorise l'extraction des COVs par effet salting-out sans engendrer d'augmentation relative de la variabilité des aires mesurées.

La comparaison de l'influence du protocole révisé et celui proposé par Berge *et al*. (2011) a démontré une augmentation significative de l'abondance pour 14 composés volatils parmi la liste des 22 suivis. Par ailleurs, les standards déviations des COVs ont diminué pour tous les composés à l'exception de l'acétone et des acides carboxyliques dont la variabilité a augmenté par l'ajout de NaCl à l'échantillon de foie. En effet, l'ajout d'une solution de NaCl augmente la solubilité des acides carboxyliques dans la solution aqueuse ce qui explique la diminution de leurs abondances. Par ailleurs, l'équilibre de ces composés dans la phase gazeuse est difficillement atteint ce qui induit l'augmentation de leurs coefficients de variation.

Enfin, les nouveaux paramètres SPME ont amélioré l'extraction du volatolome du foie en termes de représentativité de l'extrait, de variabilité et de sensibilité de l'extraction.

Par ailleurs, ces nouvelles conditions SPME couplées à une analyse GC-MS ont permis de mettre en évidence des changements dans le volatolome du foie en réponse à l'exposition des poulets à trois types de micropolluants: la deltaméthrine, les PCBs et le monensin, ce qui confirme à la fois l'intérêt du nouveau protocole ainsi que la preuve de concept établie par Berge *et al*. (2011).

Dans la deuxième partie de ce chapitre, une comparaison de trois méthodes chimiométriques exploratoires, ACP, ACI et ACC a été établie. D'abord, une orthogonalisation a été appliquée sur la matrice brute dans le but d'éliminer les déruves instrumentaux.

Ces travaux ont démontré que les résultats d'ACP dépendaient fortement de la méthode de prétraitement, par rapport à l'ACI, où le prétraitement a moyennement influencé les séparations.

Les résultats d'ACP et d'ACI ont montré que les séparations les plus nettes sont obtenues après un autoscaling des données orthogonalisées. Toutefois, les meilleures séparations des groupes exposés aux micropolluants ont été obtenues par ACC. Les Loadings d'ACP n'ont pas mis en évidence les variables qui influencent les séparations, tandis que les Loadings obtenus par ACI et ACC ont souligné les mêmes variables.

Par ailleurs, Les Loadings d'ACC ont permis d'identifier les variables qui contribuent le plus aux séparations selon les composantes communes. Finalement, on peut déduire de cette étude que l'analyse des profils volatolomiques par SPME-GC-MS associée à la méthode exploratoire ACC forment une combinaison pertinente et performante pour révéler des marqueurs hépatiques d'exposition des animaux d'élevage à différentes familles clés de micropolluants alimentaire

REFERENCES

[1] Ouyang, G., Pawliszyn, J., A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction. Anal. Chim. Acta 2008, 627(2), 184-197.

[2] Berge, P., Ratel, J., Fournier, A., Jondreville, C., Feidt, C., Roudaut, B., Le Bizec, B., Engel, E., Use of Volatile Compound Metabolic Signatures in Poultry Liver to Back-Trace Dietary Exposure to Rapidly Metabolized Xenobiotics. Environ. Sci. Technol. 2011, 45(15), 6584-6591.

[3] Silva, C.L., Passos, M., Camara, J.S., Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry. Br. J. Cancer 2011, 105(12), 1894-1904.

[4] Anton, A.P., Ferreira, A.M.C., Pinto, C.G., Cordero, B.M., Pavon, J.L.P., Headspace generation coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the automated determination and quantification of endogenous compounds in urine. Aldehydes as possible markers of oxidative stress. J. Chromatogr. A 2014, 1367, 9-15.

[5] Ouyang, G.F., Vuckovic, D., Pawliszyn, J., Nondestructive Sampling of Living Systems Using in Vivo Solid-Phase Microextraction. Chem. Rev. 2011, 111(4), 2784-2814.

[6] Dubin, E., Spiteri, M., Dumas, A.S., Ginet, J., Lees, M., Rutledge, D.N., Common components and specific weights analysis: A tool for metabolomic data pre-processing. Chemometrics Intell. Lab. Syst. 2016, 150, 41-50.

[7] Qi, Y.P., Qu, L.P., Wu, Y.T., Fan, G.R., A plasma metabonomic investigation into the intervention of volatile oil of Magnolia biondii Pamp on rat model of acute inflammation. J. Ethnopharmacol. 2011, 137 (1), 487-494.

[8] Silva, C.L., Passos, M., Camara, J.S., Solid phase microextraction, mass spectrometry and metabolomic approaches for detection of potential urinary cancer biomarkers-A powerful strategy for breast cancer diagnosis. Talanta 2012, 89, 360-368.

[9] Qannari, E.M., Wakeling, I., Courcoux, P., MacFie, H.J.H., Defining the underlying sensory dimensions, Food Qual. Prefer. 11 (2000) 151–154.

[10] Wold, S., Esbensen, K., Geladi, P., Principal Component Analysis, Chemometrics Intell. Lab. Syst. 2 (1987) 37-52.

[11] Rutledge, D.N., Bouveresse, D.J.R., Independent Components Analysis with the JADE algorithm. Trac-Trends Anal. Chem. 2013, 50, 22-32.

[12] Smilde, A.K., van der Werf, M.J., Bijlsma, S., van der Werff-van-der Vat, B.J.C., Jellema, R.H., Fusion of mass spectrometry-based metabolomics data. Anal. Chem. 2005, 77(20), 6729-6736.

[13] van den Berg, R.A., Hoefsloot, H.C.J., Westerhuis, J.A., Smilde, A.K., van der Werf, M.J., Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. BMC Genomics 2006, 7.

Chapitre III. Recherche de marqueurs volatils dans le foie

L'intérêt de l'étude du volatolome hépatique a été présenté dans la première partie bibliographique de ce manuscrit. Brièvement, le foie est l'organe de détoxification des substances exogènes et le lieu de génération des métabolites endogènes en réponse à tout type de stress métabolique provoqué dans l'organisme. Les composés volatils (COVs) constituent une classe de métabolites dont les abondances pourraient être modifiées en réponse au stress métabolique et peuvent renseigner sur les changements provoqués à un niveau cellulaire, et ainsi permettre de tracer des expositions aux contaminants chimiques [1]. Dans cette logique, Berge *et al*. (2011) [2] ont montré le potentiel informatif des empreintes volatolomiques du foie pour révéler l'exposition de poulets aux contaminants.

En s'appuyant sur les développements méthodologiques du chapitre 1, l'étude présentée dans ce deuxième chapitre a pour objectif de révéler des marqueurs volatils dans le foie, susceptibles de tracer l'exposition de groupes de poulets au cadmium , à une faible et une forte doses de PCBs, à la monensine, à l'ampicilline, à la deltaméthrine, au lindane, aux fumonisines (B1&B2) et à la zéaralénone.

La première étape consiste à vérifier les niveaux de contamination par les différents micropolluants dans les aliments et les tissus des animaux par des méthodes de références. Ensuite, les signatures volatolomqiues des COVs dans le foie d'animaux exposés et non-exposés aux micropolluants sont analysées par SPME-GC-MS et les données volatolomiques collectées sont traitées par l'Analyse en Composantes Communes (ACC) pour révéler des différences entre les groupes et identifier des marqueurs candidats pour chaque type d'exposition.

Dans un premier temps, la stratégie consiste à appliquer ACC sur la matrice globale des données pour étudier les réponses volatolomiques spécifiques aux différents types d'exposition, cette étape servira notamment à présélectionner les COVs qui contribuent le plus à chaque séparation. Dans un deuxième temps, les marqueurs volatils candidats pour chaque type d'exposition ont été identifiés en appliquant ACC entre le groupe des témoins et chaque groupe exposé selon les COVs filtrés par ACC globale.

A la fin de ce travail, les marqueurs volatils candidats sont comparés avec les marqueurs potentiels qui ont été identifiés dans la littérature comme des marqueurs de pathologies, permettant ainsi d'expliquer leur origine biochimique et de comprendre les mécanismes

responsables du changement de leur niveau de production dans le foie en réponse à l'exposition aux micropolluants.

Cette étude est présentée dans **l'article 3,** intitulé « Liver Volatolomics to Reveal Markers of Poultry Exposure to Micropollutants », et soumis au journal '*Chemosphere'*.

Liver Volatolomics to Reveal Markers of Poultry Exposure to Micropollutants

Jihéne Bouhlel[a,b], Jérémy Ratel[a], Said Abouelkaram[a], Elisabeth Baéza[c], Catherine Jondreville[c], Gaud Dervilly-Pinel[d], Eric Verdon[e], Thierry Guérin[f], Douglas N. Rutledge[b], Erwan Engel[a*]

[a]*INRA, UR 370 QuaPA, MASS laboratory, Saint-Genès-Champanelle, France*
[b]*UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, Massy, France*
[c]*ITAVI, UR83 Recherches Avicoles, INRA, Centre Val de Loire, 37380 Nouzilly, France*
[4]*Oniris, LABERCA, Nantes, France*
[e]*ANSES, Reference laboratory for veterinary drug residues in food, Fougères, France*
[f]*ANSES, Laboratory for Food Safety, Maisons-Alfort, France*

*Corresponding author: *E-mail: erwan.engel@inra.fr; Phone: +33 (0)4 73 62 45 89.*

ABSTRACT

The objective of this study was to reveal candidate volatile organic compound (VOC) markers in the liver to back trace animal exposure to several types of micropollutants. Nine groups of broiler chickens were exposed to a different contaminant: a heavy metal (cadmium), two levels of environmental pollutant (PCBs), two veterinary drugs (monensin and ampicillin), two pesticides (deltamethrin and lindane), and two mycotoxins (fumonisins and zearalenone). A controm group was not exposed to any contaminants. A recent SPME method for the extraction of liver VOCs was optimised to improve extract representativeness, while decreasing variability and enhancing sensitivity. The volatolomic data was analysed using a multivariate exploratory chemometric method named Commom Components Analysis (CCA). The SPME-GC-MS signatures were all analysed together by CCA and the results showed a split of chicken groups into two subgroups, as well as specific separations of the deltamethrin, PCB low level and monensin exposed groups from the others. A second CCA analysis was applied to the control group and each exposed group separately using the VOCs detected in the first analysis as responsible for the separation of the control group from the cadmium, PCB low and high levels, monensin, ampicillin, deltamethrin, lindane, and fumonisins groups. The performance of CCA analysis separately to control group and each exposed group using the filtered VOCs pointed out the differentiation of control group from exposed group to cadmium, PCB low and high levels, monensin, ampicillin, deltamethrin, lindane, and fumonisins. The results emphasized the potential of the liver volatolomic VOC signatures to back trace chicken exposure to a wide range of micropollutants. Furthermore, the identified VOC markers in the liver belong to different chemical families like hydrocarbons, alcohols, ketones, aldehydes, carboxylic acids, furans, sulfur compounds and aromatic compounds, which were reported in previous studies as markers of many types of pathologies and risk exposure.

Keywords: Volatolomics, Liver markers, Micropollutants, SPME-GC-MS, Common Component Analysis (CCA)

1. Introduction

Human exposure to a wide range of contaminants including environmental micropollutants (O'Kane et al., 2013), mycotoxins (Theumer et al., 2010), plant treatments (Benarbia et al., 2013) or veterinary substances (de Baere et al., 2005) may result from the consumption of food products. Animal-derived products may be particularly related to chemical safety issues since food producing animals accumulate environmental contaminants or chemical residues during their lifetime (Engel et al., 2015). Hence, stringent quality control procedures are required to protect consumers, and the European Union (EU) has established maximum residue limits (MRLs) for different micropollutants in feeds and animal tissues. Most current approaches to analyzing micropollutants in foods are based on high performance analytical methods designed to determine xenobiotic residues present down to trace levels in animal derived foods. These methods are performant but economically inconceivable and unsuitable for frequent and routine controls (Focant, 2012). In addition, some contaminants are reputed to be quickly metabolized in detoxifying organs which makes them difficult to measure by targeted methods (Berge et al., 2011). To overcome these limitations, 'omics' approaches focus on markers of animal exposure to micropollutants. Among omics approaches, metabolomics is widely applied to provide markers of metabolomic changes in response to pathologies (Buszewski et al., 2012; Saitoh et al., 2014; Wang et al., 2014) or micropollutant exposure (Chen et al., 2007; Mocarelli et al., 2008; O'Kane et al., 2013). Specifically, several recent studies have demonstrated the relevance of volatile organic compounds (VOCs) as markers of metabolism deviation in response to pathologies in liver (Hakim et al., 2012), skin (Abaffy et al., 2013), blood (Mochalski et al., 2014), urine (Silva et al., 2011) or breath (Phillips et al., 2010). In addition, Berge *et al*. (2011) (Berge et al., 2011) pointed out that liver volatolomic signatures were suitable to reveal animal exposure to micropollutants.

Recently, Bouhlel *et al*. (2017) (Bouhlel et al., 2017) adjusted the SPME set-up used by Berge *et al*. (2011) (Berge et al., 2011) in order to improve extraction conditions so as to obtain more representative extracts by using an extraction temperature closer to livestock physiological conditions while minimizing analytical variability and maximizing VOC recoveries. In order to have high VOC recoveries and to minimize variability, two approaches dealing with sample preparation were investigated. Firstly, defrosting liver samples at 4 °C for 24 h yielded to higher abundances and lower variabilities of VOCs. Secondly, the addition of a saturated solution of NaCl enhanced the sensitivity of the analysis with an increase in VOC abundances of more than 50%.

When benchmarked against the initial Berge *et al*. (2011) set-up, the revised protocol significantly enhanced the extraction recovery while decreasing the analytical variability for most candidate VOC markers. By applying the adjusted SPME parameters for the extraction of liver VOCs, VOC markers were founf for livestock exposure to a pesticide, deltamethrin; an environmental micropollutant, PCBs; and a coccidiostat, monensin.

Moreover, most metabolomic data treatment relies on the comparison "case" vs. control groups using a selection of variables by an Analysis of Variance (ANOVA) based on the predefined groups of individuals, followed by a Principal Components Analysis (PCA) to reveal differences among the groups. In this way, Berge *et al*. (2011) (Berge et al., 2011) used ANOVA for the selection of significant VOC fragments *m/z*, then applied Principal Components Analysis to detect further volatolomic differences and to visualize the separation of groups. The results showed differences in liver volatolomic fingerprints for chicken exposure to PAH and PBDE. Recently, important work has been carried out on testing exploratory chemometrical methods, without preselection of variables, to reveal information in the liver volatolomic data. In this study, 3 methods, Principal Components Analysis (PCA), Independent Components Analysis (ICA) and Common Components Analysis (CCA) were applied to volatolomic data. Common Components Analysis proved to be a powerful exploratory method for the non-oriented extraction of differences in volatolomic data and for the determination of candidate liver VOC markers to backtrack animal exposure to micropollutants (Bouhlel *et al*. 2017).

An animal test was performed on a control group (n=15) and nine groups each (n=9) exposed to one type of micropollutants selected based on their toxicity and their possible occurrence in the food products (Gaud Dervilly-Pinel et al., 2017). The aim of this work was to identify liver VOC markers of chicken exposure to these different micropollutants. Firstly, the contamination in chicken feed and the transfer of micropollutants from feed to tissues were studied by reference methods. Then, the revised SPME protocol (Bouhlel et al., 2017) was used for the extraction of liver VOCs and then the analysis of the SPME-GC-MS data treatment was performed using Common Components Analysis. An initial CCA was done on all the data together. In a second step, those VOCs identified as possible markers for specific contaminants were used in CCAs between the control group and each exposed group. The biochemical sources and the metabolic pathways that could be involved in the changes of the levels of the VOC candidate markers were discussed.

2. Material and methods

2.1. Micropollutants

The list of micropollutants selected according to Dervilly-Pinel *et al*. (2017) includes a heavy metal; cadmium (anhydrous $CdCl_2$, 42852, Alfa Aesar), a mix of environmental micropollutant consisting in non-dioxin-like polychlorobiphenyls (NDL-PCBs) (Arochlor 1260, 90129R, Sigma-Aldrich), two veterinary drugs; monensin sodium (Elancoban, E757, Eli Lilly and Company Ltd) and ampicillin (Ampisol powder, La Chesnais Vet, Tours, France), two pesticides; deltamethrin and lindane (lindane pestanal, 45548, Fluka), and two mycotoxins; fumonisins (B1 and B2, ENVT, maize powder, Toulouse, France) and zearalenone (ENVT, rice powder, Toulouse, France). The micropollutants under study were introduced in feed with particular precautions to assure the homogeneity of the contaminated feeds (Berge et al., 2011). Table 1 illustrated the concentrations of these contaminants in animal feeds chosen to be conform to the maximum levels fixed by the regulations in poultry feed and consistent with the limits of detection of the analytical methods used by the National Reference Laboratories (NRLs) to detect residues in exposed animal tissues and sufficient to induce a response in the metabolism of exposed livestock.

Table 1. Maximum levels and administered doses of the investigated micropollutants in chicken feeds.

Contaminant	EU Legislation	ML[2]	Dose administrated
Cadmium	Directive. 2002/32/EC	0.5 mg kg^{-1}	7.5 mg kg^{-1}
NDL[1] PCBs	Regulation. (EU) 277/2012	10 µg kg^{-1}	10 µg kg^{-1}
NDL PCBs	Regulation. (EU) 277/2012	10 µg kg^{-1}	50 µg kg^{-1}
Monensin	Regulation. (EC) 124/2009	125 mg kg^{-1}	125 mg kg^{-1}
Ampicillin	Recommended dosage	10 mg kg^{-1} body weight daily during 3 days	10 mg kg^{-1} body weight daily during the 3 days preceding slaughter
Deltamethrin	Regulation. (EU) 524/2011	2 mg kg^{-1}	9 mg kg^{-1}
Lindane	Directive. 2002/32/EC	0.2 mg kg^{-1}	0.3 mg kg^{-1}
Fumonisins	Recommendation 2006/576/EC	20 mg kg^{-1}	20 mg kg^{-1}
Zearalenone	Recommendation 2006/576/EC	0.5 mg kg^{-1}	0.5 mg kg^{-1}

[1] NDL: non-dioxin-like
[2] ML: Maximum Levels

2.2. Poultry exposure to micropollutants

Animal experimentation was detailed in Bouhlel *et al*. (2017). Briefly, ninety-six male chickens (*Gallus gallus*) (JA 657, Boyé Accouvage, La Boissière-en-Gâtine, France) were raised together until 28 days of age. They were then distributed into ten groups, one control group (n=15) and nine groups (n=9) each contaminated by one type of micropollutant. Chickens were fed in individual cages for 8 weeks (28–84 days of age) with control or contaminated feeds. The feed given to the chickens was a granulated mixture of commercial feed with 5% sunflower oil with or without added micropollutant. For ampicillin-exposed group, ampisol powder was diluted in drinkable water and given to animals during the three consecutive days before slaughtering. At 84 days of age, all chickens were slaughtered according to European recommended standard conditions.

Liver and muscle samples were excised from control and exposed chicken carcasses, immersed in liquid nitrogen, wrapped in aluminum foil, vacuum packed, and grounded for 3 min in liquid nitrogen into a fine homogeneous powder using a homemade stainless steel ball mill (Berge et al., 2011). Then, a representative sample of each liver and muscle tissue was prepared for the subsequent analysis of xenobiotic residues by reference methods. Regarding volatolomic analyses in livers, 1.2 g of powdered liver were aliquoted into 20 ml SPME vials capped under nitrogen gas flow and stored at -80°C until analysis (Berge et al., 2011).

2.3. Micropollutant analysis in feed and tissue samples

The xenobiotics under study were assessed in control and contaminated chicken feeds according to selective and sensitive analytical methods implemented within the French National reference Laboratories (NRLs) in charge of each corresponding contaminant (Gaud Dervilly-Pinel et al., 2017) (Table S1).

The xenobiotic residues of each micropollutant were analyzed in control and exposed chicken tissues by French NRLs using the adapted reference methods (Gaud Dervilly-Pinel et al., 2017). The chicken tissues were basically selected on the recommendation of French NRLs and according to previous studies which reported the accumulation tendency of each micropollutant in tissues. Thus, cadmium, monensin, ampicillin, fumonisins (B1&B2) and zeralenone were assessed in the liver tissues, whereas NDL-PCBs, deltamethrin and lindane were analyzed in the muscles (Table S1).

2.4. Analysis of liver volatolome

Volatile organic compounds (VOCs) were extracted from the liver of control and exposed chickens by Solid-Phase Micro-extraction (SPME) according to the SPME protocol provided by Bouhlel *et al*. (Bouhlel et al., 2017). Briefly, the day before analysis, liver samples stored at −80 °C were taken and 1.2 g of saturated NaCl solution were added to each sample, the mixture was closed under a nitrogen flow, vortexed for homogenization and defrosted for 24 h at 4°C. A multipurpose sampler (AOC-5000, Shimadzu, Kyoto, Japan) was used to carry out the following successive steps: (i) preheating of samples in the agitator for 10 min at 40°C with a stirring rates at 500 rpm, (ii) trapping of VOCs by SPME fiber 75 µM carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS, 23 gauge needle, Supelco) for 30 min at 40°C, and (iii) desorption of VOCs for 2 min in the GC inlet. The desorbed VOCs were analyzed with a GC-MS QP2010+ (Shimadzu) equipped with Rxi-5SilMS column (60 m x 0.32 mm I.D x 1 µm film thickness) (Restek, Bellefonte, PA). Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 $ml.min^{-1}$. The injections were performed in the splitless mode (2 min). The column temperature program was as follows: 40°C for 5 min, increasing at 3°C/min to 230°C with a final isothermal period of 10 min. For the MS system, the temperatures of the transfer line, quadruple, and ionization source were 230, 200 and 150°C respectively. Positive ion electron impact mass spectra at 70 eV were recorded in the scan mode in the range of m/z 33-250 amu at 10 scans s^{-1}.

2.5. Signal treatment

Volatile compounds were tentatively identified on the basis of mass spectra and retention indices (RI), by comparison with the NIST/EPA/NIH mass spectral library (NIST14) and RI values of our internal data bank. An automatic homemade algorithm developed on Matlab 2014b was used for the integration of the peak areas of the volatile compounds (Bouhlel et al., 2017).

2.6. Chemometric data treatment

Multivariate data analysis was investigated using an exploratory chemometric method, named Common Components and Specific Weights Analysis (ComDim). This method developed by Qannari *et al*. (2000) (Qannari et al., 2000) has been used to extract information from a single data set by applying it to blocks consisting of a single variable each (Dubin et al., 2016). To distinguish this procedure from the standard multi-table situation, we propose to call it Common Components Analysis (CCA).

CCA estimates a series of orthogonal Common Components (CCs) that are linear combinations with strong weighting of those variables with a similar effect on the dispersion of the samples, thus highlighting variables that behave in the same way as a function of differences among the samples.

Firstly, the SPME-GC-MS data treatment was performed using CCA analysis on control group (15 samples) concatenated to all contaminant exposed-groups in order to map similarities and differences in the behaviour of the variables corresponding to VOCs for the different groups. In this case, the analysed data matrix (95 samples × *n* variables) is treated as *n* blocks of size 95 × 1. The scores of control and exposed chickens were plotted along the first 16 CCs to detect those CCs giving a separation between chicken groups. The loadings for each CC were plotted to visualize the influential VOCs giving rise to group separations. Quantile-Quantile plots (Q-Q plot) (Wilk and Gnanades.R, 1968) were drawn to visualize the VOCs in the vectors of CCA loadings for those common components which separated the groups. The VOCs with loadings contributions greater than plus or minus one standard deviations (±1×SD) were preselected as potentially interesting for each specific group separation.

Secondly, in order to identify differences in the liver VOCs in response to each micropollutant exposure, CCA was once again applied to control group (n=15) concatenated to each exposed group (n=9) using only the preselected VOCs by global CCA analysis for the separation of the corresponding separated group. The analysed data matrix consisted of 24 samples and *n* VOCs preselected with simultaneous CCA analysis, treated as *n* blocks of size 24 × 1. The new CCA scores were projected onto 16 common components (CCs) to visualize the differences between control group and each exposed group. The candidate VOC markers were those with loading contributions greater than (±1×SD) along each interesting CC separating the corresponding exposed chicken group from controls.

Finally, specific CCA analysis was performed using all VOCs on control group and exposed chicken group that was not separated by global CCA analysis. The analysed data matrix consisted of 24 samples and *n* VOCs preselected with simultaneous CCA analysis, treated as *n* blocks of size 24 × 1.Similarly, the CCA scores were calculated and projected onto 16 CCs and the candidate VOC markers were those with contributions to the loadings greater than (±2×SD) along each interesting CC separating the corresponding exposed chicken group from controls.

Finally, Newman–Keuls *post hoc* test of multiple comparisons ($p<0.05$) was applied using Statistica 12 software (Dell Software, Paris, France) on the abundances of the identified VOCs to validate their significance between control group and each separated exposed group (Petropulos et al., 2014). Matlab 2007b (The MathWorks, Natick, USA) and the SAISIR toolbox 2008 (*SAISIR*, INRA: France, 2008) were used for all CCA data analyses.

3. Results

3.1. Analysis of micropollutant residues in feed and tissue samples

Animals showed no sign of any recognizable symptoms of toxicity throughout the course of the study and were found to consume feed normally, except for the death of one exposed chicken to zearalenone during breeding and the limited consumption of contaminated feed in the final stage of breeding for one chicken exposed to cadmium and one chicken exposed to fumonisin, due to locomotor problems. Direct analysis of contaminant residues are performed using reference methods in chicken feeds and tissue samples.

3.1.1. Cadmium

Table 2 shows that the concentration of cadmium in contaminated feed reached 6.5 $mg.kg^{-1}$ feed which is close to the targeted concentration at 7.5 $mg.kg^{-1}$ feed and is found at very low level (23 $\mu g.kg^{-1}$ feed) in control feed. The concentration of cadmium in the livers of exposed chickens reached 3.2±0.9 $mg.kg^{-1}$ fresh tissue which is much higher than of the concentration in control livers (7.0±2.0 µg/kg fresh tissue) (Table 2).

3.1.2. PCBs

Table 2 shows that PCB levels in contaminated animal feeds reached 8.2 and 46.3 $\mu g.kg^{-1}$ feed at PCB low level (10 µg NDL-PCBs/kg, PCB10) and PCB high level (50 µg NDL-PCBs/kg, PCB50) respectively, and is found at 0.1 $\mu g.kg^{-1}$ feed in control feed. The concentrations of PCBs in the muscles of exposed chickens at PCB10 and PCB50 levels reach 49.3±12.7 and 248±41.5 $\mu g.kg^{-1}$ lipid weight respectively, and are at 4.7±2.1 $\mu g.kg^{-1}$ lipid weight in the muscles of control chickens (Table 2).

3.1.3. Veterinary drugs

While monensin sodium is not detectable in control feed (Table 2), it reaches 114 $mg.kg^{-1}$ feed in contaminated feed which is close to the targeted concentration (125 $mg.kg^{-1}$).

Otherwise, the result (Table 2) demonstrates that monensin-concentration reached 4.5±1.8 $\mu g.kg^{-1}$ fresh tissue in the livers of exposed animals.

Table 2 illustrates the absence of ampicillin residues in the livers of control group and highlights the detection of ampicillin in the livers of ampicillin-exposed group. Therefore, ampicillin residues are only quantified in one exposed chicken liver at 5.2 $\mu g.kg^{-1}$ fresh tissue (Table 2).

3.1.4. Pesticides

The result (Table 2) shows that deltamethrin is not detected in control feed (Table 2), whereas it reaches 5.6 $mg.kg^{-1}$ in contaminated feed which is close to the targeted concentration of 9 $mg.kg^{-1}$.

Moreover, deltamethrin residues are not detected in exposed chicken muscles (Table 2).The concentration of lindane reaches 0.4 $mg.kg^{-1}$ in contaminated feed which is conform to the targeted concentration at 0.3 $mg.kg^{-1}$ feed, while it is under the limit of detection in control feed (Table 2). The concentration of lindane is at 6.0±1.0 $\mu g.kg^{-1}$ fresh tissue in muscles of exposed animals and is not detected in control muscles (Table 2).

3.1.5. Mycotoxins

The concentrations of fumonisins (B1&B2) are at 12.7 $mg.kg^{-1}$ in contaminated feed which is conform to the expected concentration at 20 $mg.kg^{-1}$ feed and were not detected in control feed (Table 2). Furthermore, fumonisin B1 and fumonisin B2 levels reach 30.3±14.2 and 2.4±1.1 $\mu g.kg^{-1}$ fresh tissue respectively in the livers of exposed chickens and are not detected in control livers (Table 2).

Regarding zearalenone, the concentration reaches 0.4 $mg.kg^{-1}$ in contaminated feed which is close to the expected value at 0.5 $mg.kg^{-1}$ feed and is detected at very low level (27 $\mu g.kg^{-1}$feed) in control feed (Table 2). The analysis of zearalenone and its metabolites (α-zearalanol and of α-zearalenol) in control and exposed chicken livers showes that zearalenone and α-zearalanol are not detected in exposed chicken livers but only traces of α-zearalenol are detected in three exposed chicken livers (Table 2).

Table 2. Analysis of micropollutant residues in control and exposed chicken feed and tissue samples.

Contaminant	Tissues	Residues in feeds		Residues in tissues	
		Contaminated	*Control*	*Contaminated*	*Control*
Cadmium	Liver	6.5 mg kg^{-1}	0.02 mg kg^{-1}	3.2± 0.98 mg kg^{-1} F [2]	0.007 mg kg^{-1} F
NDL PCBs	Muscle	8.2 µg kg^{-1}	0.11 µg kg^{-1}	49.3±13 µg kg^{-1} LW [3]	4.7±2.1 µg kg^{-1} LW
NDL PCBs	Muscle	46.3 µg kg^{-1}	0.1 µg kg^{-1}	248 µg kg^{-1} LW	4.7 µg kg^{-1} LW
Monensin	Liver	114 mg kg^{-1}	<LOD [1]	4.53 µg.kg^{-1} F	<LOD
Ampicillin	Liver	-	-	5.24 µg kg^{-1} BW[4]	<LOD
Deltamethrin	Muscle	5.6 mg kg^{-1}	<LOD	< LOD	<LOD
Lindane	Muscle	0.4 mg kg^{-1}	<LOD	6 µg kg^{-1} F	<LOD
Fumonisins (B1&B2)		12.7 mg kg^{-1}	<LOD	-	-
Fumonisin B1	Liver	-	-	30.3±14.2 µg kg^{-1} F	<LOD
Fumonisin B2	Liver	-	-	2.44±1.13 µg kg^{-1} F	<LOD
Zearalenone	Liver	0.4±0.12 mg kg^{-1}	0.03 mg kg^{-1}	<LOD	<LOD

[1] LOD: Limit of Detection
[2] F: Fresh tissues
[3] LW: Lipid Weight
[4] BW: Body Weight

3.2. Determination of liver VOC markers for contaminant exposure

3.2.1. Preselection of contributing VOCs

A list of 79 VOCs are tentatively identified in exposed and non-exposed chicken livers (Table S2).A simultaneous CCA analysis of all chicken groups revealed a split of chicken groups into two subgroups along the 6th common component (CC6) (Fig. 1A). The first subgroup (positive scores) includes exposed groups to cadmium, PCB high dose, lindane, and ampicillin and the second subgroup (negative scores) includes the control, PCB low dose, deltamethrin, fumonisin, zearalenone, and monensin exposed groups. This distribution suggests differences in the liver volatolomic responses in each of the subgroups and similarities within the subgroups.

Moreover, clear specific discriminations are pointed out for deltamethrin, PCB low and monensin groups from control and other exposed groups along CC7, CC10 and CC12, respectively (Fig. 1A). The total 79 VOCs are filtered so as to preselect only those which contributed significantly (±1×SD) to each group separation. Thus, a list of 21, 16, 21, and 17

VOCs are selected from the 79 VOCs for each separation along CC6, CC7, CC10 and CC12, respectively. Fig. 1B illustrates the projection of these preselected VOCs (±1×SD) for each interesting separation.

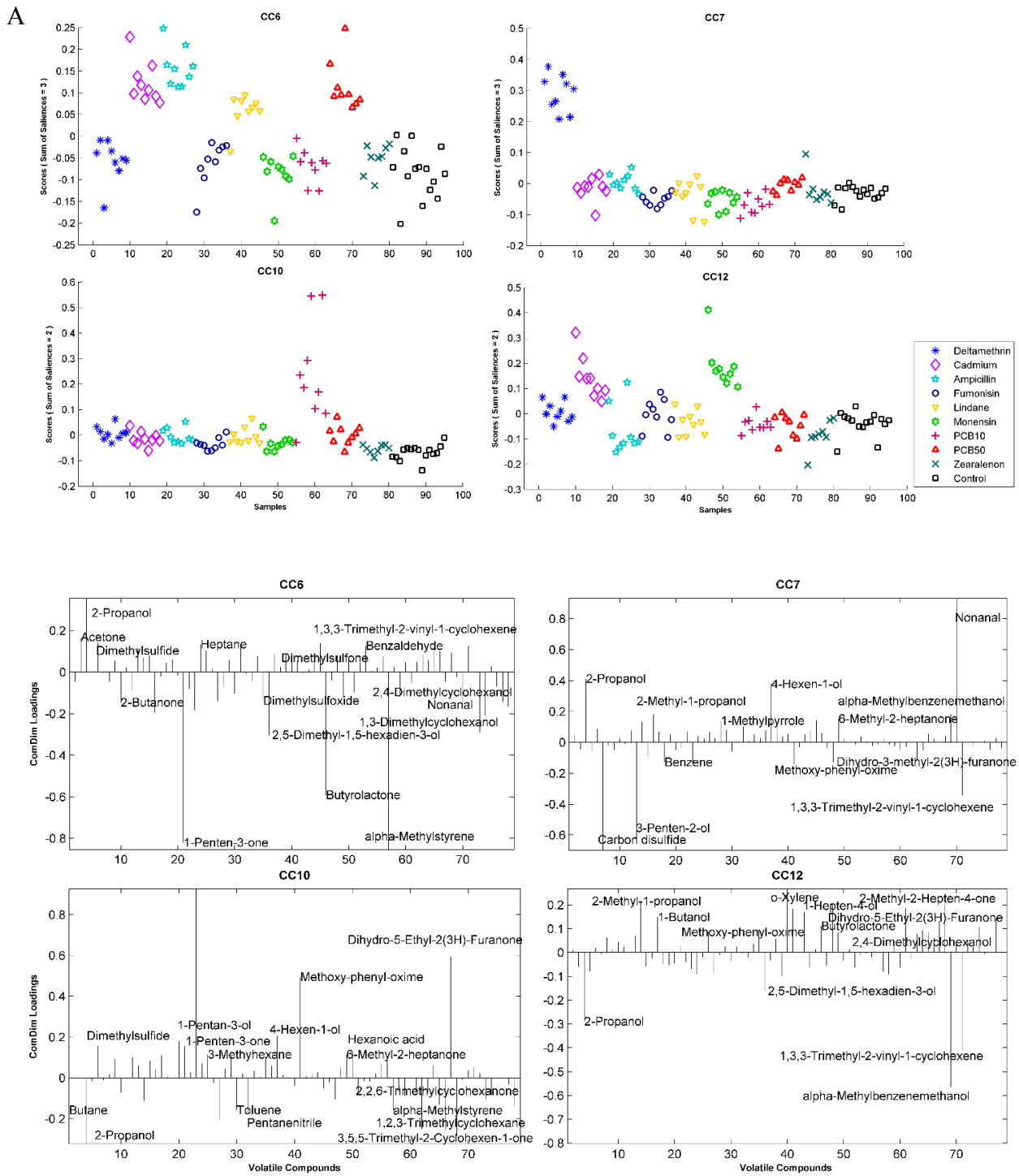


Fig. 1. Result of CCA of SPME-GC-MS data in control and exposed chicken livers **(A)** CCA Scores of control group and exposed groups along the interesting Common Components (CCs) CC6, CC7, CC10 and CC12 **(B)** Labeled plots of CCA Loadings along CC6, CC7, CC10 and CC12.

3.2.2. Selection of VOC candidate markers for contaminant exposure

3.2.2.1. Cadmium

As previously shown, the simultaneous CCA analysis shows the discrimination of the cadmium-exposed group from controls and other exposed groups (PCB low, deltamethrin, monensin, fumonisins, and zearalenone) along CC6. The application of CCA to the control group and cadmium-exposed group using only the 21 VOCs preselected along CC6 reveals a separation of these two groups along CC3 (Fig. 2). Table 3 lists the VOCs significantly influencing that separation.

Table 3. List of the candidate VOC markers of chicken exposure to heavy metal: comparison of peak areas ($\times 10^4$) and relative standard deviations of the significant VOC markers in liver samples selected by specific CCA analysis applied to control group and cadmium group.

Candidate VOC markers [a]	Control[b]	Cadmium[c]
Propionic acid	6.7 (116)	15.3 (51)
1-Penten-3-one	11.8 (41)	ND[d]
2,5-Dimethyl-1,5-hexadien-3-ol	8.8 (75)	ND
Butyrolactone	15.0 (78)	ND
α-Methylstyrene	6.2 (45)	ND
Dihydro-5-ethyl-2(3H)-furanone	3.3 (68)	6.9 (42)

[a] Significant candidate VOC markers which there is statistical significant differences according to *Newman-Keuls post hoc* test multiple comparison ($p<0.05$) between control group and cadmium group.
[b] Area values ($\times 10^4$) are the average of the abundances in control group (n=15) with the relative standard deviation (%RSD) in brackets.
[c]Area values ($\times 10^4$) are the average of the abundances in cadmium-exposed group (n=9) with the relative standard deviation (%RSD) in brackets.
[d] Not Detected

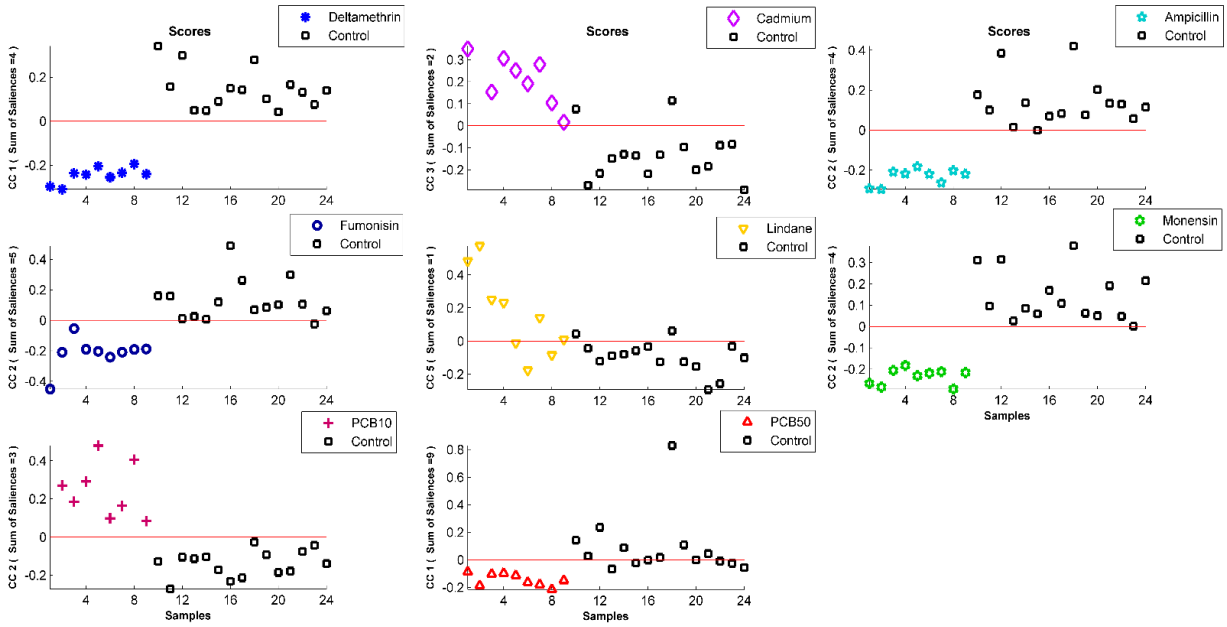


Fig. 2. Results of CCA analysis of the SPME-GC-MS data collected in control and exposed chicken livers to each micropollutant using the preselected VOCs with global CCA analysis: CCA Scores of control group and exposed group along the interesting Common Components (CC).

3.2.2.2. PCBs

Using the VOCs which contributed to the discrimination of the PCB low-exposed group from the controls and other groups along CC10, the specific CCA applied only to the control and PCB-low groups separates these two groups along CC2 (Fig. 2). Table 4 lists the VOCs influencing this discrimination.

The PCB high group is already separated from the control group and other exposed groups by the simultaneous CCA analysis along CC6 (Fig. 1A). The CCA applied to these two groups using the preselected VOCs separates the PCB high-exposed group from non-exposed group along CC1 (Fig. 2). Table 4 regrouped the VOCs with a significant influence.

Table 4. List of the candidate VOC markers of chicken exposure to environmental micropollutants: comparison of peak areas ($\times 10^4$) and relative standard deviations of the significant VOC markers in liver samples selected by specific CCA analysis to control group and PCB low and PCB high groups separately.

Candidate VOC markers [a]	Control [b]	PCB low [c]	PCB high [d]
2-Propanol	5363.9 (36)	ND [e]	310.2 (36)
α-Methylstyrene	6.2 (45)	3.7 (35)	ND
2-Pentylfuran	7.8 (42)	4.4 (34)	
2,2,6-Trimethylcyclohexanone	12.7 (73)	5.9 (42)	
3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one	14.7 (67)	4.9 (129)	
Dihydro-5-ethyl-2(3H)-furanone	3.3 (68)	13.7 (61)	
2-Butanone	87.2 (49)		45.0 (76)
1-Penten-3-one	11.8 (41)		ND
Dimethylsulfoxide	23.4 (58)		5.0 (279)
2,5-Dimethyl-1,5-hexadien-3-ol	88.1 (75)		3.3 (58)
Butyrolactone	15.0 (87)		ND

[a] Significant candidate VOC markers which there is statistical significant differences according to *Newman-Keuls post hoc* test multiple comparison ($p<0.05$) between control group and PCB low group and between control group and PCB high group.
[b] Area values ($\times 10^4$) are the average of control group (n=15) with the relative standard deviation (%RSD) in brackets.
[c] Area values ($\times 10^4$) are the average of the abundances in PCB low-exposed group (n=9) with the relative standard deviation (%RSD) in brackets.
[d] Area values ($\times 10^4$) are the average of the abundances in PCB high-exposed group (n=9) with the relative standard deviation (%RSD) in brackets.
[e] Not Detected

3.2.2.3. Veterinary drugs

Using the VOCs that separated the monensin group from the control and other groups along CC12 (Fig.1A) in the simulataneous CCA, a second specific CCA was performed between the monensin and the control groups. The result showed a clear distinction of these two groups along CC1 (Fig. 2). The significant influencing variables are listed in Table 5.

Similarly, the ampicillin-exposed group was separated from the control and other exposed groups along CC6 (Fig. 1A). The investigation of the corresponding VOCs in a specific CCA model applied to the control and ampicillin groups separates these groups along CC2 (Fig. 2). Table 5 summarize the VOCs influencing for this separation.

Table 5. List of the candidate VOC markers of chicken exposure to veterinary drugs: comparison of peak areas (× 10^4) and relative standard deviations of the significant VOC markers in liver samples selected with specific CCA analysis applied to control group and monensin group, and to control group and ampicillin group.

Candidate VOC markers [a]	Control [b]	Monensin [c]	Ampicillin [d]
2-Propanol	5363.9 (36)	ND [e]	
2-Butanol	840.2 (69)	265.7 (58)	
Propionic acid	6.7 (116)	ND	
4-Hexen-1-ol	3.9 (96)	ND	
α-Methyl-benzenemethanol	2.0 (65)	ND	
1,3,3-Trimethyl-2-vinyl-1-cyclohexene	3.3 (68)	ND	
1-Penten-3-one	11.8 (41)		ND
3-Hepten-2-one	6.1 (42)		9.3 (38)
6-Methyl-2-heptanone	17.1 (36)		30.7 (50)
Butyrolactone	15.1 (87)		ND
α-Methylstyrene	6.2 (45)		ND

[a]Significant candidate VOC markers which there is statistical significant differences according to *Newman-Keuls post hoc* test multiple comparison ($p<0.05$) between control group and monensin group and between control group and ampicillin group.
[b]Area values (× 10^4) are the average of the abundances in control group (n=15) with the relative standard deviation (%RSD) in brackets.
[c] Area values (×10^4) are the average of the abundances in monensin-exposed group (n=9) with the relative standard deviation (%RSD) in brackets.
[d] Area values (×10^4) are the average of the abundances in ampicillin-exposed group (n=9) with the relative standard deviation (%RSD) in brackets.
[e] Not Detected

3.2.2.4. Pesticides

In the simultaneous CCA, the deltamethrin group is separated from the control and other groups along CC7 (Fig.1A). The CCA applied to the control and deltamethrin-exposed groups using the corresponding VOCs shows a clear discrimination of these groups along CC1 (Fig.2). Table 6 lists the VOCs related to this separation.

The lindane group is already separated from controls and other exposed groups along CC6 (Fig. 1A). Applying a CCA on the control and lindane groups, using the corresponding VOCs results in a separation of the two groups along CC5 (Fig. 2). Table 6 reports the significant discriminant VOCs.

Table 6. List of the candidate VOC markers of chicken exposure to pesticides: comparison of peak areas (× 10^4) and relative standard deviations of the significant VOC markers in liver samples selected with specific CCA analysis applied to control group and deltamethrin group and to control group and lindane group.

Candidate VOC markers [a]	Control [b]	Deltamethrin [c]	Lindane [d]
Carbon disulfide	1924.9 (56)	ND	
3-Penten-2-ol	21.7 (26)	ND	
4-Hexen-1-ol	3.9 (96)	7.7 (23)	
α-Methylstyrene	6.2 (45)	4.0 (38)	ND
Dihydro-5-ethyl-2(3H)-furanone	3.3 (68)	6.9 (47)	5.5 (44)
Nonanal	ND [e]	2.6 (25)	
1,3,3-Trimethyl-2-vinyl-1-cyclohexene	3.3 (68)	ND	
Butane	53.0 (41)		32.4 (38)
1-Penten-3-one	11.8 (41)		ND
3-Ethylcyclopentanone	10.4 (38)		6.2 (31)
5-Methyl-3-heptanol	18.5 (53)		7.6 (41)

[a] Significant candidate VOC markers which there is statistical significant differences according to *Newman-Keuls post hoc* test multiple comparison ($p<0.05$) between control group and fumonisins group.
[b] Area values (× 10^4) are the average of the abundances in control group (n=15) with the relative standard deviation (%RSD) in brackets.
[c] Area values (× 10^4) are the average of the abundances in deltamethrin-exposed group (n=9) with the relative standard deviation (%RSD) in brackets.
[d] Area values (× 10^4) are the average of the abundances in lindane-exposed group (n=9) with the relative standard deviation (%RSD) in brackets.
[e] Not Detected

3.2.2.5. Mycotoxins

Chickens Exposed to fumonisins and zearalenone are not separated by the simultaneous CCA. The specific CCAs applied separately to the control group vs. the fumonisins and the zeralenone exposed groups using all the VOCs show no separation for the zeralenone group (Figure S1), but does show a separation of the fumonisins group from control group along CC2 (Fig.2). The influencing VOCs are litsed in Table 7

Table 7. List of the candidate VOC markers of chicken exposure to mycotoxins: comparison of peak areas (× 10^4) and relative standard deviations of the significant VOC markers in liver samples selected with specific CCA analysis applied to control group and fumonisins group.

Candidate VOC markers[a]	Control [b]	Fumonisins [c]
2-Propanol	5363.9 (36)	ND [d]
Dimethylsulfide	2780.9 (47)	ND
1-Propanol	31.3 (43)	18.2 (50)
Propionic acid	6.7 (116)	18.6 (102)
Toluene	105.9 (42)	67.0 (57)
Dihydro-5-ethyl-2(3H)-furanone	3.3 (68)	81.1 (81)

[a]Significant candidate VOC markers which there is statistical significant differences according to *Newman-Keuls post hoc* test multiple comparison ($p<0.05$) between control group and fumonisins group.
[b] Area values (× 10^4) are the average of the abundances calculated for control group (n=15) with the relative standard deviation (%RSD) in brackets.
[c] Area values (× 10^4) are the average of the abundances calculated for fumonisins-exposed group (n=9) with the relative standard deviation (%RSD) in brackets.
[d] Not Detected

4. Discussion

4.1. Volatolomics to reveal poultry exposure to micropollutants

Table 2 highlights that the concentrations of cadmium, PCB low level, PCB high level, monensin, deltamethrin, lindane, fumonisins (B1 & B2), and zeralenone are close to the targeted concentrations for each contaminated feed and theses contaminants are detected at very low levels in control feed which shows that chicken feeds are correctly formulated and confirms the absence of cross contamination during their preparation.

4.1.1. Exposure to cadmium

Table 2 shows the accumulation of half of the administrated concentration in exposed chicken livers. The liver is considered as the target organ in which cadmium primarily accumulates and exerts its various deleterious effects (Bernard, 2004). Similarly, a previous study demonstrated that dietary exposure of ducks to cadmium induced the accumulation of half of the administered dose in the liver (Digiulio and Scanlon, 1984). These results confirm that animals were properly exposed to cadmium and confirm the transfer of cadmium from contaminated feed to exposed chicken livers.

Figure 2 shows a separation of the control group and the cadmium-exposed group along CC3 which indicates changes in the liver VOC signatures in response to exposure to cadmium.

In accordance with our results, Renugadevi *et al*. (2010) (Renugadevi and Prabu, 2010) had shown that oral administration of cadmium at 5 $mg.kg^{-1}$ to rats over 4 weeks induced renal damage, oxidative stress in kidney tissue, and an increase in renal lipid peroxidation markers.

4.1.2. Exposure to PCBs

Table 2 shows the accumulation of PCB residues in the muscles of chickens exposed to low and high levels of PCBs. This result confirms that chicken groups were properly exposed and that the PCBs were transfered from contaminated feeds to chicken tissues. Previous studies showed that animal exposure to PCBs induced their transfer from blood to organs such as liver and adipose tissues (Fernandes et al., 2010). Moreover, Berge *et al*. (2011) (Berge et al., 2011) revealed that chickens exposed to PCBs at a dose 100 times lower than the lower level administrated in this work induced the accumulation of PCB residues in the liver.

Figure 2 illustrates the discrimination of PCB low and high levels exposed groups from control group, which underline significant changes in liver VOC levels in response to chicken exposure to PCBs. Contrary to our results, Berge *et al*. (2011) (Berge et al., 2011) reported no significant differences in the liver volatolomic signatures for chickens exposed to PCBs, but the doses they used were 100 fold lower.

4.1.3. Exposure to veterinary drugs

Table 2 shows that the concentration of monensin in liver tissues is far below the maximum residue level (8 µg/kg), which is consistent with Donoho *et al*. (Donoho et al., 1982) who reported that monensin is rapidly absorbed, metabolized and excreted, and that it is accumulated preferentially in liver at much lower levels than in other tissues. Nevertheless, the separation of control and exposed chickens is visible (Fig.2) indicating differences in liver VOC levels in response to chicken exposure to monensin. This is consistent with the results of Berge *et al*. (2011) (Berge et al., 2011) who showed that chickens exposed to coccidiostats (nicarbazin and narasin) were discriminated from controls through their liver volatolome signatures. Recently, Charvat *et al*. (2016) (Charvat and Arrizabalaga, 2016) showed that monensin disrupts mitochondrial functions, decreases mitochondrial membrane potential, and causes an oxidative stress. Table 2 also shows that ampicillin residues are lower than the maximum level set by EU 37/2010 at 50 $\mu g.kg^{-1}$ fresh tissue in livestock tissues.

A previous study showed that broiler chicken oral exposure to a commercial amoxicillin formulation induced the accumulation of amoxicillin residues at levels above the maximum authorized level (50 $\mu g.kg^{-1}$ fresh tissue) only for the chickens slaughtered 1h after drug administration (de Baere et al., 2005).

During the present experiment, the chickens were slaughtered 3 days after administration of ampicillin, which could explain the low levels of residue in chicken livers. Fig.2 highlights the discrimination of chickens exposed and non-exposed to ampicillin indicating changes in liver VOC signatures in response to chicken exposure to ampicillin. These results are consistent with the work of Hermo *et al*. (2014) (Hermo et al., 2014) who demonstrated a metabolic change in the muscle, kidney and liver of amoxicillin-exposed chickens, and suggested that endogenous compounds underwent changes from normal levels as a consequence of the pharmacological treatment, by up and down regulation.

4.1.4. Exposure to pesticides

Table 2 shows the absence of deltamethrin residues in exposed muscle tissues which may be explained by the limit of detection of the method (1 $\mu g.kg^{-1}$). In an earlier study, Chandra *et al*. (2013) (Chandra et al., 2013) showed that chicken exposure to deltamethrin for 42 days at 150 $mg.kg^{-1}$ feed leads to a detectable accumulation of deltamethrin in their breast muscles at 0.037 $\mu g.kg^{-1}$. The dose administered in the current study was 25-fold lower than in their experiment which may, together with animal-related factors, explain the non-detection of deltamethrin. Fig. 2 nevertheless demonstrates the separation of the deltamethrin-exposed group from the control group which emphasize the potential of liver volatolomic VOC signatures to reveal animal exposure to deltamethrin despite this contaminant not being detectable in the animal tissues. In fact, Chandra *et al*. (2013) (Chandra et al., 2013) reported that chicken exposure to deltamethrin was responsible for generating free radicals in excess and disruption of antioxidant defenses which may explain the changes in liver VOC levels in response to chicken exposure to deltamethrin.

Table 2 shows that the concentration of lindane in exposed muscle tissues is lower than the maximum level fixed at 20 $\mu g.kg^{-1}$ of fresh matter (2002/32/EC). Similarly, Xue *et al*. (2010) (Xue et al., 2010) showed that after oral exposure of rabbits to lindane at a lower dose of 1.25 $mg.kg^{-1}$ feed during only 4 days induced the accumulation of residues in muscles at 12 $ng.g^{-1}$ fresh tissue. This result confirms the transfer of lindane from contaminated feed to chicken tissues, while the much lower dose used in the current study may explain the low lindane level in exposed chicken muscles compared to the maximum level at 20 $\mu g.kg^{-1}$ (2005/396/EC).

In addition, Fig.2 presents the separation of the lindane group from the control group which highlights changes in liver VOC levels in response to chicken exposure to lindane. Previous work demonstrated that γ-HCH induced an increase in liver P-450 levels and liver lipid peroxidation rates with no changes in cytochrome P-450 reductase activity (Barros et al., 1991). In the same way, Hakim *et al*. (2012) (Hakim et al., 2012) suggested that peroxidation

of lipid membranes and the induction of some detoxifying enzymes in the livers are responsible for the changes in liver VOC levels.

4.1.5. Exposure to mycotoxins

The results in Table 2 present the accumulation of fumonisin B1 and fumonisin B2 in exposed chicken livers. Tardieu *et al*. (2009) (Tardieu et al., 2009) highlighted the persistence of fumonisin B1 in the livers of ducks exposed for 12 days to fumonisins (B1&B2), the concentration of fumonisin B1 reached 16 and 20 $\mu g.kg^{-1}$ in duck liver fed at 10 and 20 $mg.kg^{-1}$ feed, respectively. In our study, chickens were exposed to fumonisins (B1 & B2) over a much longer period which probably explain the high concentration of fumonisin B1 in exposed chicken livers.

Fig. 2 shows that the exposed and control chickens are separated which highlights liver volatolomic changes in response to exposure to fumonisins. In fact, Wang *et al*. (2016) (Wang et al., 2016) showed in their recent review that oxidative stress plays a critical role in the expression of fumonisins toxicity in exposed bodies and high concentrations of reactive oxygen species (ROS) lead to the disruption of redox homeostasis, initiation of the process of lipid peroxidation in the lipid membrane causing damage to the cell membrane, and DNA damage by propagating a chain reaction. In accordance with these results, oxidative stress was reported to be one of two phenomena responsible for the changes in liver volatolomic composition of liver.

Table 2 also highlights the non-detection of zearalenone and its metabolites (α-zearalenol and α-zearalanol) in the livers of exposed chickens. This result was similarly reported in a previous study where laying hens exposed to zearalenone at 1.1 $mg.kg^{-1}$ feed over 16 weeks induced the accumulation of low levels of zearalenone (<1 $\mu g.kg^{-1}$ fresh tissue) and α-zearalenol (1.3 $\mu g.kg^{-1}$ fresh tissue) in the liver (Danicke et al., 2002). These authors explained that the low residue levels of α-zearalenol detected in livers were probably dose-related. The realistic administered dose of zearalenone together with the rapid excretion of this mycotoxin (Kuipergoodman et al., 1987) may explain the absence of residues and metabolites in livers.

It is to be noted that Fig. 2 shows that chickens exposed to zeralenone are not differentiated from control chickens, suggesting that no significant differences in liver volatolomic VOC signatures in response to dietary chicken exposure to zearalenone. In the present study, the zearalenone dose was at a realistic concentration (< 0.5 $mg.kg^{-1}$ of feed) (Danicke et al., 2002), which was probably too low to generate changes in the liver volatolomic response.

It has been shown that zearalenone induced ROS formation and loss of mitochondrial membrane potential occurs in a dose dependent manner (Venkataramana et al., 2014).

4.2. Candidate markers to reveal micropollutant exposure

A list of promising VOC markers were identified for chicken exposure to cadmium, PCB low level, PCB high level, monensin, ampicillin, deltamethrin, lindane and fumonisins (section 3.2). The candidate VOC markers belong to several distinct chemical families: hydrocarbons, alcohols, ketones, carboxylic acids, furans, sulfur compounds and aromatic compounds. The result shows that butane was upregulated in the livers of chickens exposed to lindane.

Hakim *et al*. (2012) (Hakim et al., 2012) explained in their review that the main mechanism which affects the emission of hydrocarbons in the body is oxidative stress. These authors explained that alkanes are mainly produced by the peroxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFA), which are most often affected because they contain multiple double bonds between which are methylene (CH_2) groups with especially reactive hydrogens. Moreover, the activation of some detoxifying enzymes, like cytochrome p450, in the liver induces the hydroxylation of some hydrocarbons to primary and secondary alcohols. In fact, the results of the present study reveal many alcohols (1-propanol, 2-propanol, 2-butanol, 3-penten-2-ol, 4-hexen-1-ol, 2,5-dimethyl-1,5-hexadien-3-ol and 5-methyl-3-heptanol) as markers of cadmium, PCB low, PCB high, monensin, deltamethrin, lindane and fumonisins exposed groups.

A similar downregulation of 2-propanol is observed in the livers of chickens exposed to PCB low, PCB high, monensin and fumonisins. Also, the abundances of 2-butanol and 2,5-dimethyl-1,5-hexadien-3-ol decreased in the livers of the monensin and the cadmium groups, respectively. Furthermore, 3-penten-2-ol, 5-methyl-3-heptanol, and 1-propanol were downregulated in the livers of the deltamethrin, lindane, and fumonisins group, respectively.

On the other hand, 4-hexen-1-ol increased in the livers of the deltamethrin group but decreased in the liver of monensin group, compared to control livers. The decrease in the abundances of alcohols in response to chicken exposure may be explained by the activation of alcohol dehydrogenase which is a member of a general class of enzymes called oxidoreductases (ADH) that catalyze the oxidation of alcohols to form ketones and aldehydes in the liver through the reduction of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD+ to NADH) (Hakim et al., 2012).

Regarding ketones, 1-penten-3-one was similarly downregulated in the livers of the cadmium, PCB high, lindane and ampicillin groups. The production of 3-ethylcyclopentanone was also downregulated in the livers of the PCB low and lindane groups.

In addition, the results emphasize the decrease in 2-butanone in the livers of the PCB high group, while 2,2,6-trimethylcyclohexanone and 3,5,5-trimethyl-2 cyclohexen-1-one were downregulated in the livers of the PCB low group. In the same way, Filipiak *et al*. (2010) (Filipiak et al., 2010) reported that 3-penten-2-one and 2-butanone were taken up (consumed or degraded) by cancer cells. However, we noted the upregulation of 3-hepten-2-one and 6-methyl-2-heptanone in the livers of ampicillin exposed group, compared to control group (Table 5). Previously, Hakim *et al*. (2012) (Hakim et al., 2012) explained that pathologies and exposure to toxicants modified the metabolism of proteins and resulted in an increase in the production of ketones.

For aldehydes, nonanal was found to be exclusively released in the livers of the deltamethrin group. In fact, C5–C10 aldehydes are within acceptably low levels in ambient air and are not known to be generated by any normal metabolic pathway (Fuchs et al., 2010). Moreover, Hakim *et al*. (2012) (Hakim et al., 2012) reported changes in aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity which is responsible for the oxidation of aldehydes into carboxylic acids in the liver and could be a functional marker for tumor growth. Regarding carboxylic acids, propionic acid was found to be upregulated in the liver of the cadmium and fumonisins exposed chickens, but it was downregulated in the livers of the monensin group.

Similarly, two furans were identified: 2-pentyl-furan and dihydro-5-ethyl-2(3H)-furanone. The abundance of 2-pentyl-furan decreased in the liver of the PCB low group. However, the abundance of dihydro-5-ethyl-2(3H)-furanone showed the opposite trend, so that it increased in the livers of chickens exposed to cadmium, PCB low, deltamethrin, lindane and fumonisins. This compound is considered as an exogenous pollutant which might, activate the mechanical, cellular, and enzymatic defense mechanisms to eliminate this hazardous compound. Thus, it could be used as a marker for following chicken exposure to these micropollutants.

Interestingly, the results showed a decrease of carbon disulfide in the livers of the deltamethrin-exposed group and a decrease of dimethylsulfide in the livers of fumonisins group compared to control group. Otherwise, the abundance of dimethylsulfoxide was downregulated in the livers of PCB high groups.

In line with these result, Silva *et al*. (2012) (Silva et al., 2012) found that volatile sulphur-containing metabolites such as dimethylsulfide are generated in humans by the incomplete metabolism of methionine in the transamination pathway, and they were dramatically downregulated as a consequence of cancer growth.

Finally, the present study found four aromatic compounds to be affected: α-methylstyrene, α-methyl-benzenemethanol, butyrolactone and toluene. The abundance of α-methylstyrene decreased markedly in the livers of chickens exposed to cadmium, PCB low and PCB high, lindane, deltamethrin, and ampicillin. Furthermore, α-methyl-benzenemethanol decreased in the monensin exposed chickens, butyrolactone decreased in the cadmium and ampicillin exposed groups, and toluene decreased in fumonisins exposed group.

Usually, aromatic compounds are reported as exogenous molecules of reactive nature of great interest which can leak into the cytoplasm, attacking organs or organelles in the body and causing peroxidative damage to proteins, PUFA, and DNA (Hakim et al., 2012).

5. Conclusions

The aim of the present study was to investigate liver volatolomic signatures to identify volatile markers of animal exposure to a wide range of micropollutants. Based on previous methodological developments, liver VOCs were extracted using a new SPME set-up (Bouhlel et al., 2017) and the volatolomic data treatment was performed using a recently-developed unsupervised chemometric method named Common Components Analysis (Bouhlel *et al*. 2017). The results revealed changes in liver volatolome in response to exposure of chickens to a heavy metal (cadmium), environmental micropollutants at low and high doses, two veterinary drugs (monensin and ampicillin), two pesticides (deltamethrin and lindane) and a mycotoxin (fumonisins). The identified VOC markers belong to distinct chemical families, including hydrocarbons, alcohols, aldehydes, ketones, carboxylic acids, furans, sulphur compounds and aromatic compounds. Some of the candidate VOC markers were of endogenous origin, generated in the chicken body during normal metabolic processes or produced by the activation of the volatolomic response due to exposure to the micropollutants. Others markers were of exogenous origin and the cause of their variation between control and contaminant groups will need to be clarified. The volatolomic signatures are shown to be a useful tool to reveal VOC markers of animal exposure to different chemical micropollutant families and this volatolomic approach could also be applied to other non-invasive biological media, such as plasma, in order to assure a less invasive sampling methods.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the French National Research Agency, project SOMEAT. Contact No. ANR-12-1LID-0004. Safety of Organic Meat. Available at http://www.so-meat.fr.

REFERENCES

Abaffy, T., Moller, M.G., Riemer, D.D., Milikowski, C., DeFazio, R.A., 2013. Comparative analysis of volatile metabolomics signals from melanoma and benign skin: a pilot study. Metabolomics 9, 998-1008.

Barros, S.B.M., Simizu, K., Junqueira, V.B.C., 1991. LIVER LIPID PEROXIDATION-RELATED PARAMETERS AFTER SHORT-TERM ADMINISTRATION OF HEXACHLOROCYCLOHEXANE ISOMERS TO RATS. Toxicol. Lett. 56, 137-144.

Benarbia, M.E., Macherel, D., Faure, S., Jacques, C., Andriantsitohaina, R., Malthiery, Y., 2013. Plasmatic concentration of organochlorine lindane acts as metabolic disruptors in HepG2 liver cell line by inducing mitochondrial disorder. Toxicol. Appl. Pharmacol. 272, 325-334.

Berge, P., Ratel, J., Fournier, A., Jondreville, C., Feidt, C., Roudaut, B., Le Bizec, B., Engel, E., 2011. Use of Volatile Compound Metabolic Signatures in Poultry Liver to Back-Trace Dietary Exposure to Rapidly Metabolized Xenobiotics. Environ. Sci. Technol. 45, 6584-6591.

Bernard, A., 2004. Renal dysfunction induced by cadmium: biomarkers of critical effects. Biometals 17, 519-523.

Bouhlel, J., Ratel, J., Abouelkaram, S., Mercier, F., Travel, A., Baéza, E., Jondreville, C., Dervilly-Pinel, G., Marchand, P., Bizec, B.L., Dubreil, E., Mompelat, S., Verdon, E., Inthavong, C., Guérin, T., Rutledge, D.N., Engel, E., 2017. Solid-phase microextraction set-up for the analysis of liver volatolome to detect livestock exposure to micropollutants. J. Chromatogr. A.

Buszewski, B., Ulanowska, A., Kowalkowski, T., Cieslinski, K., 2012. Investigation of lung cancer biomarkers by hyphenated separation techniques and chemometrics. Clin. Chem. Lab. Med. 50, 573-581.

Chandra, N., Jain, N.K., Sondhia, S., Srivastava, A.B., 2013. Deltamethrin Induced Toxicity and Ameliorative Effect of Alpha-Tocopherol in Broilers. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 90, 673-678.
Charvat, R.A., Arrizabalaga, G., 2016. Oxidative stress generated during monensin treatment contributes to altered Toxoplasma gondii mitochondrial function. Sci Rep 6.

Chen, C., Gonzalez, F.J., Idle, J.R., 2007. LC-MS-based metabolomics in drug metabolism. Drug Metab. Rev. 39, 581-597.

Danicke, S., Ueberschar, K.H., Halle, I., Matthes, S., Valenta, H., Flachowsky, G., 2002. Effect of addition of a detoxifying agent to laying hen diets containing uncontaminated or Fusarium toxin-contaminated maize on performance of hens and on carryover of zearalenone. Poult. Sci. 81, 1671-1680.
de Baere, S., Wassink, P., Croubels, S., de Boever, S., Baert, K., de Backer, P., 2005. Quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of amoxycillin in broiler edible tissues. Anal. Chim. Acta 529, 221-227.

Digiulio, R.T., Scanlon, P.F., 1984. SUBLETHAL EFFECTS OF CADMIUM INGESTION ON MALLARD DUCKS. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 13, 765-771.

Donoho, A.L., Herberg, R.J., Zornes, L.L., Vanduyn, R.L., 1982. EXCRETION AND TISSUE DISTRIBUTION OF C-14 -LABELED MONENSIN IN CHICKENS. J. Agric. Food Chem. 30, 909-913.

Dubin, E., Spiteri, M., Dumas, A.S., Ginet, J., Lees, M., Rutledge, D.N., 2016. Common components and specific weights analysis: A tool for metabolomic data pre-processing. Chemometrics Intell. Lab. Syst. 150, 41-50.

Engel, E., Ratel, J., Bouhlel, J., Planche, C., Meurillon, M., 2015. Novel approaches to improving the chemical safety of the meat chain towards toxicants. Meat Sci. 109, 75-85.

Fernandes, A., Mortimer, D., Rose, M., Gem, M., 2010. Dioxins (PCDD/Fs) and PCBs in offal: Occurrence and dietary exposure. Chemosphere 81, 536-540.

Filipiak, W., Sponring, A., Filipiak, A., Ager, C., Schubert, J., Miekisch, W., Amann, A., Troppmair, J., 2010. TD-GC-MS Analysis of Volatile Metabolites of Human Lung Cancer and Normal Cells In vitro. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 19, 182-195.

Focant, J.F., 2012. Dioxin food crises and new POPs: challenges in analysis. Anal. Bioanal. Chem. 403, 2797-2800.

Fuchs, P., Loeseken, C., Schubert, J.K., Miekisch, W., 2010. Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer. Int. J. Cancer 126, 2663-2670.

Gaud Dervilly-Pinel, T.G., Brice Minvielle, Angélique Travel, Jérôme Normand,, Marie Bourin, E.R., Estelle Dubreil, Sophie Mompelat, Frédéric Hommet, Marina Nicolas,, Vincent Hort, C.I., Mailie Saint-Hilaire, Claude Chafey, Julien Parinet,, Ronan Cariou, P.M., Bruno Le Bizec, Eric Verdon, Erwan Engel, 2017. Micropollutants and chemical residues in organic and conventional meat. Food Chem. 232, 218-228.

Hakim, M., Broza, Y.Y., Barash, O., Peled, N., Phillips, M., Amann, A., Haick, H., 2012. Volatile Organic Compounds of Lung Cancer and Possible Biochemical Pathways. Chem. Rev. 112, 5949-5966.

Hermo, M.P., Saurina, J., Barbosa, J., Barron, D., 2014. High-resolution mass spectrometry applied to the study of metabolome modifications in various chicken tissues after amoxicillin administration. Food Chem. 153, 405-413.

Kuipergoodman, T., Scott, P.M., Watanabe, H., 1987. RISK ASSESSMENT OF THE MYCOTOXIN ZEARALENONE. Regul. Toxicol. Pharmacol. 7, 253-306.

Mocarelli, P., Gerthoux, P.M., Patterson, D.G., Milani, S., Limonta, G., Bertona, M., Signorini, S., Tramacere, P., Colombo, L., Crespi, C., Brambilla, P., Sarto, C., Carreri, V., Sampson, E.J., Turner, W.E., Needham, L.L., 2008. Dioxin exposure, from infancy through puberty, produces endocrine disruption and affects human semen quality. Environ. Health Perspect. 116, 70-77.

Mochalski, P., King, J., Haas, M., Unterkofler, K., Amann, A., Mayer, G., 2014. Blood and breath profiles of volatile organic compounds in patients with end-stage renal disease. BMC Nephrol. 15.

O'Kane, A.A., Chevglier, O.P., Graham, S.F., Elliott, C.T., Mooney, M.H., 2013. Metabolomic Profiling of In Vivo Plasma Responses to Dioxin-Associated Dietary Contaminant Exposure in Rats: Implications for Identification of Sources of Animal and Human Exposure. Environ. Sci. Technol. 47, 5409-5418.

Petropulos, V.I., Bogeva, E., Stafilov, T., Stefova, M., Siegmund, B., Pabi, N., Lankmayr, E., 2014. Study of the influence of maceration time and oenological practices on the aroma profile of Vranec wines. Food Chem. 165, 506-514.

Phillips, M., Cataneo, R.N., Saunders, C., Hope, P., Schmitt, P., Wai, J., 2010. Volatile biomarkers in the breath of women with breast cancer. J. Breath Res. 4.

E.M. Qannari, I.Wakeling, P. Courcoux, H.J.H. MacFie, Defining the underlying sensory dimensions, Food Qual. Prefer. 11 (2000) 151–154.

Renugadevi, J., Prabu, S.M., 2010. Quercetin protects against oxidative stress-related renal dysfunction by cadmium in rats. Exp. Toxicol. Pathol. 62, 471-481.

*SAISIR, P.o.f.f.c.i.t.M.R.e.*B., Interactions, Assemblage, INRA: France, 2008.

Saitoh, W., Yamauchi, S., Watanabe, K., Takasaki, W., Mori, K., 2014. Metabolomic analysis of arginine metabolism in acute hepatic injury in rats. J. Toxicol. Sci. 39, 41-50.

Silva, C.L., Passos, M., Camara, J.S., 2011. Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry. Br. J. Cancer 105, 1894-1904.

Silva, C.L., Passos, M., Camara, J.S., 2012. Solid phase microextraction, mass spectrometry and metabolomic approaches for detection of potential urinary cancer biomarkers-A powerful strategy for breast cancer diagnosis. Talanta 89, 360-368.

Tardieu, D., Bailly, J.D., Benlashehr, I., Auby, A., Jouglar, J.Y., Guerre, P., 2009. Tissue persistence of fumonisin B1 in ducks and after exposure to a diet containing the maximum European tolerance for fumonisins in avian feeds. Chem.-Biol. Interact. 182, 239-244.

Theumer, M.G., Canepa, M.C., Lopez, A.G., Mary, V.S., Dambolena, J.S., Rubinstein, H.R., 2010. Subchronic mycotoxicoses in Wistar rats: Assessment of the in vivo and in vitro genotoxicity induced by fumonisins and aflatoxin B-1, and oxidative stress biomarkers status. Toxicology 268, 104-110.

Venkataramana, M., Nayaka, S.C., Anand, T., Rajesh, R., Aiyaz, M., Divakara, S.T., Murali, H.S., Prakash, H.S., Rao, P.V.L., 2014. Zearalenone induced toxicity in SHSY-5Y cells: The role of oxidative stress evidenced by N-acetyl cysteine. Food Chem. Toxicol. 65, 335-342.

Wang, C., Feng, R.N., Li, Y.Y., Zhang, Y.B., Kang, Z., Zhang, W., Sun, D.J., 2014. The metabolomic profiling of serum in rats exposed to arsenic using UPLC/Q-TOF MS. Toxicol. Lett. 229, 474-481.

Wang, X., Wu, Q.H., Wan, D., Liu, Q.Y., Chen, D.M., Liu, Z.L., Martinez-Larranaga, M.R., Martinez, M.A., Anadon, A., Yuan, Z.H., 2016. Fumonisins: oxidative stress-mediated toxicity and metabolism in vivo and in vitro. Arch. Toxicol. 90, 81-101.

Wilk, M.B., Gnanades.R, 1968. PROBABILITY PLOTTING METHODS FOR ANALYSIS OF DATA. Biometrika 55, 1-&.

Xue, M.A., Shen, G.F., Yu, J.L., Zhang, D.Y., Lu, Z.J., Wang, B., Lu, Y., Cao, J., Tao, S., 2010. Dynamic changes of alpha-hexachlorocyclohexane and its enantiomers in various tissues of Japanese Rabbits (Oyctolagus cuniculus) after oral or dermal exposure. Chemosphere 81, 1486-1491.

Supplementary data for

Liver Volatolomics to Reveal Markers of Poultry Exposure to Micropollutants

Jihéne Bouhlel[a,b], Jérémy Ratel[a], Said Abouelkaram[a], Elisabeth Baéza[c], Catherine Jondreville[c], Gaud Dervilly-Pinel[d], Eric Verdon[e], Thierry Guérin[f], Douglas N. Rutledge[b], Erwan Engel[a*]

[a]*INRA, UR 370 QuaPA, MASS laboratory, Saint-Genès-Champanelle, France*
[b]*UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, Massy, France*
[c]*ITAVI, UR83 Recherches Avicoles, INRA, Centre Val de Loire, 37380 Nouzilly, France*
[4]*Oniris, LABERCA, Nantes, France*
[e]*ANSES, Reference laboratory for veterinary drug residues in food, Fougères, France*
[f]*ANSES, Laboratory for Food Safety, Maisons-Alfort, France*

Table S1. List of the volatile compounds extracted by SPME in control and contaminated chicken livers.

Compound	Specific ion (m/z)	Retention index	Retention time (min)
Butane	58	427	5.17
Ethanol	45	442	5.74
Acetone	58	459	6.40
2-Propanol	45	463	6.51
Pentane	72	467	6.68
Dimethylsulfide	62	479	7.16
Carbon disulphide	76	497	7.82
Acetic acid	60	519	8.81
1-Propanol	59	504	8.25
2-Butanone	72	541	9.70
2-Butanol	45	548	9.90
2-Methylfuran	82	551	10.10
3-Penten-2-ol	71	562	10.50
2-Methyl-1-propanol	33	578	11.09
1-1-1-Trichloroethane	97	607	12.15
1-Butanol	56	620	12.94
Benzene	78	622	13.15
Propionic acid	74	631	13.70
1-Pentan-3-ol	57	640	14.01
1-Penten-3-one	86	643	14.44
Heptane	100	657	15.10
3-Methyhexane	57	658	15.50
3-Methylbutan-1-ol	54	694	17.24
1-Methyl-1-H-pyrrole	81	698	17.50
1-Pentanol	55	724	19.18
Toluene	91	729	19.75
2-Methyl-1-penten-3-ol	71	731	19.70
Pentanenitrile	54	732	19.72
3-Hepten-2-one	55	746	20.60
Hexanal	56	758	21.40
Dimethylsulfoxide	63	787	23.45
2,5-Dimethyl-1,5-hexadien-3-ol	71	805	24.50
4-Hexen-1-ol	67	810	24.98
1-Hexanol	69	823	25.50
4-Heptanone	71	828	26.07
o-Xylene	106	832	26.22
Methoxy-phenyl-oxime	133	837	26.64
2-Heptanone	58	845	27.12
1-Hepten-4-ol	55	847	27.24
p-Xylene	45	855	27.80
Dimethylsulfone	79	863	28.23
p-Xylene	45	855	27.80
Dimethylsulfone	79	863	28.23

Compound	Specific ion (m/z)	Retention index	Retention time (min)
Butyrolactone	42	865	28.40
Benzene-methoxy	108	878	29.31
Dihydro-3-methyl-2(3H)-furanone	56	906	31.00
6-Methyl-2-heptanone	95	907	31.13
Hexanoic acid	60	915	31.575
3-Ethylcyclopentanone	83	916	31.72
2,6-Dimethyl-1,7-octadiene-3,6-diol	67	918	31.90
Benzaldehyde	77	923	32.22
Phenol	94	928	32.44
1-Octen-3-one	70	931	32.70
1-Octen-3-ol	57	932	32.78
alpha-Methylstyrene	118	940	33.27
2-PentylFuran	81	946	33.54
5-Methyl-3-heptanol	59	950	33.75
144-Trimethylcyclopentanone	93	959	34.37
2-Methyl-2-Hepten-4-one	83	960	34.41
3-Nonene	126	963	34.72
2-Ethyl-1-hexanol	57	979	35.57
4-Ethylcyclohexanone	67	990	36.28
2,2,6-Trimethylcyclohexanone	55	992	36.42
3,5,5-Trimethyl-2-Cyclohexen-1-one	82	996	36.67
Dihydro-5-Ethyl-2(3H)-Furanone	85	1006	37.25
Methyl-amino-3-Cyclohexyl	71	1009	37.60
Methylbenzenemethanol	121	1084	39.20
Nonanal	57	1055	39.99
1,3,3-Trimethyl-2-vinyl-1-cyclohexene	79	1065	40.69
(4E,6E)-4,6-Nonadien-8-yn-3-ol	77	1087	41.83
1,3-Dimethylcyclohexanol	95	1103	42.96
5-Methyl-2-(1-methylethyl)-cyclohexanol	71	1105	43.00
2-Phenoxyethanol	94	1172	46.49
1,3,4-Trimethyl-3-cyclohexene-1-carboxaldehyde	67	1204	46.92
2,4-Dimethylcyclohexanol	95	1197	47.79
1-(1-ethoxyethoxy)-Octane	71	1304	53.12
5,6,7,7a-Tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-, (R)-(4H)-benzofuranone,	67	1493	61.74

Table S2. Micropollutant Analysis in chicken feed and tissue samples: National Reference Laboratories and Reference methods used for the analysis of contaminant residues in chicken feeds and tissue samples.

Contaminants	Tissues	NRL [a]	Feeds		Tissues	
			Reference methods	LOD [b]	Reference methods	
Cadmium	Liver	ANSES (Maison Alfort, France)	COFRAC ANSES CIME 11	0.05 µg/kg feed	COFRAC ANSES CIME 11	LOD=0. 3 µg/kg FT [C]
NDL[1]-PCBs	Muscle	LABERCA (Nantes, France)	GC-HRMS	0.01 µg/kg feed	DGAL_NDL-PCB	LOD=0.3 µg/kg LW [d]
NDL [1]-PCBs	Muscle	LABERCA (Nantes, France)	GC-HRMS	0.01 µg/kg feed	DGAL_NDL-PCB	LOD=0.3 µg/kg LW
Monensin	Liver	ANSES (Fougères, France)	HPLC-UV NF EN ISO 14183	0.2 mg/kg feed	LC-ESI-MS/MS F/CHIM/SM/PTC /002	LOQ=0.5 µg/kg FT
Ampicillin	Liver	ANSES (Fougères, France)	-	-	HPLC-MS/MS L35-IN-AD-ANA-71	LOQ=2.5 µg/kg FT
Deltamethrin	Muscle	ANSES (Maisons-Alfort, France)	GC-MS NF EN 15662	0.02 mg/kg feed	ANSES PBM Pest LSA-INS-0179	LOD= 1 µg/kg FT
Lindane	Muscle	ANSES (Maisons-Alfort, France)	GC-MS NF EN 15662	0.01 mg/kg feed	ANSES PBM Pest LSA-INS-0179	LOD= 0.3 µg/kg FT
Fumonisin B1	Liver	ANSES (Maison-Alfort, France)	HPLC-Fluo L35-IN-MT-ANA-51 NF EN 16006	0.02 mg/kg feed	ANSES PMP BM LSA-INA-0154	LOD=0.3 µg/kg FT
Fumonisin B2	Liver	ANSES (Maison-Alfort, France)	HPLC-Fluo L35-IN-MT-ANA-51 NF EN 16006	0.03 mg/kg feed	ANSES PMP BM LSA-INA-0154	LOD=0.3 µg/kg FT
Zearalenone	Liver	ANSES (Fougères, France)	HPLC-Fluo NF EN 15792	CV=30%	ANSES PBM BM LSA-INS-0155	LOD= 0.3 µg/kg FT

[a] National Reference Laboratories
[b] Limit of Detection
[c] FT: Fresh Tissues
[d] LW: Lipid Wight

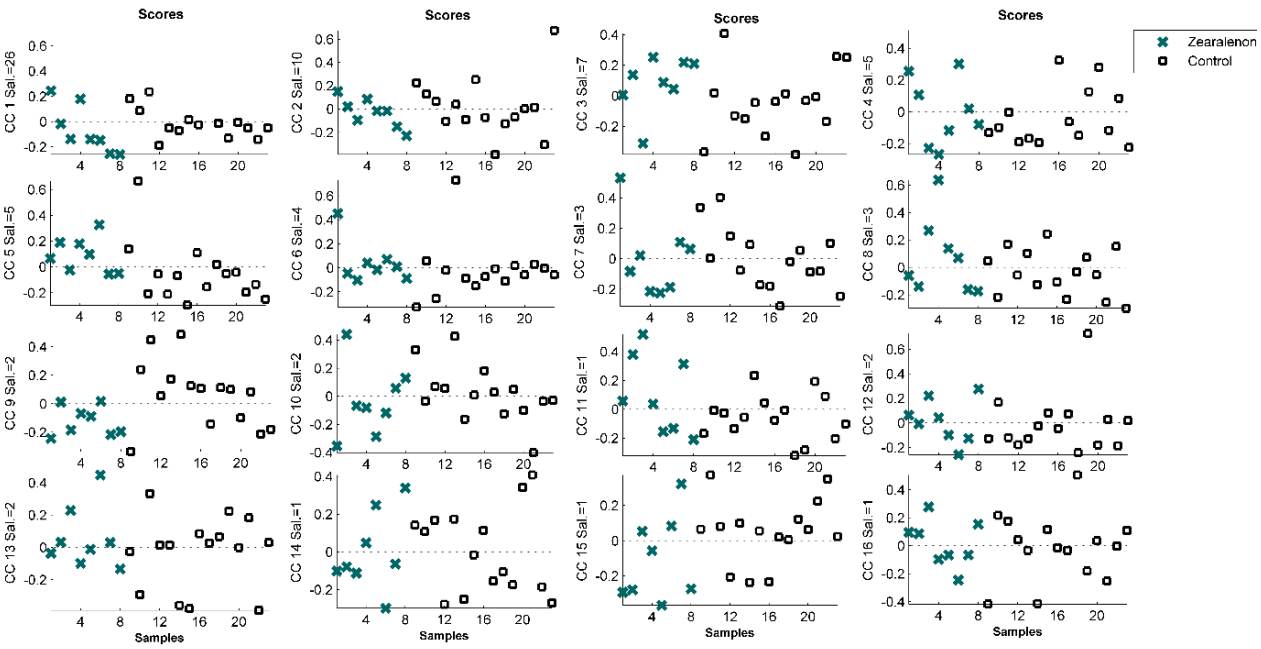


Figure S1. CCA scores of control group (n=15) and zearalenone-exposed group (n=9) onto the first six Common Components. Black squares denote control chickens and green crosses denote chickens contaminated with zearalenone. The sum of the saliences of the contributing variables is given for each Common Component.

Conclusion du chapitre III

Le traitement des données volatolomiques révèle le potentiel des profils des COVs dans le foie pour révéler l'exposition des animaux à plusieurs types de micropolluants. Cette étude confirme les travaux « preuve de concept » réalisés par Berge *et al*. (2001) qui montraient une réponse globale du volatolome à l'exposition à certains contaminants. En effet, les résultats montrent une différenciation entre les groupes d'animaux exposés et non-exposés, au cadmium, à la faible et la forte doses de PCBs, au monensin, à l'ampicilline, à la deltaméthrine, au lindane et aux fumonisines. Cependant, les résultats n'ont pas souligné de changements de la composition des COVs en réponse à l'exposition des animaux à la zéaralénone.

Contrairement à l'hypothèse émise suite à cette première étude de l'équipe MASS, la réponse du volatolome ne semble pas se limiter aux composés métabolisés rapidement. Ainsi, pour les PCBs notamment, Berge *et al*. (2011) [2] ont démontré l'absence de différences volatolomiques en réponse à l'exposition des animaux à une dose 100 fois inférieure à la faible dose administrée dans le cadre de la présente étude. Ces résultats suggèrent un effet dose pour les PCBs sur les changements volatolomiques du foie et peut-être aussi l'effet de la résolution liée à l'exploitation de la dimension chromatographique. D'après ces résultats, on peut conclure le potentiel de la volatolomique pour tracer l'exposition aux micropolluants rapidement métabolisés, et aussi les micropolluants bioaccumulables dans les tissus.

Suite aux développements méthodologiques réalisés dans le chapitre 1, ce travail a permis de mettre en évidence des COVs marqueurs dont la nature chimique est cohérente avec les premiers travaux en volatolomique menés dans le domaine du diagnostic médical par Hakim *et al*. (2012) [1]. Ces auteurs ont suggéré que la présence d'une pathologie ou l'exposition aux micropolluants provoque deux phénomènes susceptibles de modifier la composition hépathocytaire en COVs : un stress oxydatif au niveau cellulaire et l'induction de certaines enzymes de détoxification. En effet, le stress oxydatif génère la peroxydation des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires et génèrent ainsi des composés volatils comme les alcanes, les alcanes branchés, et les alcènes. Par ailleurs, l'activation de certaines enzymes de détoxifications engendre la transformation de ces composés volatils en alcools primaires et secondaires, des aldéhydes, des cétones, et des acides carboxyliques.

En outre, ces marqueurs volatils sont caractérisés par une augmentation ou une diminution par rapport leur niveau normal en réponse à l'exposition aux micropolluants (Annexe 1). Les résultats ont montré un comportement similiaire pour plusieurs COVs comme le 1-Penten-3-

one qui diminue similairement dans le foie des animaux exposés au cadmium, au PCB50, au lindane et à l'ampicilline, la butyrolactone diminue aussi dans le foie des animaux exposés au cadmium, au PCB50 et à l'ampicilline. Par ailleurs, on observe une réponse antagoniste pour le dihydro-5-ethyl-2(3H)-furanone qui augmente en termes d'abondance dans le foie des animaux exposés au cadmium, au PCB10, à la fumonisine, à la deltaméthrine et au lindane. D'autres part, les réponses de certains composés sont différentes en fonction du type d'exposition comme le 4-hexen-1-ol qui diminue en abondance dans le foie des animaux exposés à la monensine et augmente dans le foie des animaux exposés à la deltaméthrine.

Particulièrement, les résultats du traitement simultané des données volatolomiques par ACC ont révélé une séparation de l'ensemble des groupes d'animaux en deux sous-groupes ; le premier sous-groupe constituait des groupes exposés au cadmium, au lindane, à la forte dose de PCBs et à l'ampicilline, et le deuxième sous-groupe constituait des témoins et les groupes exposés à la deltaméthrine, à la faible dose de PCBs, à la monensine, aux fumonisines et à la zéaralénone. Ce résultat a mis en évidence des ressemblances entre les réponses des animaux dans le premier sous-groupe et celles dans le deuxième sous-groupe, ainsi que des différences entre les deux sous-groupes. En effet, cette séparation marque le regroupement des témoins avec les animaux exposés à la faible dose de PCBs et leur séparation de ceux exposés à la forte dose de PCBs, ce qui nous mène à proposer que les micropolluants dans le premier sous-groupe auraient une plus forte toxicité hépatique que les micropolluants dans le deuxième sous-groupe.

En conclusion, l'étude des signatures volatolomiques des COVs dans le foie a permis d'identifier des marqueurs volatils prometteurs pour tracer l'exposition des animaux à différentes familles de micropolluants. En complémentarité avec le volatolome hépatique, la recherche de marqueurs d'exposition aux micropolluants dans le plasma est une idée intéressante à mettre en place qui permet de contrôler la contamination chez l'animal et plus loin chez l'homme par des méthodes moins-invasives, et dans le tissu adipeux qui pourrait servir à terme pour contrôler la contamination des produits alimentaires.

REFERENCES

[1] Hakim, M., Broza, Y.Y., Barash, O., Peled, N., Phillips, M., Amann, A., Haick, H., Volatile Organic Compounds of Lung Cancer and Possible Biochemical Pathways. Chem. Rev. 2012, 112(11), 5949-5966.

[2] Berge, P., Ratel, J., Fournier, A., Jondreville, C., Feidt, C., Roudaut, B., Le Bizec, B., Engel, E., Use of Volatile Compound Metabolic Signatures in Poultry Liver to Back-Trace Dietary Exposure to Rapidly Metabolized Xenobiotics. Environ. Sci. Technol. 2011, 45(15), 6584-6591.

Chapitre IV. Recherche de marqueurs volatils dans le plasma et les tissus adipeux

L'objectif de cette dernière partie de l'étude était de rechercher des COVs marqueurs d'exposition dans le plasma et les tissus adipeux d'animaux exposés et non-exposés aux micropolluants. Le plasma est le fluide circulant qui transporte les métabolites volatils générés notamment par les organes de détoxification dans la circulation sanguine. L'identification de marqueurs d'exposition pourrait ouvrir la voie à un diagnostic moins invasif et *in vivo* de l'exposition aux micropolluants chez l'animal et à terme chez l'homme. Les tissus adipeux sont des tissus de stockage qui du fait de leur caractère lipophile sont susceptibles de capter les composés volatils circulant par voie sanguine. L'identification des marqueurs volatils dans ces tissus pourrait ouvrir la voie au diagnostic de l'exposition aux micropolluants dans les produits alimentaires comme la viande.

En s'appuyant sur les développements méthodologiques réalisés dans le chapitre 1, l'objectif de cette partie du travail de thèse est de révéler des marqueurs volatils candidats dans le plasma et les tissus adipeux pour tracer l'exposition d'animaux à un élément métallique trace, le cadmium ; à un mélange de contaminants environnementaux, un mélange Arochlor de Polychlorobiphényles (PCBs) ; deux produits vétérinaires, la monensine et l'ampicilline ; deux produits phytosanitaires, la deltaméthrine et le lindane ; et deux mycotoxines, les fumonisines (B1&B2) et la zéaralénone.

Partie I. Recherche de marqueurs volatils dans le plasma. Article 3

L'étude portant sur l'application de la volatolomique à la recherche de marqueurs d'exposition d'animaux aux différents types de micropolluants est présentée dans l'article 4 intitulé «Plasma Volatolomics to Reveal Markers of Micropollutant Exposure» préparé pour une soumission au journal '*Metabolomics*'

Plasma Volatolomics to Reveal Markers of Livestock Exposure to Micropollutants

Jihéne Bouhlel[1,2], Jérémy Ratel[1], Said Abouelkaram[1], Patrick Blinet[1], Elisabeth Baéza[3], Catherine Jondreville[3], Gaud Dervilly-Pinel[4], Eric Verdon[5], Thierry Guérin[6], Douglas N. Rutledge[2], Erwan Engel[1*]

[1]*INRA, UR 370 QuaPA, MASS laboratory, Saint-Genès-Champanelle, France*
[2] *UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, Massy, France*
[3] *ITAVI, UR83 Recherches Avicoles, INRA, Centre Val de Loire, 37380 Nouzilly, France*
[4]*Oniris, LABERCA, Nantes, France*
[5]*ANSES, Reference laboratory for veterinary drug residues in food, Fougères, France*
[6] *ANSES, Laboratory for Food Safety, Maisons-Alfort, France*

*Corresponding author: *E-mail: erwan.engel@inra.fr; Phone: +33 (0)4 73 62 45 89.*

ABSTRACT

The study investigated the volatolomic VOC profiles in chicken plasma to reveal volatile organic compounds (VOCs) markers of animal exposure to different types of micropollutants. The experiment was conducted on ten groups of broiler chickens which were exposed or not to one type of micropollutant each. The list of the xenobiotics under study include a heavy metal: cadmium; an environmental micropollutant: a mixture of non-dioxin-like Polychlorobiphenyls (NDL-PCBs); two veterinary substances: a coccidiostat agent, monensin and an antibiotic, ampicillin; two pesticides: deltamethrin and lindane; and two mycotoxins: fumonisins (B1 & B2) and zearalenone. Firstly, the animal contamination levels were verified by National Reference Laboratories (NRLs) in feed and tissue samples. Then, plasma VOCs were analysed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) after extraction by Solid Phase Microextraction (SPME). Data analysis was performed using a multivariate exploratory chemometric method named Common Components Analysis (CCA). Firstly, CCA was simultaneously performed on the normalized SPME-GC-MS data matrix using Probabilistic Quotient Normalization and the results showed no specific distinction between exposed and non-exposed chicken groups. Secondly, CCA was applied to the control group and each exposed group and the results showed differences in plasma VOC levels for the cadmium, PCB high dose (50 µg/kg of feed), monensin, ampicillin, deltamethrin and fumonisins exposed groups, whereas no clear distinction was found for the PCB low dose, lindane and zearalenone exposed groups. The VOC markers identified in the plasma belong to different chemical families like hydrocarbons, alcohols, ketones, aldehydes, carboxylic acids, furans, sulfur compounds and aromatic compounds, which have been reported in previous studies as markers of many types of pathologies and risk exposures. In addition, the result showed the complementarity of liver and plasma volatolome to reveal candidate VOC markers for diagnosing chicken exposure to serval micropollutants. Finally, this study demonstrated the potential of the plasma VOC profiles as a new less-invasive method which detects candidate method which detects candidate VOC markers to back-trace animal exposure to several types of micropollutants.

Keywords: Volatile markers, Plasma, Micropollutants, SPME-GC-MS, Common Components Analysis (CCA).

1. Introduction

The control of the contamination in food products is confirmed to be indispensable to avoid dangerous human exposure via food consumption (Andree et al., 2010). In fact, it has long been known that animal-derived products may be related to chemical safety issues since food producing animals accumulate environmental contaminants or chemical residues during their lifetime (Engel et al., 2015). The health and economic risks that could result from such contaminations led to the European Union (EU) initiating an efficient and pro-active monitoring program to ensure proper feed quality and to maintain most of the population below tolerable weekly intake levels (Focant, 2012). Until now, current approaches used to detect hazardous chemicals in animal derived foods are based on high performance reference methods designed to determine targeted xenobiotic residues present down to trace levels in meat products (Andree et al., 2010). However, these methods are generally economically unsuitable for frequent and routine controls of the contamination in meat chain (Focant, 2012). In addition, some contaminants are known to be rapidly metabolized which makes it difficult to back-trace animal exposure to these substances using such targeted methods (Berge et al., 2011).

Recent advances in metabolomics offers the possibility to detect promising markers associated with diseases (Tulipani et al., 2016) or exposure to contaminants (Calejo et al., 2016). Several studies have particularly stressed the relevance of volatile organic compounds (VOCs) as markers of many pathologies in liver (Hakim et al., 2012), skin (Abaffy et al., 2013), blood (Blount et al., 2006), urine (Silva et al., 2011) or breath (Phillips et al., 2010). In addition, Berge *et al*. (2011) (Berge et al., 2011) showed the potential of liver volatolomic signatures to reveal livestock exposure to different types of micropollutants. Relying on recent developments in VOC analysis (Bouhlel et al., 2017) and chemometric treatment of volatolomic data (Bouhlel *et al*. 2017), the aim of the present work is to identify candidate plasma VOC markers of chicken exposure to different micropollutants. During animal experimentation, chicken groups were intentionally fed with a control diet or diets contaminated with one type of micropollutant each. These were selected due to their toxicity and their possible occurrence in food products (Gaud Dervilly-Pinel et al., 2017). The contaminants under study consist in a heavy metal: cadmium (anhydrous $CdCl_2$, 42852, Alfa Aesar); an environmental micropollutant: a mixture of non-dioxin-like polychlorinated biphenyls (NDL-PCBs) (Arochlor 1260, 90129R, Sigma-Aldrich); two veterinary drugs:

a coccidiostat agent, sodium monensin (Elancoban, E757, Eli Lilly and Company Ltd) and an antibiotic, ampicillin (Ampisol powder, La Chesnais Vet, Tours, France); two pesticides: lindane (lindane pestanal, 45548, Fluka)and deltamethrin deltamethrin (Deltamethrin, 5995, Fluka and deltamethrin pestanal, 45426, Sigma-Aldrich); and two mycotoxins: fumonisins (B1 and B2, ENVT, maize powder, Toulouse, France) and zearalenone (ENVT, rice powder, Toulouse, France). Firstly, the contamination in chicken feed and the transfer of contaminants from feed to tissues are assessed by reference methods. Then, the SPME-GC-MS volatolomic were collected in the plasma of control and exposed chickens and the volatolomic data were treated by CCA analysis in order to identify candidate plasma VOC markers for each type of contaminant exposure. The markers were compared with the liver VOC markers for each type of micropollutant and the metabolic pathways that could be involved in the changes of the levels of plasma VOC markers were discussed.

2. Material and methods

2.1. Micropollutants

The micropollutants under study were introduced in feed with particular precautions, as in Berge *et al*. (2011) (Berge et al., 2011), to assure the homogeneity of the contaminated feeds. Table S1 illustrates the concentrations of these contaminants in animal feeds chosen to be conform to the maximum levels fixed by the regulations in poultry feed and consistent with the limits of detection of the analytical methods used by the National Reference Laboratories (NRLs) to detect residues in exposed animal tissues while being thought to be sufficient to induce a response in the metabolism of exposed livestock.

2.2. Poultry exposure to micropollutants

The conditions of animal breeding are detailed in Bouhlel et al. (2017) (Bouhlel et al., 2017). Briefly, ninety-six male chickens (*Gallus gallus*) (JA 657, Boyé Accouvage, La Boissière-en-Gâtine, France) were raised together until 28 days of age. They were then distributed into ten groups, one control group (n=15) and nine groups (n=9) each contaminated by one type of micropollutant. Chickens were fed in individual cages for 8 weeks (28–84 days of age) with control or contaminated feeds. The feed given to the chickens was a granulated mixture of commercial feed with 5% sunflower oil with or without added micropollutant. For ampicillin-exposed group, ampisol powder was diluted in drinkable water and given to animals during the three consecutive days before slaughtering. At 84 days of age, all chickens were slaughtered according to recommended European standard procedures.

2.3. Sample preparation

Liver and muscle samples were excised from control and exposed chicken carcasses, immersed in liquid nitrogen, wrapped in aluminum foil, vacuum packed, and grounded for 3 min in liquid nitrogen into a fine homogeneous powder using a homemade stainless steel ball mill (Berge et al., 2011). Then, a representative sample of each liver and muscle tissue was prepared for the subsequent analysis of xenobiotic residues by reference methods. For plasma volatolomic analyses, blood was sampled in heparinized tube, vortexed, and centrifuged at 10,000 ×g for 10 min at 4°C. Plasma samples were transferred to a glass tube and capped under nitrogen gas flow for 15 seconds. For each plasma sample, a 1:2 (plasma/water) dilution was used for the sample preparation (Alonso et al., 2013), 0.5 ml of plasma was diluted in a 10-ml SPME vial with 0.5 ml of saturated NaCl solution (Anton et al., 2014), the mixture was closed under a nitrogen flow and vortexed for 10 s (Vortex Genie 2) for homogenization. For the preparation of the quality control samples (QCs), twenty microliters of each plasma sample were collected from control and exposed chickens, mixed together in a 20-ml glass tube, and distributed, so as to obtain 0.5 ml of QC sample in each 10-ml SPME vial. Similarly, QC samples were prepared by dilution of 0.5 ml of the QC mixture with 0.5 ml of saturated NaCl solution, the mixture was closed under a nitrogen flow and vortexed for 10s for homogenization. All plasma samples were stored at −80 °C for subsequent analysis (Berge et al., 2011).

2.4. Micropollutant analysis in feed and tissue samples

The xenobiotics under study were assessed in control and contaminated chicken feeds and tissues according to selective and sensitive analytical methods implemented within the French National Reference Laboratories (NRLs) in charge of each corresponding micropollutants (Gaud Dervilly-Pinel et al., 2017) (Table S2).

2.5. Analysis of plasma volatolome

Volatile organic compounds (VOCs) were extracted from the plasma of chickens by Solid-Phase Micro-extraction (SPME) according to the SPME protocol developed by Bouhlel et al. (2017) (Bouhlel et al., 2017). Each QC sample was injected at the end of each analytical sequence of five plasma samples to monitor the stability of the SPME extraction. Briefly, the day before analysis, plasma samples stored at −80 °C were defrosted for 24 h at 4°C.

A multipurpose sampler (AOC-5000, Shimadzu, Kyoto, Japan) was used to carry out the following successive steps: (i) preheating of samples in the agitator for 10 min at 40°C with a stirring rates at 500 rpm, (ii) trapping of VOCs by SPME fiber 75 µM carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS, 23 gauge needle, Supelco) for 30 min at 40°C, and (iii) desorption of VOCs for 2 min in the GC inlet. The desorbed VOCs were analyzed with a GC-MS QP2010+ (Shimadzu) equipped with Rxi-5SilMS column (60 m x 0.32 mm I.D x 1 µm film thickness) (Restek, Bellefonte, PA). Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 $ml.min^{-1}$. The injections were performed in the splitless mode (2 min). The column temperature program was as follows: 40°C for 5 min, increasing at 3°C/min to 230°C with a final isothermal period of 10 min. For the MS system, the temperatures of the transfer line, quadruple, and ionization source were 230, 200 and 150°C respectively. Positive ion electron impact mass spectra at 70 eV were recorded in the scan mode in the range of m/z 33-250 amu at 10 scans s^{-1}.

2.6. Signal treatment

Volatile compounds were tentatively identified on the basis of mass spectra and retention indices (RI), by comparison with the NIST/EPA/NIH mass spectral library (NIST14) and RI values of our internal data bank. An automatic in-house function developed in Matlab 2014b was used for the integration of the peak areas of the volatile compounds (Bouhlel et al., 2017).

2.7. Data normalization

Normalisation is applied to correct for unwanted global intensity differences and to stabilise the variance within the dataset (Martucci et al., 2014). Probabilistic Quotient Normalisation (PQN) (Dieterle et al., 2006) is commonly used to reduce variations due to sample preparation, sample extraction and instrument performance. It has been applied successfully for normalization in many metabolomics studies (Hrydziuszko and Viant, 2012) (Davies et al., 2014) (Cottet et al., 2014). In the present study, the median of the ratio of the abundance of each VOC over the abundance of the corresponding VOC in the reference vector is computed (Filzmoser and Walczak, 2014), the reference vector being the median of all the signal vectors. The resulting correction coefficient for each sample is used to divide the values of all the VOCs of the corresponding sample (Dieterle et al., 2006).

2.8. Chemometric data treatment

Multivariate data analysis was performed using an exploratory chemometric method, named Common Components and Specific Weights Analysis (ComDim). This multi-block method developed by Qannari *et al*. (2000) (Qannari et al., 2000) has been adapted to extract information from a single data set by applying it to blocks consisting of a single variable each (Dubin et al., 2016). To distinguish this procedure from the standard multi-table situation, we have proposed to call it Common Components Analysis (CCA). CCA estimates a series of orthogonal Common Components (CCs) that are linear combinations with strong weighting of those variables with a similar effect on the dispersion of the samples, thus highlighting variables that behave in the same way as a function of differences among the samples.

Firstly, the SPME-GC-MS data treatment was performed using CCA analysis on the control group (15 samples) concatenated to all the exposed-groups in order to map similarities and differences in the behaviour of VOCs for different contaminant exposure. In this case, the analysed data matrix (95 samples × n variables) is treated as n blocks of size 95 × 1. The scores of control and exposed chickens were plotted along the first 16 CCs to detect those CCs giving a separation between chicken groups.

Secondly, in order to identify differences in the plasma VOCs in response to each micropollutant exposure, CCA was once again applied to the control group (n=15) concatenated to each exposed group (n=9). The analysed data matrix consisted of 24 samples and n VOCs, treated as n blocks of size 24 × 1. The new CCA scores were projected onto 16 common components (CCs) to visualize the differences between the control group and each exposed group. The candidate VOC markers were those with loading contributions greater than plus or minus three standard derivations (±3×SD) along each interesting CC. The significant influencing VOCs are presented in box-and-whisker plots. In the box-and-whisker plot, the box denotes the abundances range (max and min), the central line denotes the median, and the whiskers are used to indicate variability outside the upper and lower quartiles (Sun et al., 2014). In our study, the box plots illustrate the abundances of the significant VOCs between the control group and each exposed group, reflecting the changes in the levels of interesting VOCs that could be promising markers for each contaminant exposure. In-house Matlab functions and the SAISIR toolbox 2008 (Cordella et al., 2012) were used for all CCA data analyses.

3. Results and Discussion

3.1. Analysis of micropollutant residues in feed and tissue samples

Animals showed no sign of any recognizable symptoms of toxicity throughout the course of the study and were found to consume feed normally, except for the death of one chicken exposed to zearalenone during breeding and the limited consumption of contaminated feed in the final stage of breeding for one chicken exposed to cadmium and one chicken exposed to fumonisins, due to locomotor problems.

Table 2 shows that the contaminant levels assessed in contaminated feeds are close to the targeted concentration for each type of micropollutant. Moreover, the contaminants under study are not detected in control feed, except for PCBs and zearalenone, which are detected at very low levels due to background environmental pollution. This demonstrates that chicken feeds are properly contaminated with different micropollutants and confirms the absence of cross contamination during animal breeding.

Table 2. Analysis of micropollutant residues in control and exposed chicken feed and tissue samples.

Contaminant	Tissues	Residues in feeds		Residues in tissues	
		Contaminated	*Control*	*Contaminated*	*Control*
Cadmium	Liver	6.5 mg kg^{-1}	0.02 mg kg^{-1}	3.2± 0.98 mg kg^{-1} F [2]	0.007 mg kg^{-1} F
NDL PCBs	Muscle	8.2 µg kg^{-1}	0.11 µg kg^{-1}	49.3±13 µg kg^{-1} LW [3]	4.7±2.1 µg kg^{-1} LW
NDL PCBs	Muscle	46.3 µg kg^{-1}	0.1 µg kg^{-1}	248 µg kg^{-1} LW	4.7 µg kg^{-1} LW
Monensin	Liver	114 mg kg^{-1}	<LOD [1]	4.53 µg.kg^{-1} F	<LOD
Ampicillin	Liver	-	-	5.24 µg kg^{-1} BW[4]	<LOD
Deltamethrin	Muscle	5.6 mg kg^{-1}	<LOD	< LOD	<LOD
Lindane	Muscle	0.4 mg kg^{-1}	<LOD	6 µg kg^{-1} F	<LOD
Fumonisins (B1&B2)		12.7 mg kg^{-1}	<LOD	-	-
Fumonisin B1	Liver	-	-	30.3±14.2 µg kg^{-1} F	<LOD
Fumonisin B2	Liver	-	-	2.44±1.13 µg kg^{-1} F	<LOD
Zearalenone	Liver	0.4±0.12 mg kg^{-1}	0.03 mg kg^{-1}	<LOD	<LOD

[1] LOD: Limit of Detection
[2] F: Fresh tissues
[3] LW: Lipid Weight
[4] BW: Body Weight

3.1.1. Heavy metal

Table 2 showed that the concentration of cadmium in the livers of exposed chickens reached 3.2±0.9 mg.kg^{-1} fresh tissue which is much higher than the concentration in control livers (7.0±2.0 µg/kg fresh tissue). The liver is reported as being the target organ in which cadmium primarily accumulates and exerts its various deleterious effects (Bernard, 2004). These results confirmed that animals were properly exposed to cadmium and that transfer of cadmium occurred from contaminated feed to exposed chicken livers.

3.1.2. Environmental micropollutants

Table 2 shows that PCB levels measured in the muscles of exposed chickens at PCB10 and PCB50 levels reached 49.3±12.7 and 248±41.5 µg.kg^{-1} lipid weight respectively, and were at 4.7±2.1 µg.kg^{-1} lipid weight in the muscles of control chickens. Previous studies showed that animal exposure to PCBs induced their transfer from blood to organs such as livers and adipose tissues (Fernandes et al., 2010). Moreover, Berge et al. (2011) (Berge et al., 2011) revealed that chickens exposed to PCBs at a dose 100 times lower than the lower level administrated in this work induced the accumulation of PCB residues in livers. These results confirmed that the PCB low and high chicken groups were properly exposed to PCB doses and confirms the transfer from contaminated feeds to chicken tissues.

3.1.3. Veterinary drugs

3.1.3.1. Monensin. The concentration of monensin reached 4.5±1.8 µg.kg^{-1} fresh tissue in the livers of exposed animals (Table 2). The concentration of monensin in liver tissues is far below than the maximum residue level (8 µg.kg^{-1} fresh tissue) expected after animal exposure to the same concentration in feed (2009/124/EC), which is consistent with previous study reporting that monensin is accumulated preferentially in liver with much lower residues in other tissues (Donoho et al., 1982).

3.1.3.2. Ampicillin. Table 2 showed that ampicillin was not detected in the livers of control group but it was detected in the livers of ampicillin-exposed group. Ampicillin residues were quantified in only one exposed chicken liver at 5.2 µg.kg^{-1} fresh tissue (Table 2).

A previous study showed that oral exposure of chickens to a commercial amoxicillin formulation induced the accumulation of amoxicillin residues in liver samples at 2177.8 $\mu g.kg^{-1}$ exclusively for the chickens slaughtered just 1 hour after drug administration (de Baere et al., 2005). In our experiment, chickens were slaughtered 3 days after ampicillin administration, which could explain the low level of ampicillin residues observed.

3.1.4. Pesticides

3.1.4.1. Deltamethrin. The result showed that deltamethrin was not detected in the muscles of exposed chickens (Table 2). It may be explained by the limit of detection of the method (1 µg/kg). In an earlier study, Chandra et al. (Chandra et al., 2013) showed that chicken exposure to deltamethrin for 42 days at 100 and 150 mg/kg feed leads to a detectable accumulation of deltamethrin in their breast muscles at 47 and 39 µg/kg, respectively. However, the administrated dose was more than 25-fold lower in the present experiment which may, together with animal-related factors, explain the non-detection of deltamethrin.

3.1.4.2. Lindane. The concentration of lindane reached 6.0±1.0 $\mu g.kg^{-1}$ fresh tissue in the muscles of exposed animals and was not detected in control muscles (Table 2). The concentration of lindane is lower than of the maximum level fixed at 20 $\mu g.kg^{-1}$ of fresh matter (2002/32/EC). Xue et al. (2010) (Xue et al., 2010) showed that oral exposure of rabbit during 4 days to lindane at a concentration 3-fold higher than the dose administrated to chickens here induced the accumulation of residues in muscles at 12 $ng.g^{-1}$ fresh tissue. This result confirmed the transfer of lindane from contaminated feed to exposed chicken tissues, and may explain the low lindane level in exposed chicken muscles compared to the maximum level.

3.1.5. Mycotoxins

3.1.5.1. Fumonisins. The concentrations of fumonisin B1 and fumonisin B2 reached 30.3±14.2 and 2.4±1.1 $\mu g.kg^{-1}$ fresh tissue respectively in the livers of exposed chickens and were not detected in control livers (Table 2).

Tardieu et al. (2009) (Tardieu et al., 2009) highlighted the persistence of fumonisin B1 in the livers of ducks exposed for 12 days to fumonisins, the concentration of fumonisin B1 reached

16 and 20 µg.kg^{-1} in duck liver fed at 10 and 20 mg.kg^{-1} feed, respectively.
In our study, chickens were exposed to fumonisins during a much longer period which probably explain the higher concentration of fumonisin B1.

3.1.5.2. Zearalenone. Zearalenone and its metabolites (α-zearalanol and of α-zearalenol) were analyzed in control and exposed chicken livers. The result (Table 2) highlighted the non-detection of zearalenone and its metabolites (α-zearalenol and α-zearalanol) in the livers of exposed chickens which was similarly reported in a previous study where laying hens exposed to zearalenone at 1.1 mg.kg^{-1} feed during 16 weeks led to the accumulation of low levels of zearalenone (<1 µg.kg^{-1} fresh tissue) and α-zearalenol (1.3 µg.kg^{-1} fresh tissue) in chicken livers (Danicke et al., 2002). These authors explained that the low residues of α-zearalenol detected in livers was probably dose-related. The realistic dose of zeralenone administrated in the present study together with the rapid excretion of this mycotoxin from exposed chicken bodies (Kuipergoodman et al., 1987) may explain the absence of zeralenone residues and its metabolites.

3.2. Determination of plasma VOC markers for contaminant exposure

A list of 70 VOCs were tentatively identified in the plasma of exposed and non-exposed chickens. Firstly, CCA was performed on the PQN normalized data matrix of the collected SMPE-GC-MS signatures in the plasma of control chickens and all exposed chickens (95 samples ×70 COV abundances). The projection of CCA scores illustrates the overlapping of chicken groups along the 16 CCs (Figure S1). These results points out the difficulty to differentiating exposed and non-exposed chickens using simultaneously all the plasma volatolomic data. In order to detect changes in plasma VOC levels induced by each type of contaminant exposure, CCA is performed separately on each exposed group (n=9) against the control group (n=15).

3.2.1. Exposure to cadmium

Fig. 1 illustrates the separation of the cadmium-exposed group from the control group along CC4 and so reflects changes in chicken plasma volatolome in response to dietary chicken exposure to cadmium. The loading standard deviations (±3×SD) were calculated to select the contributing VOCs on the group separation.

The projection in Fig. 2 illustrates the most influencing VOCs on the separation of the cadmium exposed group from control group along CC4.

These VOCs correspond to butane, ethanol, acetic acid, carbon disulfide, and butyrolactone. In the same way, Bouhlel *et al*. (2017) have shown that chicken exposure to the same dose of cadmium was responsible for changes in several liver VOC markers which correspond to 1-penten-3-one, 2,5-dimethyl-1,5-hexadien-3-ol, propionic acid, butyrolactone, α-methylstyrene, and dihydro-5-ethyl-2(3H)-furanone. These results demonstrated that butyrolactone was commonly identified in liver and plasma volatolome as marker of chicken exposure to cadmium. Otherwise, liver and plasma volatolomes give different candidate VOC markers. The box-and-whiskers plot of the abundances of these candidate VOC markers (Fig. 3) showd their increase in response to exposure to cadmium, whereas the liver candidate markers were downregulated, except for propionic acid and dihydro-5-ethyl-2(3H)-furanone. These results ssuggests that endogenous VOC markers underwent different changes from normal levels in liver and plasma volatolomes as a consequence of the cadmium treatment, by up- and down-regulation. Thus, we emphasize that liver and plasma candidate VOC markers are complementary to reflect changes in response to cadmium exposure.

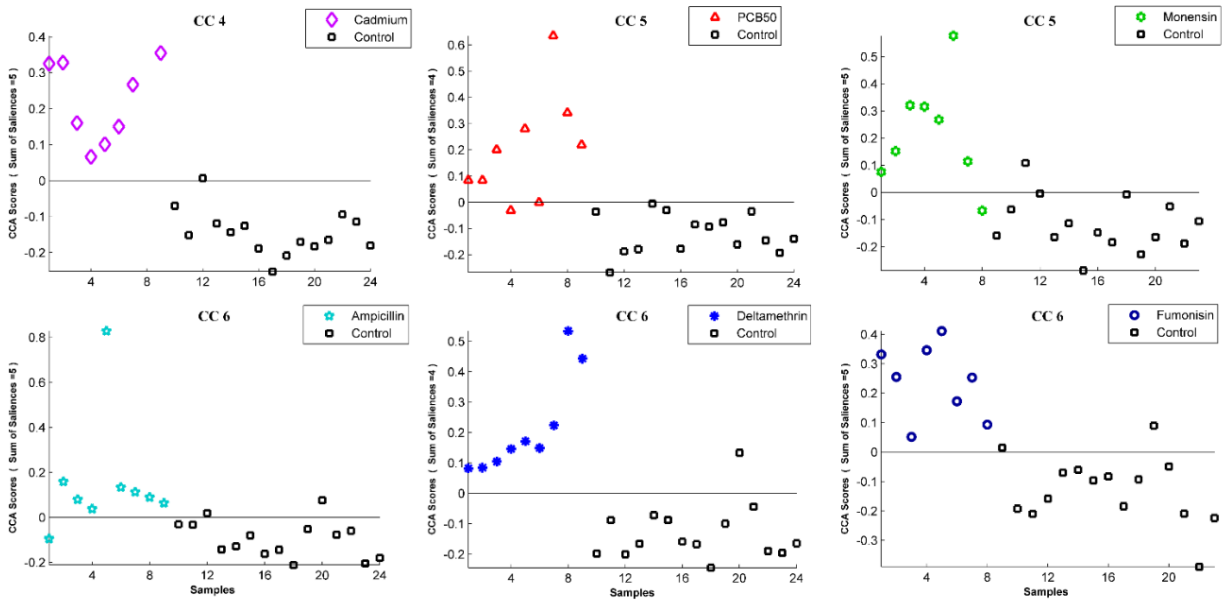


Fig. 1. Result of CCA applied to PQN normalized plasma data matrix between control group and each exposed group. CCA scores of control group (n=15) and each exposed group (n=9) along each interesting Common Component. The sum of the saliences of the contributing variables is given for each interesting Common Component.

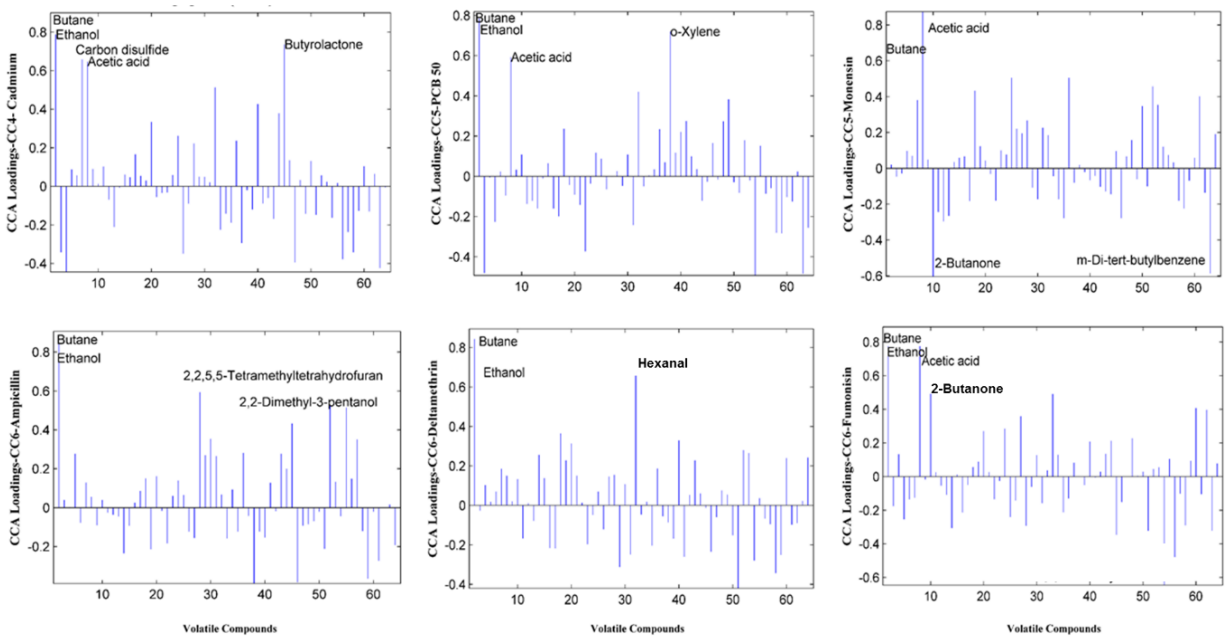


Fig. 2. Contribution of CCA loadings to each Common Component which separated an exposed group from the non-exposed group. The VOCs most contributing to each separation were selected based on standard deviations (±3×SD) of the loadings.

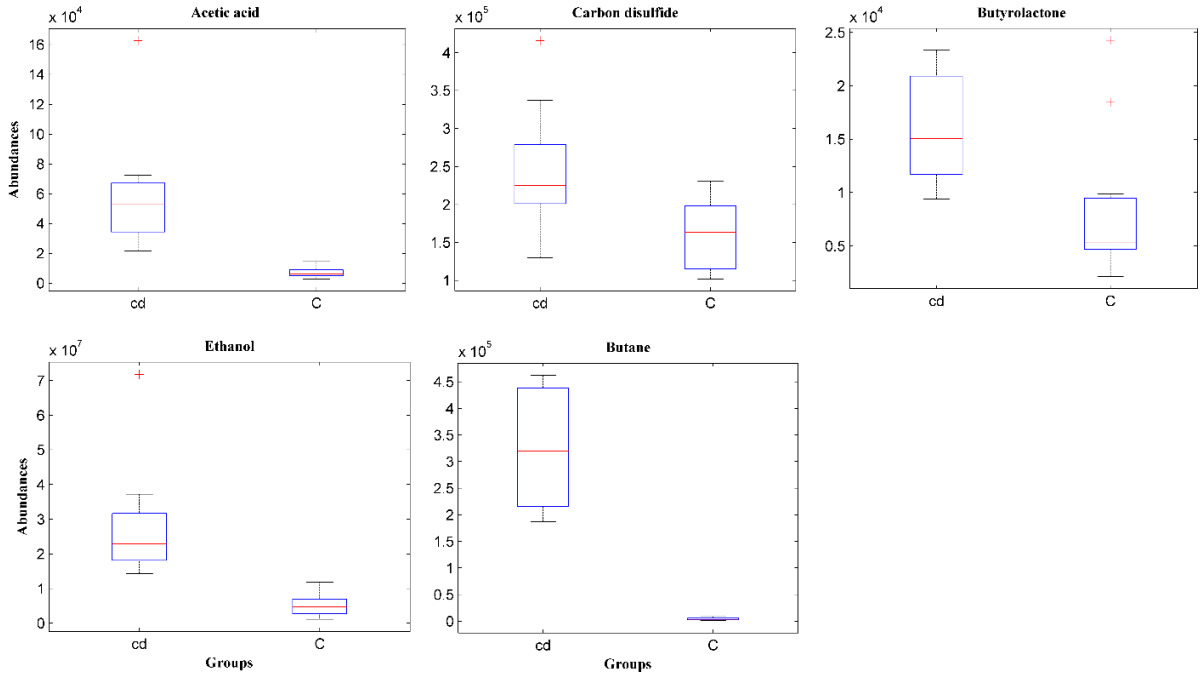


Fig. 3. Boxplot of the abundances of the volatile organic compound (VOC) markers in the plasma that contributed for the separation of the control group (C: control) from the chicken group exposed to cadmium (cd: cadmium).

3.2.2. Exposure to environmental micropollutants: PCBs

3.2.2.1. PCB low level. The projection of CCA scores shows the overlapping of the control group and PCB low group (10 µg/kg of feed, PCB10) (Figure S2). This result demonstrates that dietary exposure of chicken to the low dose of PCB does not affected plasma VOC levels. In contrast, Bouhlel et al. (2017) (Bouhlel et al., 2017) found that the liver volatolome differentiated animals exposed to the same dose of PCBs from controls.

3.2.2.2. PCB high level. Fig.1 showed a separation of the PCB high level group (50 µg/kg of feed) from the control group along CC5, reflecting changes in plasma volatolome in response to dietary contamination by the higher dose of PCBs. Fig. 2 illustrated the projection of the most contributing VOCs to the separation along CC5, they correspond to butane, ethanol, acetic acid, and o-xylene. Moreover, the box-and-whiskers plots illustrated a significant increasing in the abundances of these potential VOC markers in the plasma of PCB high group (Fig. 4).

These results are consistent with changes in liver VOC levels for chicken exposure to the same dose of PCBs, the corresponding liver VOC markers correspond to 2-propanol, 1-penten-3-one, 2-butanone, 2,5-dimethyl-1,5-hexadien-3-ol, 2,4-dimethylcyclohexanol, dimethylsulfide, dimethylsulfoxide, butyrolactone, and alpha-methylstyrene (Bouhlel *et al*. 2017).

In fact, even if both liver and plasma volatolomes give markers of poultry exposure to high dose of PCBs, the candidate markers identified are different in each tissue and may offer complementary information for a more robust diagnosis.

Ultimately, plasma VOCs could be a good alternative to reveal animal exposure to PCB high level as well as reference methods which targeted contaminant residues in animal tissues.

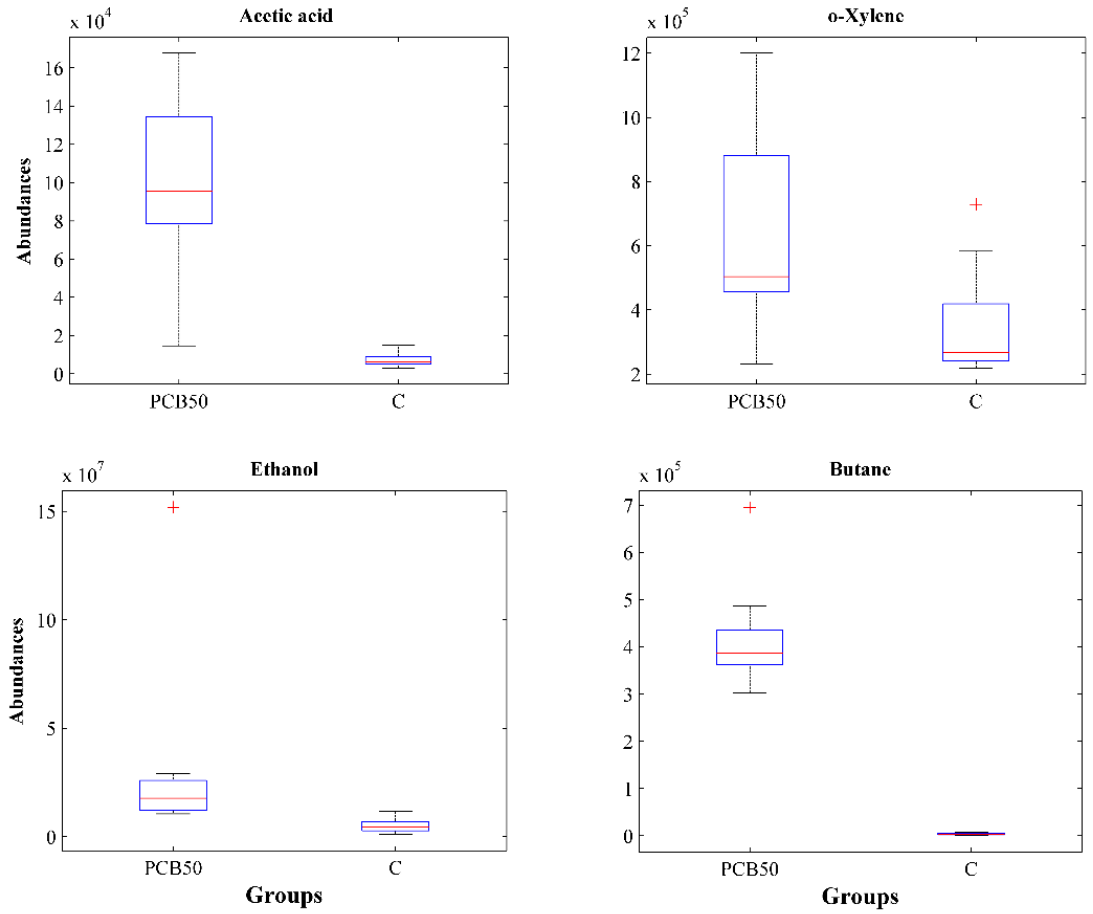


Fig. 4. Boxplot of the abundances of the volatile organic compound (VOC) markers in the plasma that contributed for the separation of the control group (C: control) from the chicken group exposed to PCB high dose (PCB50: PCB high dose).

3.2.3. Exposure to veterinary drugs.

3.2.3.1. Monensin. Fig. 1 illustrated the separation of control and monensin-exposed groups along CC5, which indicates significant changes in plasma volatolome in response to dietary chicken exposure to monensin. Fig. 2 shows the projection of the candidate VOC markers which contributed the most to the discrimination of the monensin-group from the control group. These VOCs are butane, 2-butanone, acetic acid and m-di-ter-butyl-benzene. Furthermore, the box-and-whiskers plots (Fig. 5) showed a significant increase in the abundances of butane, and acetic acid, but a decrease in those of 2-butanone and m-di-ter-butyl-benzene in the plasma of the monensin group.

Recently, Bouhlel et al. (2017) (Bouhlel et al., 2017) have shown that chicken exposure to monensin induced liver volatolomic changes reflected by up and down regulations of several

liver VOC markers, which correspond to 2-propanol, 2-butanol, 4-hexen-1-ol, propanoic acid, dihydro-5-ethyl-2(3H)-furanone, alpha-methylbenzene methanol, and 1,3,3-trimethyl-2-vinyl-1-cyclohexene. Thus, we can deduce that liver and plasma volatolomes again give different complementary candidate VOC markers to reveal chicken exposure to monensin despite this veterinary drug being rapidly absorbed, metabolized and excreted (Donoho et al., 1982).

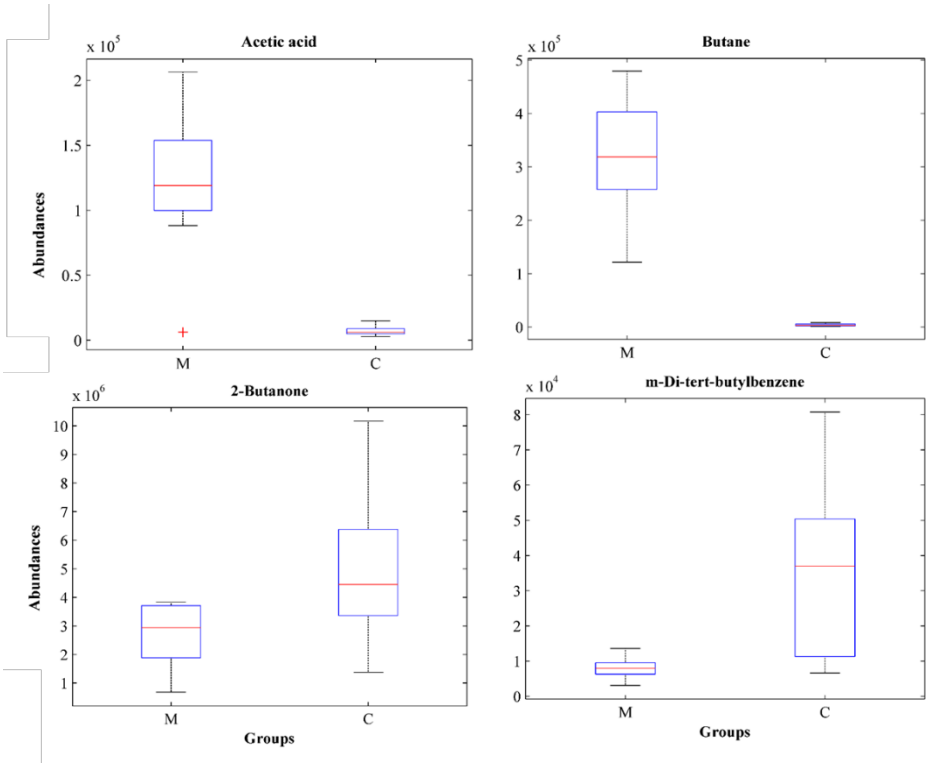


Fig. 5. Boxplot of the abundances of the volatile organic compound (VOC) markers in the plasma that contributed for the separation of the control group (C: control) from the chicken group exposed to monensin (M: monensin).

3.2.3.2. Ampicillin. Fig.1 showed the distinction of the control group and the ampicillin-exposed group along CC6 indicating changes in plasma VOC levels. This result is in agreement with Han *et al*. (2014) (Han et al., 2014) who showed that antibiotic treatment affected cell metabolism and leads to their differentiation from control cells. Fig. 2 illustrated the significant influencing VOCs for the separation along CC6, these candidate VOC markers being butane, ethanol, 2,2-dimethyl-3-pentanol and 2,2,5,5-tetra-methyl-tera-hydrofuran. The box-and-whiskers plots (Fig. 6) showed an increasing in the abundances of these candidate VOC markers in the plasma of the ampicillin group. Moreover, an earlier study showed that ampicillin-treated animals were distinguished from control animals according to their liver volatolome (Bouhlel *et al*. 2017).

In fact, the liver results highlighted changes in the levels of 1-penten-3-one, 3-hepten-2-one, 6-methyl-2-heptanone, butyrolactone and alpha-methylstyrene in response to chicken exposure to ampicillin.

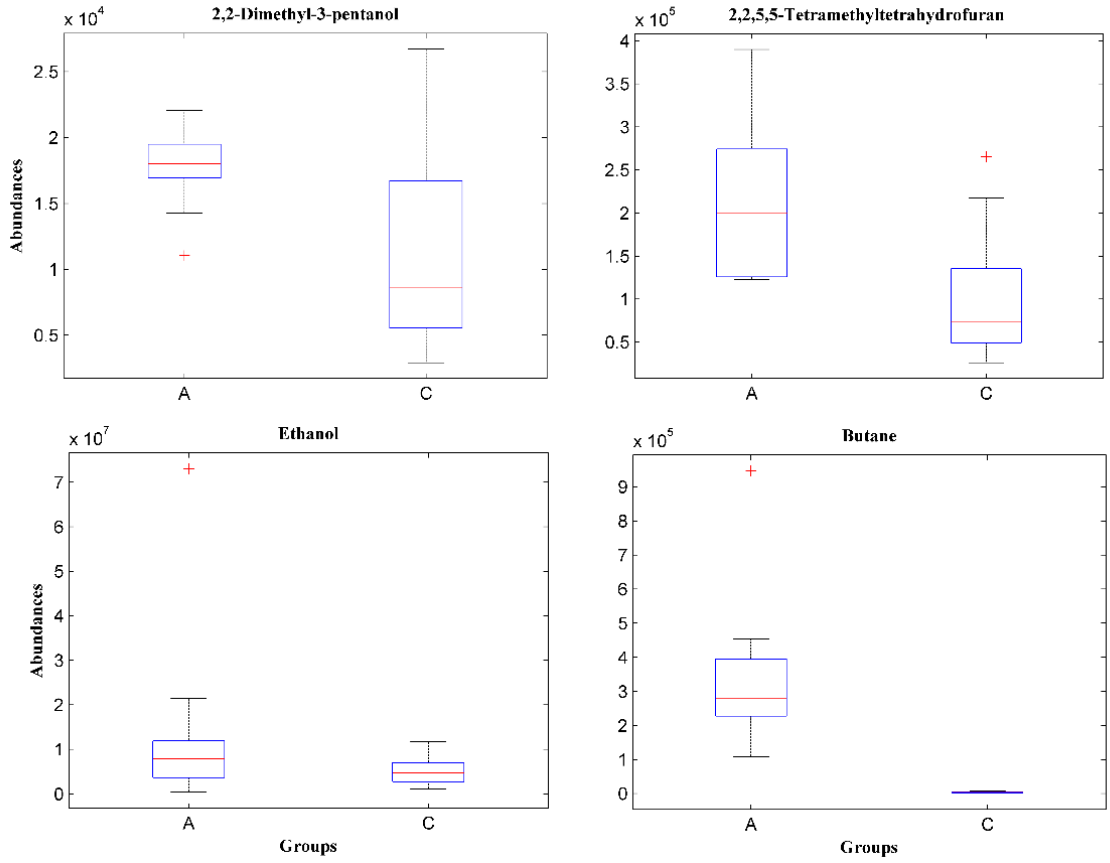


Fig. 6. Boxplot of the abundances of the volatile organic compound (VOC) markers in the plasma that contributed for the separation of the control group (C: control) from the chicken group exposed to ampicillin (A: ampicillin).

3.2.4. Exposure to pesticides.

3.2.3.1. Deltamethrin. Fig.1 illustrated a clear separation of the control and deltamethrin-exposed groups along CC6. The contributions of the VOCs to CC6 (Fig. 2) show that butane, ethanol, and hexanal seem to be key VOC markers to differentiate ampicillin chicken exposure. The box-and-whiskers plots show the increase in the abundances of butane and ethanol in the plasma of deltamethrin group compared to control, whereas the abundance of nonanal decreased in response to animan exposure to deltamethrin (Fig. 7).

These results are consistent with those highlighted by Bouhlel *et al.* (2017) who demonstrated

changes in the liver level of 3-penten-2-ol, 4-hexen-1-ol, hexanal, carbon disulfide, alpha-methylstyrene, dihydro-5-ethyl-2(3H)-furanone, and 1,3,3-trimethyl-2-vinyl-1-cyclohexene in response to chicken exposure to deltamethrin. Thus, liver and plasma candidate markers are again different.

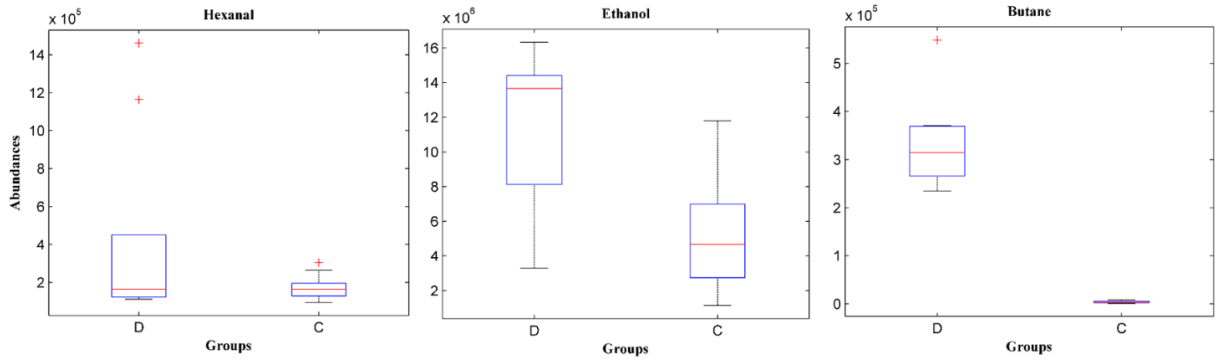


Fig. 7. Boxplot of the abundances of the volatile organic compound (VOC) markers in the plasma that contributed for the separation of the control group (C: control) from the chicken group exposed to deltamethrin (D: deltamethrin).

3.2.3.2. Lindane. The result of CCA analysis of the control group and lindane group showed the overlapping of these groups (Figure S3), which suggest no direct or indirect influence of lindane on the plasma VOC levels. In contrast, Bouhlel *et al.* (2017) found changes in several candidate VOCs markers - butane, 1-penten-3-one, 3-ethylcyclopentanone, alpha-methylstyrene, 5-methyl-3-heptanol, and dihydro-5-ethyl-2(3H)-furanone. These results indicate that the liver volatolome is better adapted to detecting VOC changes as a consequence of lindane exposure.

3.2.5. Exposure to mycotoxins.

3.2.5.1. Fumonisins. Fig.1 shows a separation of control and fumonisins-exposed groups along CC6. The projection of the most contributing VOCs to CC6 (Fig. 2) are butane, ethanol, acetic acid, and 2-butanone, which seems to be a candidate VOC markers to distinguish chicken exposure to fumonisins.

Moreover, the box-and-whiskers plots (Fig. 8) of the abundances of these VOCs showed their significant increasing in the plasma of fumonisins-exposed group.

Similarly, Bouhlel *et al*. (2017) pointed out differences between exposed and non-exposed chickens to fumonisins and reveled changes in candidate VOC markers which correspond to 1-propanol, 2-propanol, dimethyl-sulfide, propionic acid, toluene, and dihydro-5-ethyl-2(3H)-furanone. These results confirmed the potential of both liver and plasma volatolomes to give useful candidate VOC markers for diagnosing fumonisins exposure, although it was not detectable by reference methods which targeted residues in chicken tissues. All these results confirmed the potential of liver and plasma volatolomes to give useful candidate VOC markers for diagnosing fumonisins exposure, while it was undetectable by reference methods which targeted residues in chicken tissues.

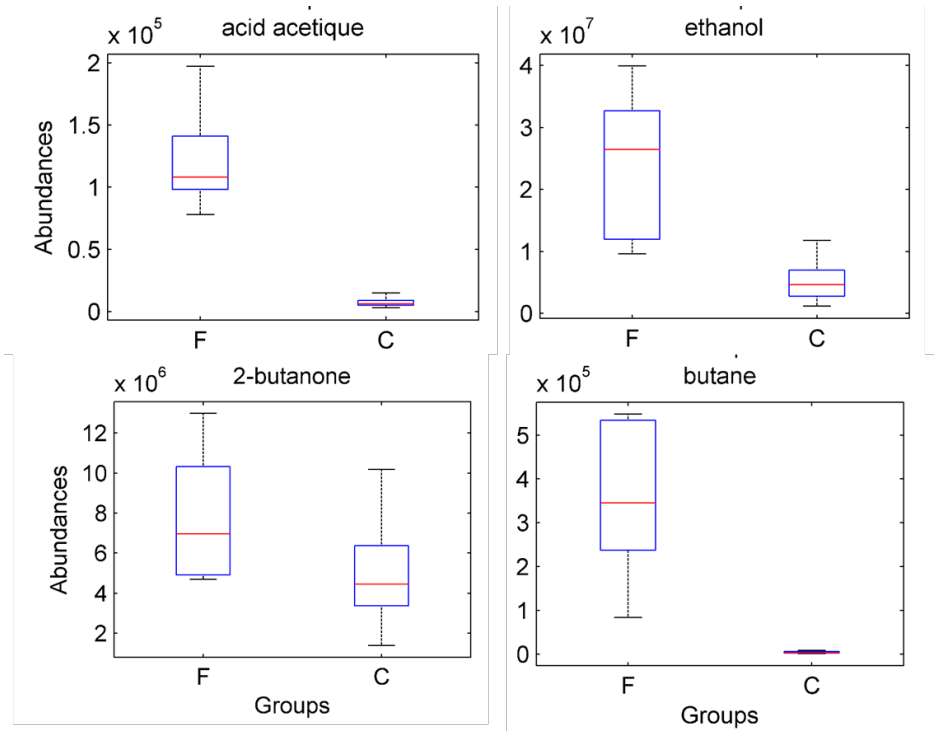


Fig. 8. Boxplot of the abundances of the volatile organic compound (VOC) markers in the plasma that contributed for the separation of the control group (C: control) from the chicken group exposed to fumonisins (F: fumonisins).

3.2.5.2. Zearalenone. The result illustrated no difference between the control and zearalenone-contaminated group (Figure S4), which emphasized that zearalenone did not induce changes in plasma VOC levels. Similarly, it was demonstrated that chicken exposure to the same dose of zearalenone had no inflence on the liver VOC levels (Bouhlel *et al*. 2017). The realistic dose of zeralenone administrated in the present study together with the rapid excretion of this mycotoxin from exposed chicken bodies (Kuipergoodman et al., 1987) may explain the absence of volatolomic changes in liver and plasma tissues.

4. Conclusion

The plasma volatolomic VOC profiles were found to be effective for discriminating control animals from animals exposed to cadmium, PCB high dose, monensin, ampicillin, deltamethrin, and fumonisins. The potential VOC markers belong to distinct chemical families like hydrocarbons, alcohols, aldehydes, ketones, carboxylic acids, sulfur compounds, furans, and aromatic compounds. The results showed an increasing in the abundance of butane in the plasma of cadmium, PCB high level, monensin, ampicillin, deltamethrin and fumonisins exposed groups. In fact, Hakim et al. (2012) (Hakim et al., 2012) explained in their review that saturated hydrocarbons C3-C11 can be generated by the lipid peroxidation process occurred in hepatic cells. Moreover, the results noted a similar upregulation of ethanol in the plasma of cadmium, PCB high level, ampicillin, deltamethrin and fumonisins groups, 2,2-dimethyl-3-pentanol for the ampicillin exposed groups. Alcohols are reported to be derived from the metabolism of hydrocarbons and since they have high affinity to water, they are rapidly absorbed in the blood (Hakim et al., 2012). Otherwise, hexanal increased in the plasma of deltamethrin-exposed chickens. This may be explained by the activation of the oxidoreductase enzymes which produced aldehydes from alcohols (Hakim et al., 2012). Regarding carboxylic acids, the result highlighted an increasing in the abundance of acetic acid in the plasma of cadmium, PCB high level, monensin, and fumonisins exposed chickens. Hakim et al. (2012) (Hakim et al., 2012) explained that carboxylic acids are generated by the oxidation of aldehydes with Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) and they could be a functional markers of tumor growth. Besides, 2-butanone was downregulated and upregulated in the plasma of monensin and fumonisins-exposed groups, repectively. This compound is an exogenous absorbed ketone that may increase a risk of health damage for a long exposure (Hakim et al., 2012). Carbon disulfide was exclusively upregulated in the plasma of cadmium exposed group. Other work has shown that carbon disulfide may be a potential marker for early stage of lung cancer (Rudnicka et al., 2011). In addition, the results reported the increasing in the abundance of 2,5,5-tetra-methyl-tera-hydrofuran in the plasma of ampicillin group, butyrolactone in cadmium group, o-xylene in PCB high group and m-di-ter-butyl-benzene in monensin group. As illustrated in this work, the VOC volatolomic profiles in the plasma provides useful markers to reveal contamination by many types of micropollutants. By considering the above results, we suggest a promising, less invasive, safer, faster and less expensive sampling method to back-trace animal exposure to a wide range of micropollutants.

ACKNOWLEGMENTS

This study was supported by the French National Research Agency, project SOMEAT. Contact No. ANR-12-1LID-0004. Safety of Organic Meat. Available at http://www.so-meat.fr

REFERENCES

Abaffy, T., Moller, M. G., Riemer, D. D., Milikowski, C., DeFazio, R. A., 2013. Comparative analysis of volatile metabolomics signals from melanoma and benign skin: a pilot study. Metabolomics. 9, 998-1008.

Alonso, M., Castellanos, M., Sanchez, J. M., 2013. Evaluation of matrix effects in the analysis of volatile organic compounds in whole blood with solid-phase microextraction. J Sep Sci. 36, 3776-82.

Andree, S., Jira, W., Schwind, K. H., Wagner, H., Schwagele, F., 2010. Chemical safety of meat and meat products. Meat Sci. 86, 38-48.

Anton, A. P., Ferreira, A. M. C., Pinto, C. G., Cordero, B. M., Pavon, J. L. P., 2014. Headspace generation coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the automated determination and quantification of endogenous compounds in urine. Aldehydes as possible markers of oxidative stress. J. Chromatogr. A. 1367, 9-15.

Berge, P., Ratel, J., Fournier, A., Jondreville, C., Feidt, C., Roudaut, B., Le Bizec, B., Engel, E., 2011. Use of Volatile Compound Metabolic Signatures in Poultry Liver to Back-Trace Dietary Exposure to Rapidly Metabolized Xenobiotics. Environ. Sci. Technol. 45, 6584-6591.

Bernard, A., 2004. Renal dysfunction induced by cadmium: biomarkers of critical effects. Biometals. 17, 519-523.

Blount, B. C., Kobelski, R. J., McElprang, D. O., Ashley, D. L., Morrow, J. C., Chambers, D. M., Cardinali, F. L., 2006. Quantification of 31 volatile organic compounds in whole blood using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. B. 832, 292-301.

Bouhlel, J., Ratel, J., Abouelkaram, S., Mercier, F., Travel, A., Baéza, E., Jondreville, C., Dervilly-Pinel, G., Marchand, P., Bizec, B. L., Dubreil, E., Mompelat, S., Verdon, E., Inthavong, C., Guérin, T., Rutledge, D. N., Engel, E., 2017. Solid-phase microextraction set-up for the analysis of liver volatolome to detect livestock exposure to micropollutants. J. Chromatogr. A.

Calejo, I., Moreira, N., Araujo, A. M., Carvalho, M., Bastos, M. D., de Pinho, P. G., 2016. Optimisation and validation of a HS-SPME-GC-IT/MS method for analysis of carbonyl volatile compounds as biomarkers in human urine: Application in a pilot study to discriminate individuals with smoking habits. Talanta. 148, 486-493.

Chandra, N., Jain, N. K., Sondhia, S., Srivastava, A. B., 2013. Deltamethrin Induced Toxicity and Ameliorative Effect of Alpha-Tocopherol in Broilers. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 90, 673-678.

Cordella, C. B. Y., Tekye, T., Rutledge, D. N., Leardi, R., 2012. A multiway chemometric and kinetic study for evaluating the thermal stability of edible oils by H-1 NMR analysis: Comparison of methods. Talanta. 88, 358-368.

Cottet, K., Genta-Jouve, G., Fromentin, Y., Odonne, G., Duplais, C., Laprevote, O., Michel, S., Lallemand, M. C., 2014. Comparative LC-MS-based metabolite profiling of the ancient tropical rainforest tree Symphonia globulifera. Phytochemistry. 108, 102-108.

Danicke, S., Ueberschar, K. H., Halle, I., Matthes, S., Valenta, H., Flachowsky, G., 2002. Effect of addition of a detoxifying agent to laying hen diets containing uncontaminated or Fusarium toxin-contaminated maize on performance of hens and on carryover of zearalenone. Poult. Sci. 81, 1671-1680.

Davies, S. K., Ang, J. E., Revell, V. L., Holmes, B., Mann, A., Robertson, F. P., Cui, N., Middleton, B., Ackermann, K., Kayser, M., Thumser, A. E., Raynaud, F. I., Skene, D. J., 2014. Effect of sleep deprivation on the human metabolome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 111, 10761-10766.

de Baere, S., Wassink, P., Croubels, S., de Boever, S., Baert, K., de Backer, P., 2005. Quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of amoxycillin in broiler edible tissues. Anal. Chim. Acta. 529, 221-227.

Dieterle, F., Ross, A., Schlotterbeck, G., Senn, H., 2006. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in H-1 NMR metabonomics. Anal. Chem. 78, 4281-4290.

Donoho, A. L., Herberg, R. J., Zornes, L. L., Vanduyn, R. L., 1982. EXCRETION AND TISSUE DISTRIBUTION OF C-14 -LABELED MONENSIN IN CHICKENS. J. Agric. Food Chem. 30, 909-913.

Dubin, E., Spiteri, M., Dumas, A. S., Ginet, J., Lees, M., Rutledge, D. N., 2016. Common components and specific weights analysis: A tool for metabolomic data pre-processing. Chemometrics Intell. Lab. Syst. 150, 41-50.

Engel, E., Ratel, J., Bouhlel, J., Planche, C., Meurillon, M., 2015. Novel approaches to improving the chemical safety of the meat chain towards toxicants. Meat Sci. 109, 75-85.

Fernandes, A., Mortimer, D., Rose, M., Gem, M., 2010. Dioxins (PCDD/Fs) and PCBs in offal: Occurrence and dietary exposure. Chemosphere. 81, 536-540.

Filzmoser, P., Walczak, B., 2014. What can go wrong at the data normalization step for identification of biomarkers? J. Chromatogr. A. 1362, 194-205.

Focant, J. F., 2012. Dioxin food crises and new POPs: challenges in analysis. Anal. Bioanal. Chem. 403, 2797-2800.

Gaud Dervilly-Pinel, T. G., Brice Minvielle, Angélique Travel, Jérôme Normand,, Marie Bourin, E. R., Estelle Dubreil, Sophie Mompelat, Frédéric Hommet, Marina Nicolas,, Vincent Hort, C. I., Mailie Saint-Hilaire, Claude Chafey, Julien Parinet,, Ronan Cariou, P. M., Bruno Le Bizec, Eric Verdon, Erwan Engel, 2017. Micropollutants and chemical residues in organic and conventional meat. Food Chem. 232, 218-228.

Hakim, M., Broza, Y. Y., Barash, O., Peled, N., Phillips, M., Amann, A., Haick, H., 2012. Volatile Organic Compounds of Lung Cancer and Possible Biochemical Pathways. Chem. Rev. 112, 5949-5966.

Han, P. P., Jia, S. R., Sun, Y., Tan, Z. L., Zhong, C., Dai, Y. J., Tan, N., Shen, S. G., 2014. Metabolomic approach to optimizing and evaluating antibiotic treatment in the axenic culture of cyanobacterium Nostoc flagelliforme. World J. Microbiol. Biotechnol. 30, 2407-2418.

Hrydziuszko, O., Viant, M. R., 2012. Missing values in mass spectrometry based metabolomics: an undervalued step in the data processing pipeline. Metabolomics. 8, S161-S174.

Kuipergoodman, T., Scott, P. M., Watanabe, H., 1987. RISK ASSESSMENT OF THE MYCOTOXIN ZEARALENONE. Regul. Toxicol. Pharmacol. 7, 253-306.

Martucci, M. E. P., De Vos, R. C. H., Carollo, C. A., Gobbo-Neto, L., 2014. Metabolomics as a Potential Chemotaxonomical Tool: Application in the Genus Vernonia Schreb. PLoS One. 9.

Phillips, M., Cataneo, R. N., Saunders, C., Hope, P., Schmitt, P., Wai, J., 2010. Volatile biomarkers in the breath of women with breast cancer. J. Breath Res. 4.

E.M. Qannari, I.Wakeling, P. Courcoux, H.J.H. MacFie, Defining the underlying sensory dimensions, Food Qual. Prefer. 11 (2000) 151–154.

Rudnicka, J., Kowalkowski, T., Ligor, T., Buszewski, B., 2011. Determination of volatile organic compounds as biomarkers of lung cancer by SPME-GC-TOF/MS and chemometrics. J. Chromatogr. B. 879, 3360-3366.

Silva, C. L., Passos, M., Camara, J. S., 2011. Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry. Br. J. Cancer. 105, 1894-1904.

Sun, B., Zhang, M., Zhang, Q., Ma, K. P., Li, H. J., Li, F. M., Dong, F. T., Yan, X. Z., 2014. Metabonomics study of the effects of pretreatment with glycyrrhetinic acid on mesaconitine-induced toxicity in rats. J. Ethnopharmacol. 154, 839-846.

Tardieu, D., Bailly, J. D., Benlashehr, I., Auby, A., Jouglar, J. Y., Guerre, P., 2009. Tissue persistence of fumonisin B1 in ducks and after exposure to a diet containing the maximum European tolerance for fumonisins in avian feeds. Chem.-Biol. Interact. 182, 239-244.

Tulipani, S., Palau-Rodriguez, M., Alonso, A. M., Cardona, F., Marco-Ramell, A., Zonja, B., de Alda, M. L., Munoz-Garach, A., Sanchez-Pla, A., Tinahones, F. J., Andres-Lacueva, C., 2016. Biomarkers of Morbid Obesity and Prediabetes by Metabolomic Profiling of Human Discordant Phenotypes. Clinica Chimica Acta. 463, 53-61.

Xue, M. A., Shen, G. F., Yu, J. L., Zhang, D. Y., Lu, Z. J., Wang, B., Lu, Y., Cao, J., Tao, S., 2010. Dynamic changes of alpha-hexachlorocyclohexane and its enantiomers in various tissues of Japanese Rabbits (Oyctolagus cuniculus) after oral or dermal exposure. Chemosphere. 81, 1486-1491.

Supplementary data for

Plasma Volatolomics to Reveal Markers of Livestock Exposure to Micropollutants

Jihéne Bouhlel[1,2], Jérémy Ratel[1], Said Abouelkaram[1], Patrick Blinet[1], Elisabeth Baéza[3], Catherine Jondreville[3], Gaud Dervilly-Pinel[4], Eric Verdon[5], Thierry Guérin[6], Douglas N. Rutledge[2], Erwan Engel[1*]

[1]*INRA, UR 370 QuaPA, MASS laboratory, Saint-Genès-Champanelle, France*
[2] *UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, Massy, France*
[3] *ITAVI, UR83 Recherches Avicoles, INRA, Centre Val de Loire, 37380 Nouzilly, France*
[4]*Oniris, LABERCA, Nantes, France*
[5]*ANSES, Reference laboratory for veterinary drug residues in food, Fougères, France*
[6] *ANSES, Laboratory for Food Safety, Maisons-Alfort, France*

*Corresponding author: *E-mail: erwan.engel@inra.fr; Phone: +33 (0)4 73 62 45 89.*

Table S1. Maximum levels and administered doses of the investigated micropollutants in chicken feeds.

Contaminant	EU Legislation	ML[b]	Dose administrated
Cadmium	Directive. 2002/32/EC	0.5 mg kg^{-1}	7.5 mg kg^{-1}
NDL[a] PCBs	Regulation. (EU) 277/2012	10 µg kg^{-1}	10 µg kg^{-1}
NDL PCBs	Regulation. (EU) 277/2012	10 µg kg^{-1}	50 µg kg^{-1}
Monensin	Regulation. (EC) 124/2009	125 mg kg^{-1}	125 mg kg^{-1}
Ampicillin	Recommended dosage	10 mg kg^{-1} body weight daily during 3 days	10 mg kg^{-1} body weight daily during the 3 days preceding slaughter
Deltamethrin	Regulation. (EU) 524/2011	2 mg kg^{-1}	9 mg kg^{-1}
Lindane	Directive. 2002/32/EC	0.2 mg kg^{-1}	0.3 mg kg^{-1}
Fumonisins	Recommendation 2006/576/EC	20 mg kg^{-1}	20 mg kg^{-1}
Zearalenone	Recommendation 2006/576/EC	0.5 mg kg^{-1}	0.5 mg kg^{-1}

[a] NDL: non-dioxin-like
[b] ML: Maximum Levels

Table S2. Micropollutant Analysis in chicken feed and tissue samples: National Reference Laboratories and Reference methods used for the analysis of contaminant residues in chicken feed and tissue samples.

Contaminants	Tissues	NRL [a]	Feeds		Tissues	
			Reference methods	LOD [b]	Reference methods	
Cadmium	Liver	ANSES (Maison Alfort, France)	COFRAC ANSES CIME 11	0.05 µg/kg feed	COFRAC ANSES CIME 11	LOD=0. 3 µg/kg FT [C]
NDL[1]-PCBs	Muscle	LABERCA (Nantes, France)	GC-HRMS	0.01 µg/kg feed	DGAL_NDL-PCB	LOD=0.3 µg/kg LW [d]
NDL [1]-PCBs	Muscle	LABERCA (Nantes, France)	GC-HRMS	0.01 µg/kg feed	DGAL_NDL-PCB	LOD=0.3 µg/kg LW
Monensin	Liver	ANSES (Fougères, France)	HPLC-UV NF EN ISO 14183	0.2 mg/kg feed	LC-ESI-MS/MS F/CHIM/SM/PTC/ 002	LOQ=0.5 µg/kg FT
Ampicillin	Liver	ANSES (Fougères, France)	-	-	HPLC-MS/MS L35-IN-AD-ANA-71	LOQ=2.5 µg/kg FT
Deltamethrin	Muscle	ANSES (Maisons-Alfort, France)	GC-MS NF EN 15662	0.02 mg/kg feed	ANSES PBM Pest LSA-INS-0179	LOD= 1 µg/kg FT
Lindane	Muscle	ANSES (Maisons-Alfort, France)	GC-MS NF EN 15662	0.01 mg/kg feed	ANSES PBM Pest LSA-INS-0179	LOD= 0.3 µg/kg FT
Fumonisin B1	Liver	ANSES (Maison-Alfort, France)	HPLC-Fluo L35-IN-MT-ANA-51 NF EN 16006	0.02 mg/kg feed	ANSES PMP BM LSA-INA-0154	LOD=0.3 µg/kg FT
Fumonisin B2	Liver	ANSES (Maison-Alfort, France)	HPLC-Fluo L35-IN-MT-ANA-51 NF EN 16006	0.03 mg/kg feed	ANSES PMP BM LSA-INA-0154	LOD=0.3 µg/kg FT
Zearalenone	Liver	ANSES (Fougères, France)	HPLC-Fluo NF EN 15792	CV=30%	ANSES PBM BM LSA-INS-0155	LOD= 0.3 µg/kg FT

[a] National Reference Laboratories
[b] Limit of Detection
[c] FT: Fresh Tissues
[d] LW: Lipid Wight

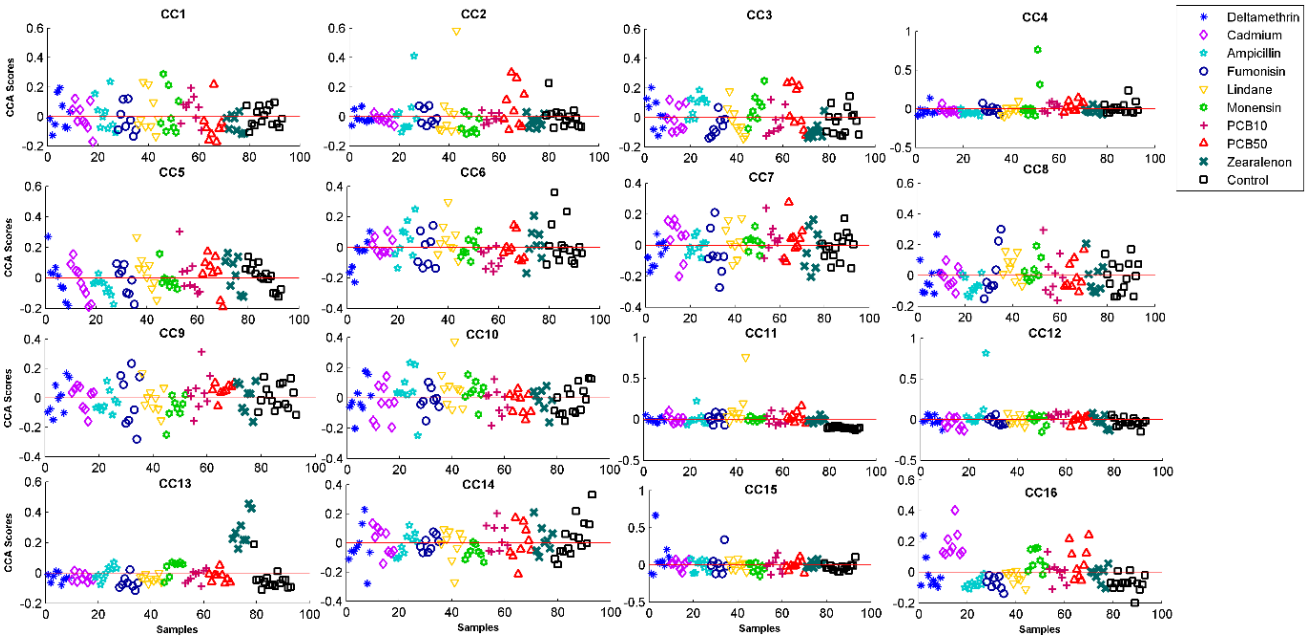


Fig. S1. Result of CCA of SPME-GC-MS data in control and exposed chicken plasma: CCA scores along the first sixteen Common Components (CCs).

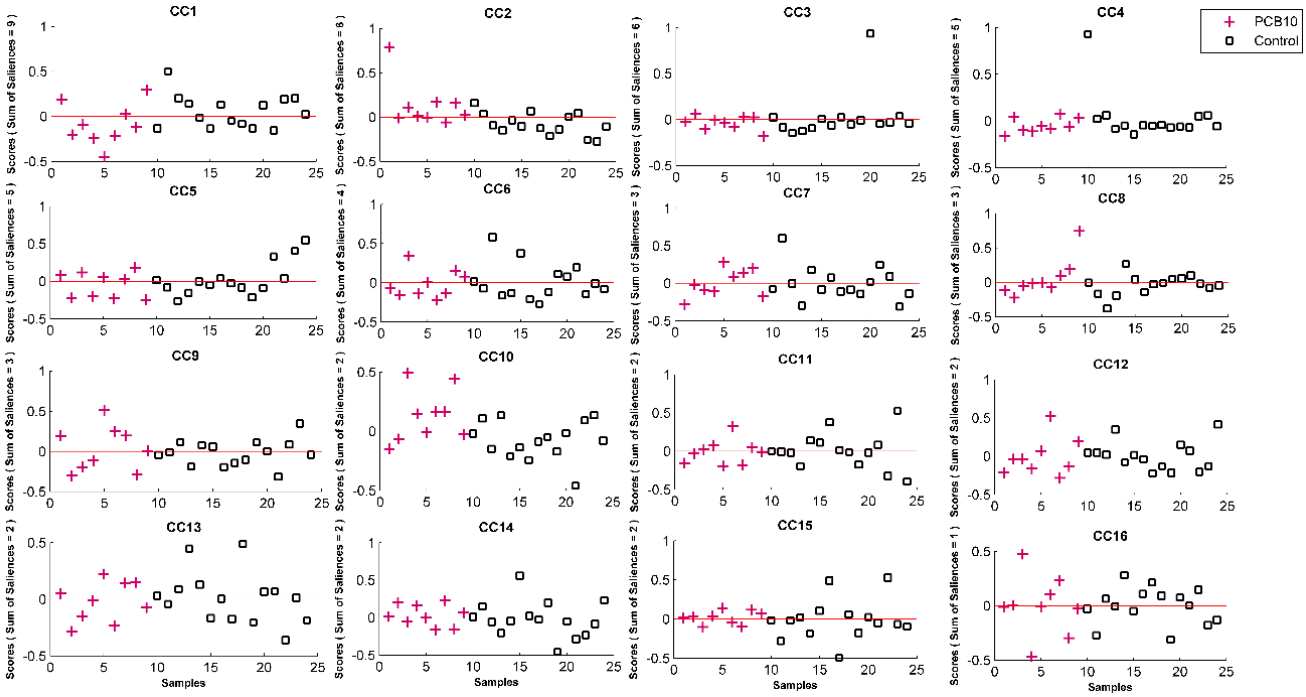


Figure S2: CCA scores of control group (n=15) and PCB low-exposed group (n=9) onto the first six Common Components. Black squares denote control chickens and pink '+' denote chickens contaminated with PCB low. The sum of the saliences of the variables is given for each Common Component.

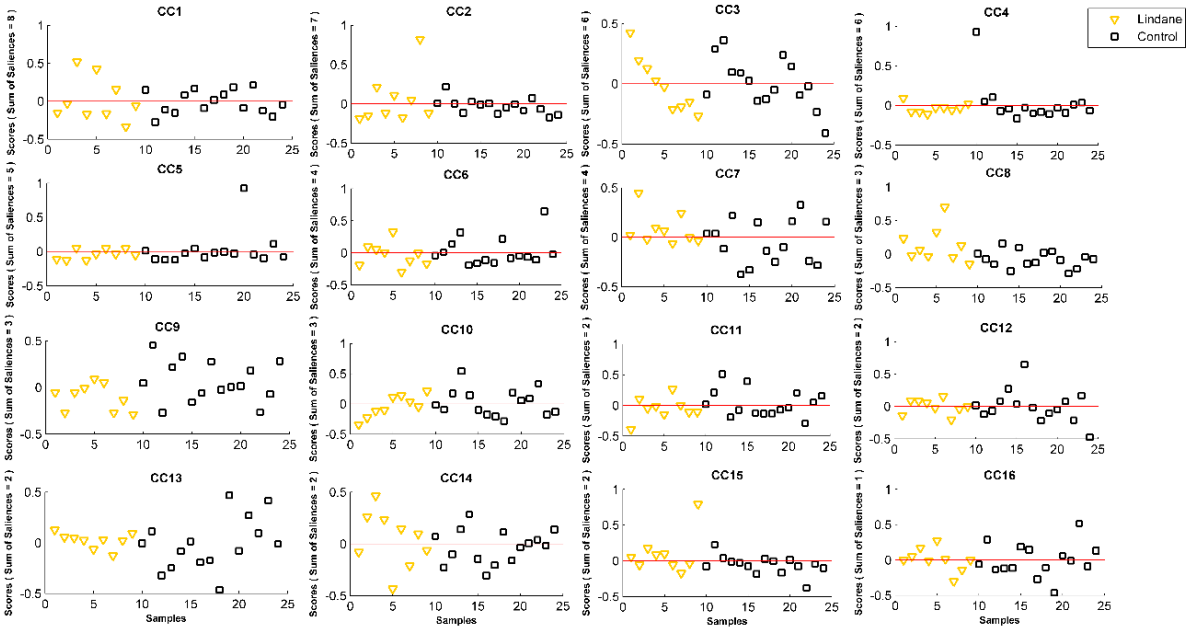


Figure S3: CCA scores of control group (n=15) and lindane-contaminated group (n=9) onto the first six Common Components. Black squares denote control chickens and yellow triangles denote chickens contaminated with lindane. The sum of the saliences of the variables is given for each Common Component.

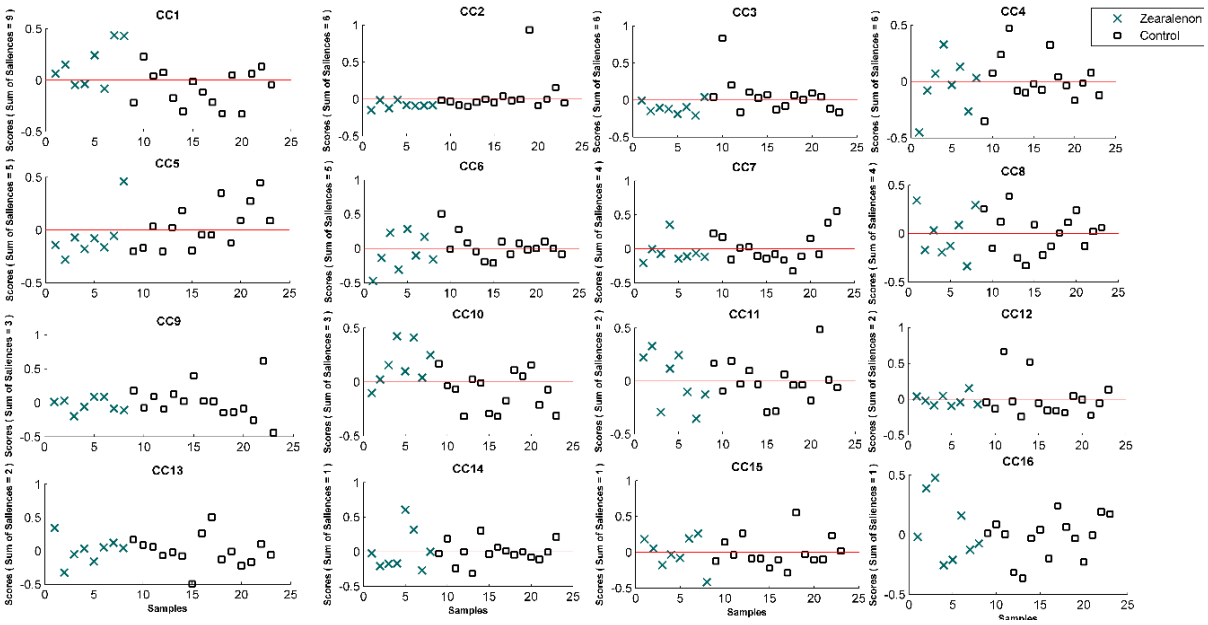


Figure S4: Comdim scores of control group (n=15) and zearalenone-contaminated group (n=9) onto the first six Common Components. Black squares denote control chickens and green crosses circles denote chickens contaminated with zearalenone. The sum of the saliences of the variables is given for each Common Component.

Partie II. Recherche de marqueurs volatils dans les tissus adipeux

II.1. Introduction

Les composés volatils (COVs) sont des composés liposolubles qui se concentrent dans les tissus adipeux durant la période de vie des animaux. Plusieurs études ont démontré le potentiel des COVs des tissus adipeux pour révéler a posteriori l'exposition des animaux à des régimes alimentaires spécifiques [1], ou à des systèmes d'élevages particuliers d'agneaux [2-4]. Une étude récente publiée par Arrebola *et al*. (2016) [5] a démontré le potentiel du sérum et des tissus adipeux pour révéler des perturbations endocrines générées par la prolifération du cancer à cause de l'exposition de l'homme aux PCBs.

L'objectif de ce travail consiste à rechercher dans les tissus adipeux des animaux des COVs marqueurs de leur exposition aux différents micropolluants ciblés par l'étude. Après avoir validé les niveaux de contamination dans les tissus et les aliments des animaux, le volatolome des tissus adipeux des animaux exposés et non-exposés a été analysé selon le protocole révisé pour l'analyse des COVs (article 1) et les signatures SPME-GC-MS collectées sont traitées par l'Analyse des Composantes Communes (ACC) (article 2) pour étudier les différences des profils volatolomiques et révéler des marqueurs candidats pour chaque type d'exposition.

II.2. Matériels et méthodes

II.2.1. Expérimentation animale

L'expérimentation réalisée dans le cadre de ce travail de thèse est détaillé dans le chapitre 2 (article 3). Brièvement, dix groupes de poulets mâles de race *Gallus* (JA 657, Boyé Accouvage, La Boissière en Gâtine, France) ont été élevés pendant huit semaines à l'unité expérimentale INRA de Nouzilly (UE PEAT, INRA Tours-Nouzilly, France), il s'agit d'un groupe de poulets contrôle (n=15) et 9 groupes de poulets contaminés chacun (n=9) par un type de micropolluants. Les concentrations des micropolluants dans les aliments ont été choisies conformément aux concentrations réelles tolérées par la réglementation dans les aliments pour les volailles et aux limites de détection des méthodes analytiques utilisées par les laboratoires nationaux de références (LNRs) pour détecter les résidus de contaminants dans les tissus des animaux exposés (Bouhlel *et al* .2017). Après 84 jours d'élevage, tous les animaux ont été abattus après une mise à jeun de 12 heures par électronarcose suivie d'une saignée [6].

II.2.2. Préparation des échantillons

Après l'abattage des animaux, les tissus ont été prélevés de la carcasse des animaux, immergés directement dans l'azote liquide, conservés dans l'aluminium et stockés à -80°C [6]. Les tissus adipeux ont été broyés sous azote liquide pendant 2 min en poudre homogène, 1.2g de poudre de tissus adipeux est mélangée avec 1.2 g de saturée de NaCl. Le mélange est conditionnée dans des vials SPME de 20 ml et un flux d'azote gaz est appliqué sur chaque vial avant de sertir les caps. Les échantillons biologiques ont été stockés à -80°C jusqu'à l'analyse.

II.2.3. Analyse du volatolome

Les COVs ont été extraits des tissus adipeux des animaux exposés et non-exposés aux contaminants par micro-extraction sur phase solide (SPME) selon le protocole révisé par Bouhlel *et al*. (2017) [7]. Brièvement, les échantillons à analyser sont décongelés pendant 24h à 4°C. Un système d'analyse AOC-5000, Shimadzu, Kyoto, Japan est utilisé pour assurer les étapes suivantes : (i) pré-chauffage des échantillons pendant 10 min à 40°C sous agitation constante à 500 rpm, (ii) extraction des échantillons par une fibre 75 µM carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS, 23 gauge needle, Supelco) pendant 30 min à 40°C et (iii) une désorption des COVs dans le GC-MS de type QP2010+ (Shimadzu) équipé d'une colonne Rxi-5SilMS (60 m x 0.32 mm I.D x 1 µm film thickness) (Restek, Bellefonte, PA).

II.2.4. Traitement des données

Les composés volatils ont été identifiés sur la base d'une comparaison des spectres de masses et des indices de rétention fournis expérimentalement avec la base de données NIST/EPA/NIH (NIST14). Les aires des pics sont intégrés par un programme automatique développé sur Matlab 2014b [7]. La matrice des données correspond à *n* tables qui correspondent aux COVs extraits des signaux SPME-GC-MS dans les 95 échantillons de tissus adipeux analysés. D'abord, le modèle ACC est appliqué sur l'ensemble des groupes (95 échantillons × *n* tables) pour déterminer les réponses spécifiques de l'exposition aux différents contaminants et filtrer les variables qui contribuent à chaque séparation de groupe. Ensuite, ACC est performée séparément entre le groupe témoin et chaque exposé (24 échantillons × *n* tables) pour déterminer les marqueurs candidats à chaque type d'exposition. Matlab 2007b (The MathWorks, Natick, USA) est utilisé pour le traitement des données

chimiométrique.

II.3. Résultats et discussion

II.3.1. Contrôle de la contamination dans les tissus et les aliments

Les résultats du contrôle de la contamination dans les aliments et les tissus des animaux contrôles et exposés aux différents contaminants sont présentés dans l'article 3. Brièvement, les résultats montrent que les concentrations des contaminants dans les aliments sont conformes aux niveaux ciblés et qu'il n'y a pas eu de contamination croisée au cours de l'expérimentation (Bouhlel *et al*.2017). Par ailleurs, les résultats des dosages des micropolluants dans les tissus soulignent l'accumulation de certains contaminants dans les tissus des animaux exposés. Il s'agit du cadmium, des faible et forte doses de PCBs, du lindane et de l'ampicilline. Dans les cas des expositions à la deltaméthrine, à la monensine, aux fumonisines, et à la zéaralenone, l'absence de résidus à des niveaux détectables est expliquée par la métabolisation rapide de ces micropolluants (Bouhlel *et al*.2017).

II.3.2. Détermination de marqueurs volatils dans les tissus adipeux

Une liste de 44 composés volatils est identifiée dans les tissus adipeux des animaux exposés et non-exposés aux micropolluants (Tableau S1). D'abord, l'ACC est appliquée simultanément sur l'ensemble des données collectées par SPME-GC-MS dans le tissus adipeux des animaux témoins et exposés aux différents micropolluants (95 échantillons ×44 COVs) dans le but de révéler des réponses spécifiques à l'exposition aux différents micropolluants et pour filtrer les COVs qui contribuent le plus à chaque séparation. Les résultats illustrés sur la figure 9 montrent le recouvrement entre les différents groupes et ne révèle aucun changement volatolomique dans les tissus adipeux en réponse à l'exposition des animaux aux micropolluants.

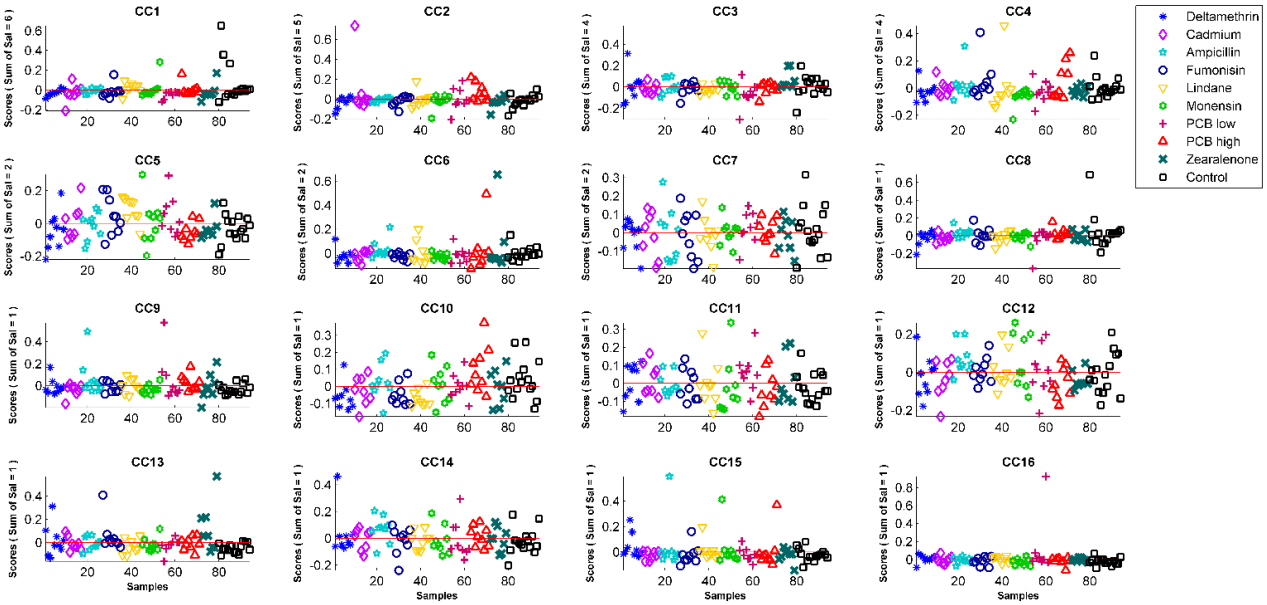


Figure 9 *:* Projection selon les 16 premières Composantes Communes (CC) des scores suite à l'application de l'Analyse en Composantes Communes sur l'ensemble des données SPME-GC-MS collectées dans les tissus adipeux du groupe contrôle et des groupes exposés aux différents contaminants

II.3.2.1. Cadmium

L'application d'ACC entre le groupe des témoins et le groupe exposé au cadmium ne révèle pas de séparation entre ces groupes (figure 10), ce qui suggère que le volatolome du tissu adipeux n'est pas modifié de manière significative en réponse à l'exposition des animaux au cadmium.

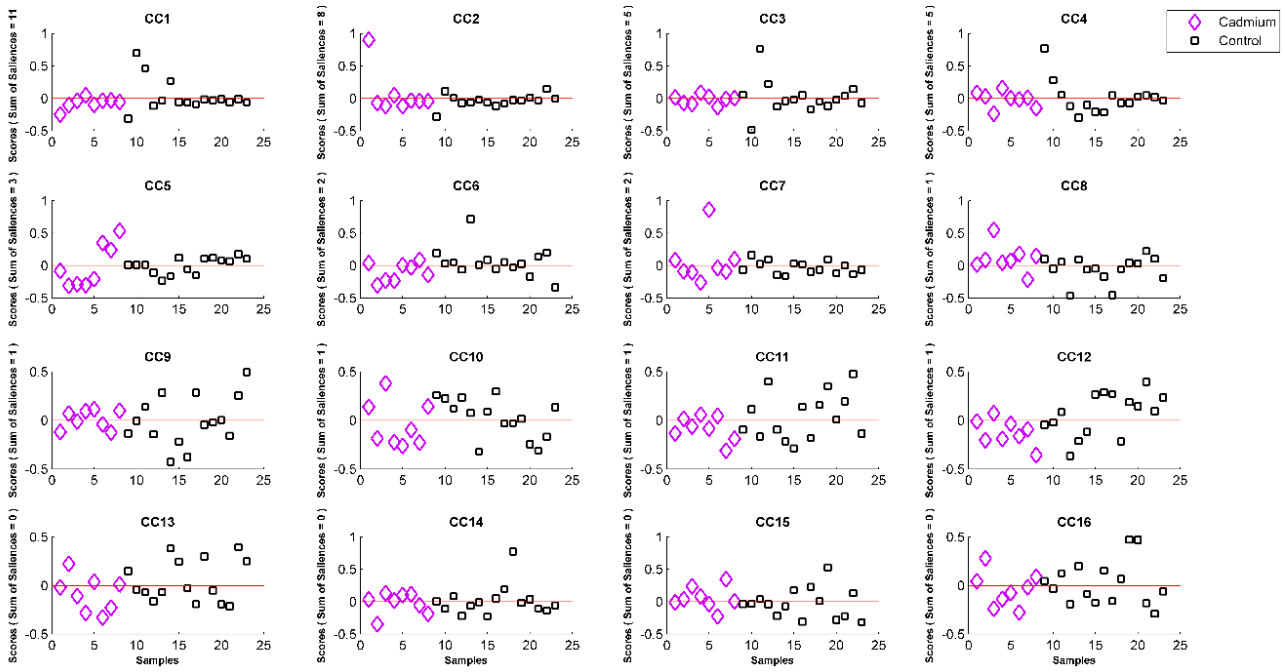


Figure 10 *:* Projection selon les 16 premières Composantes Communes (CC) des scores suite à l'application de l'ACC sur les données SPME-GC-MS collectées dans les tissus adipeux du groupe contrôle (n=15) et du groupe exposé au cadmium (n=9). Les carrés noirs représentent le groupe des animaux contrôles et les losanges violets représentent le groupe des animaux exposés au cadmium

II.3.2.2. Micropolluants environnementaux

Les résultats de l'application de l'ACC sur le groupe témoin et les groupes exposés aux faible et forte doses de PCBs sont représentés sur la figure 11 et la figure 12, respectivement. Aucune différenciation entre ces groupes n'est mise en évidence par les 16 CCs, ce qui souligne l'absence de changements volatolomiques détectables dans les tissus adipeux quel que soit la dose d'exposition aux PCBs.

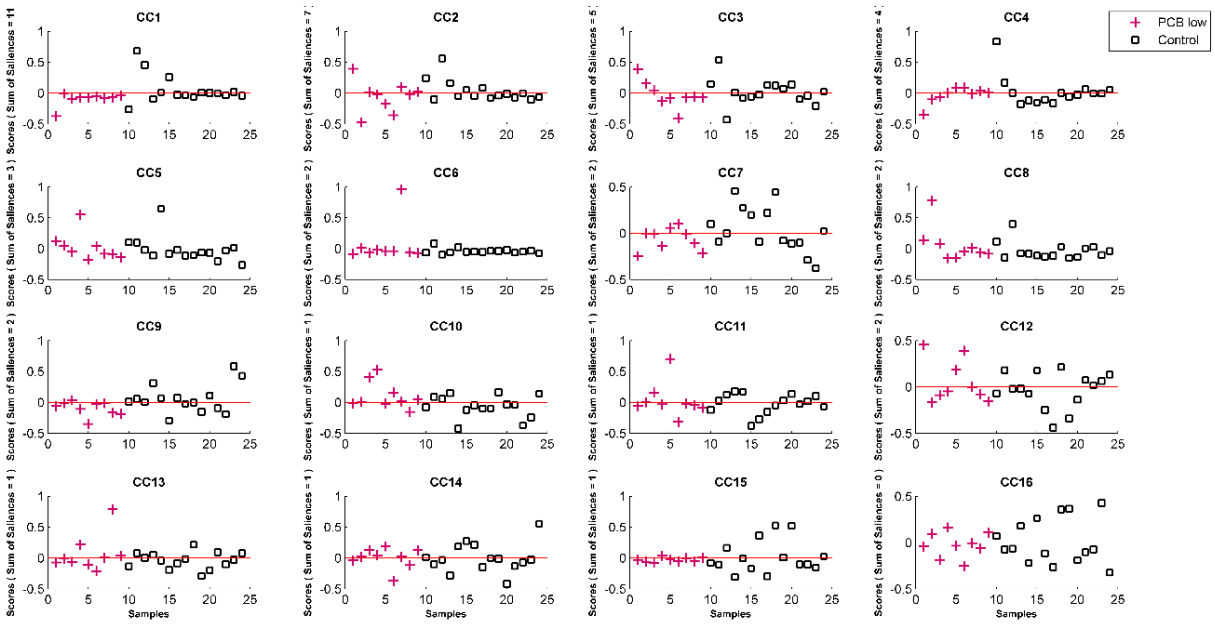


Figure 11 : Projection selon les 16 premières Composantes Communes (CC) les scores suite à l'application de l'ACC sur les données SPME-GC-MS collectées dans les tissus adipeux du groupe contrôle (n=15) et du groupe exposé à la faible dose de PCBs (n=9). Les carrés noirs représentent le groupe des contrôles et les '**+**' roses représentent le groupe exposé à la faible dose de PCBs.
PCBs.

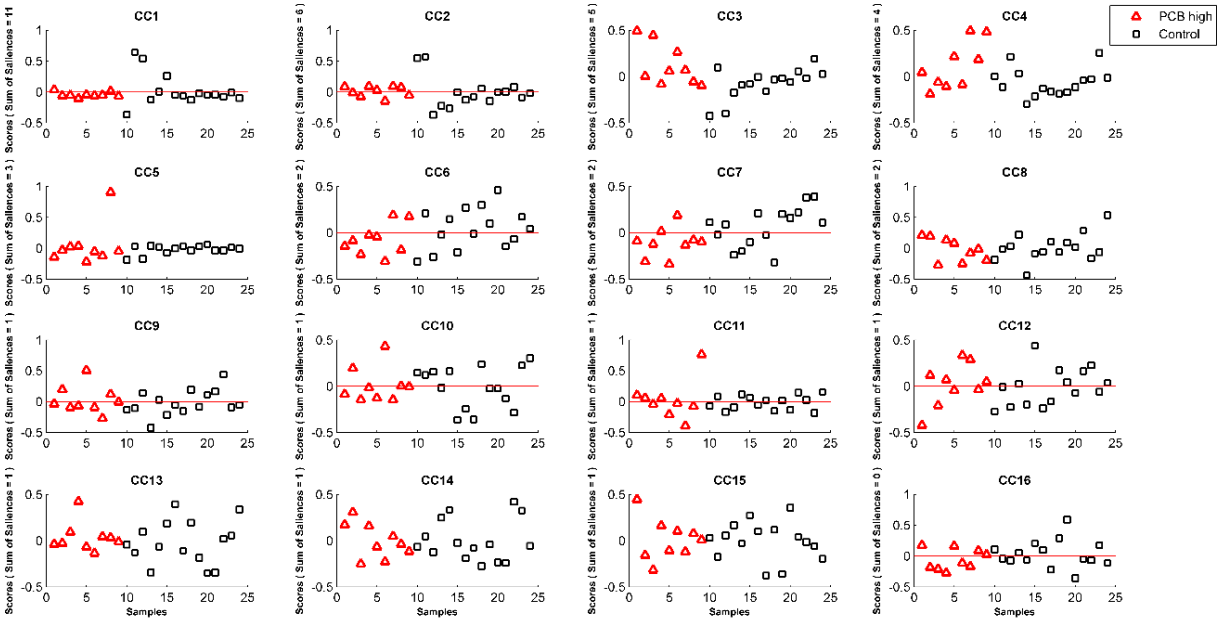


Figure 12 *:* Projection selon les 16 premières Composantes Communes (CC) les scores suite à l'application de l'ACC sur les données SPME-GC-MS collectées dans les tissus adipeux du groupe contrôle (n=15) et du groupe exposé à la forte dose de PCBs (n=9). Les carrés noirs représentent le groupe des contrôles et les triangles rouges représentent le groupe exposé à la forte dose de PCBs.

II.3.2.3. Produits vétérinaires

Les figures 13 et 14 illustrent le recouvrement entre le groupe témoin et les groupes exposés à la monensine et à l'ampicilline, respectivement. Ces résultats soulignent que l'exposition des animaux à la monensine et à l'ampicilline n'impacte pas la composition des COVs dans les tissus adipeux des animaux exposés.

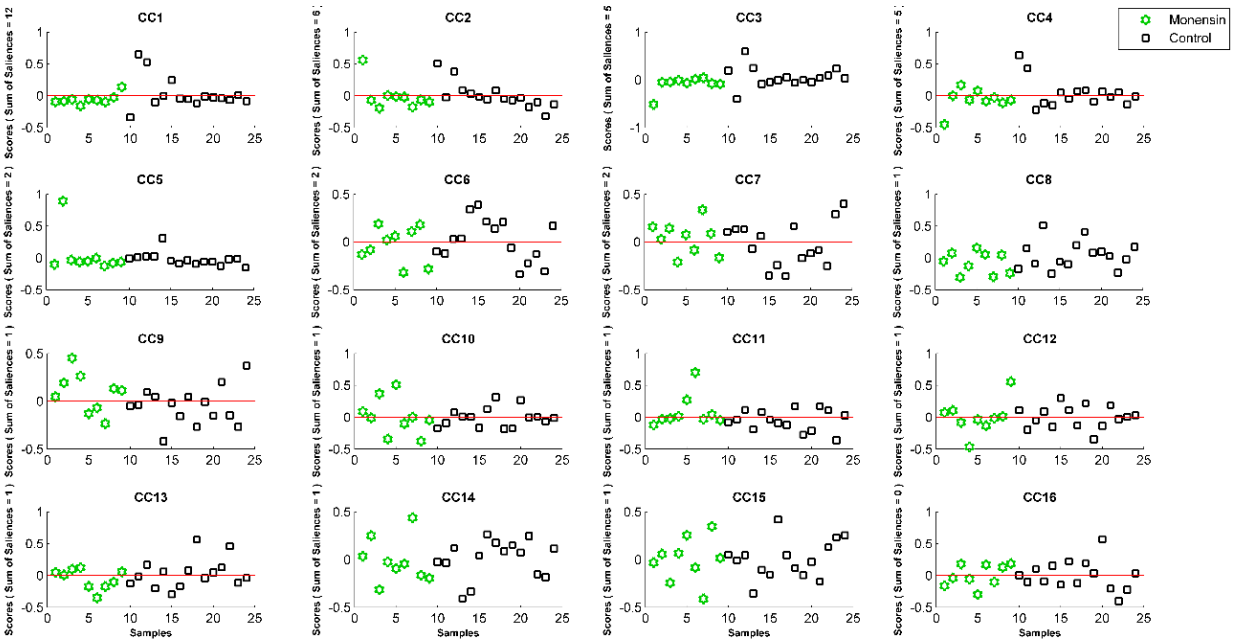


Figure 13 *:* Projection selon les 16 premières Composantes Communes (CC) les scores suite à l'application de l'ACC sur les données SPME-GC-MS collectées dans les tissus adipeux du groupe contrôle (n=15) et du groupe exposé à la monensine (n=9). Les carrés noirs représentent le groupe des contrôles et les étoiles vertes représentent le groupe de la monensine.

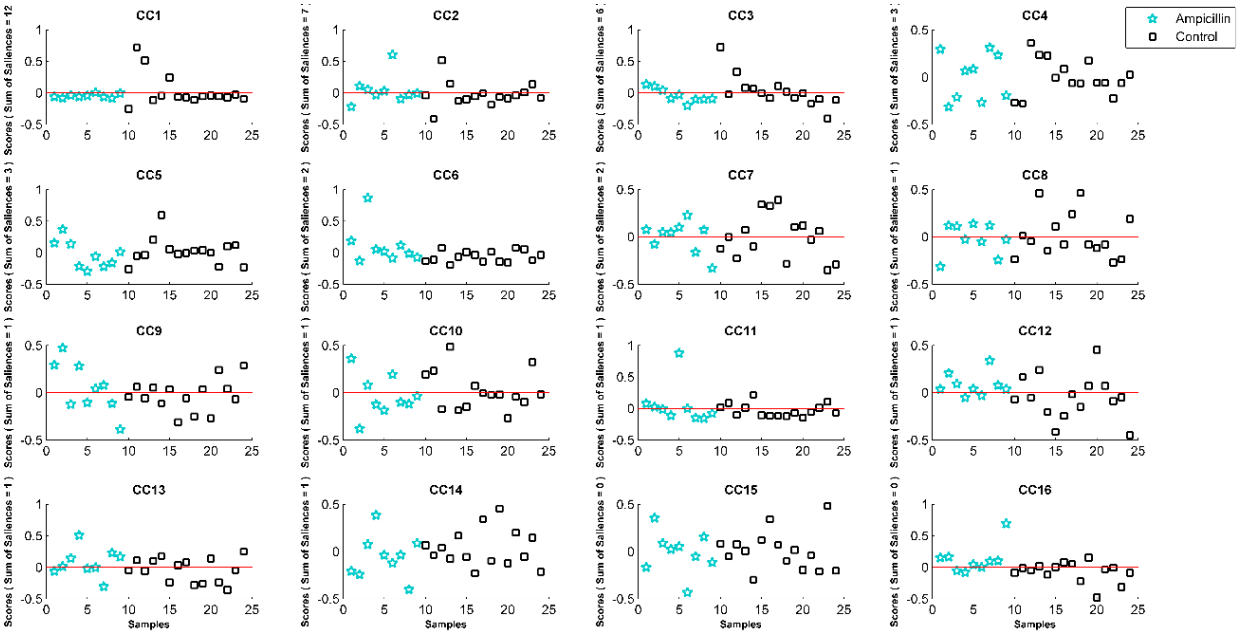


Figure 14 *:* Projection selon les 16 premières Composantes Communes (CC) les scores suite à l'application de l'ACC sur les données SPME-GC-MS collectées dans les tissus adipeux du groupe contrôle (n=15) et du groupe exposé à l'ampicilline (n=9). Les carrés noirs représentent le groupe des contrôles et les étoiles bleus représentent le groupe exposé à l'ampicilline

II.3.2.4. Pesticides

L'application de l'ACC sur le groupe témoin et le groupe exposé à la deltaméthrine illustre sur la figure 15 aucune discrimination entre ces groupes, ce résultat suggère aucune influence de l'exposition des animaux à la deltaméthrine sur les profils volatolomiques des COVs dans les tissus adipeux. De la même manière, la figure 16 montre le recouvrement du groupe exposé au lindane avec le groupe des témoins selon les 16 CCs, ce qui ne met pas en relief des changements volatolomiques dans les tissus adipeux.

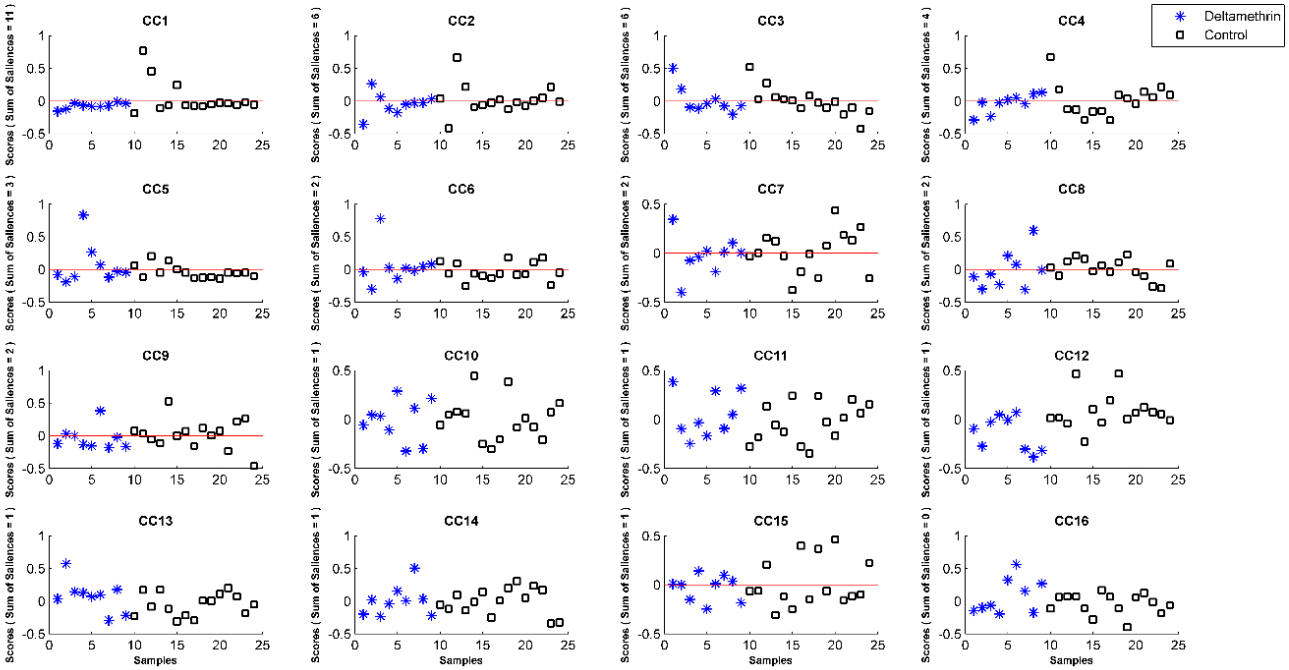


Figure 15 *:* Projection selon les 16 premières Composantes Communes (CC) les scores suite à l'application de l'ACC sur les données SPME-GC-MS collectées dans les tissus adipeux du groupe contrôle (n=15) et du groupe exposé à deltaméthrine (n=9). Les carrés noirs représentent le groupe des contrôles et les étoiles bleus représentent le groupe exposé à la deltaméthrine.

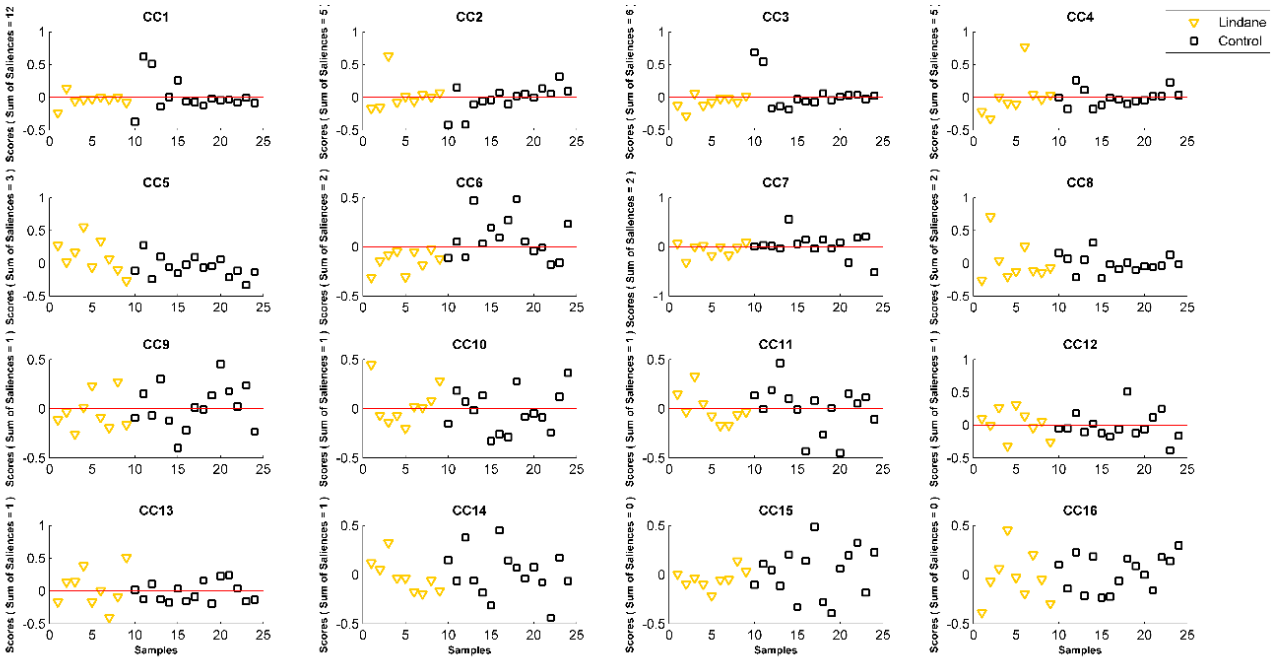


Figure 16 *:* Projection selon les 16 premières Composantes Communes (CC) les scores suite à l'application de l'ACC sur les données SPME-GC-MS collectées dans les tissus adipeux du groupe contrôle (n=15) et du groupe exposé au lindane (n=9). Les carrés noirs représentent le groupe des contrôles et les triangles jaunes représentent le groupe exposé au lindane.

II.3.2.5. Mycotoxines

Les figures 17 et 18 illustrent le recouvrement entre le groupe témoin et les groupes exposés aux fumonisines et à la zéaralenone, respectivement. Ces résultats soulignent que l'exposition des animaux à ces mycotoxines n'a pas d'influence significative sur les profils des COVs dans les tissus adipeux.

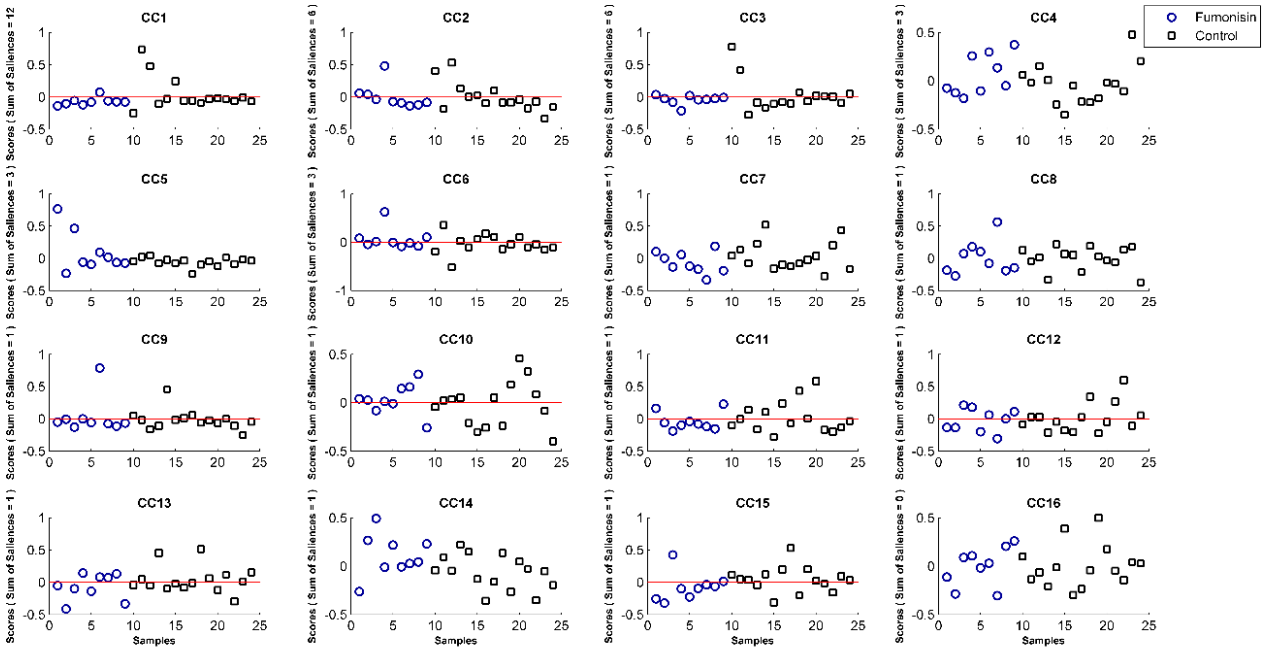


Figure 17 : Projection selon les 16 premières Composantes Communes (CC) les scores suite à l'application de l'ACC sur les données SPME-GC-MS collectées dans les tissus adipeux du groupe contrôle (n=15) et du groupe exposé aux fumonisines (n=9). Les carrés noirs représentent le groupe des contrôles et les cercles bleus représentent le groupe exposé aux fumonisines.

.

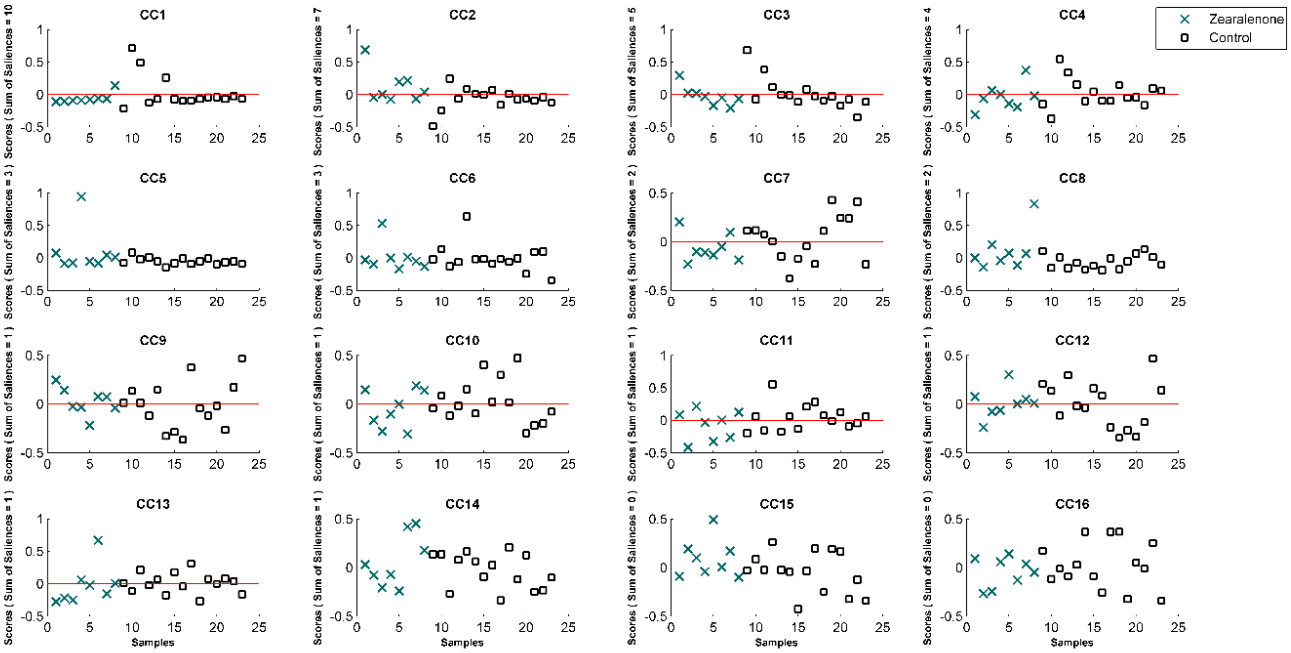


Figure 18 : Projection selon les 16 premières Composantes Communes (CC) les scores suite à l'application de l'ACC sur les données SPME-GC-MS collectées dans les tissus adipeux du groupe contrôle (n=15) et du groupe exposé à la zéaraléone (n=9). Les carrés noirs représentent le groupe des contrôles et les croix vertes représentent le groupe exposé à la zéaralenone.

Conclusion du chapitre IV

La première partie de chapitre porte sur l'exploitation des données volatolomiques dans le plasma des animaux exposés et non-exposés aux micropolluants pour révéler des marqueurs candidats pour les différents types d'exposition. En suivant la stratégie préalablement établie, la première étape du traitement consistait à appliquer l'Analyse en Composantes Communes (ACC) sur l'ensemble des données volatolomiques, les résultats n'ont pas révélé de différences volatolomiques spécifiques en réponse à l'exposition aux micropolluants. D'autre part, l'application d'ACC sur le groupe contrôle et chaque groupe exposé a révélé des différences des profils volatolomqiues des COVs en réponse à l'exposition au cadmium, à la forte dose de PCBs, à la monensine monensin, à l'ampicilline, à la deltaméthrine, et aux fumonisines. Toutefois, les résultats n'ont pas révélé de changements de la composition des COVs dans le plasma des animaux exposés à la zéaralenone.

Par conséquent, tous ces résultats montrent que l'exposition des animaux aux différents micropolluants impactent la réponse volatolomique des COVs dans le plasma et permettent l'identification de marqueurs volatils candidats pour tracer l'exposition des animaux à certains types de micropolluants. Ceci confirme la pertinence des signatures volatolomiques dans le fluide de transfert comme le plasma pour tracer l'exposition aux micropolluants par une analyse moins invasive chez l'animal et à terme chez l'homme.

D'un autre côté, les résultats de l'analyse des profils des COVs dans les tissus adipeux n'ont souligné aucune différenciation entre le groupe contrôle et chacun des groupes exposés. Ainsi, l'exposition des animaux aux micropolluants ne semble pas avoir un impact significatif sur les niveaux de production des COVs dans les tissus adipeux par rapport au normal. Par conséquent, on déduit que les profils volatolomiques des COVs dans les tissus adieux ont peu de perspectives pour tracer l'exposition aux micropolluants qui peut notamment s'expliquer par la co-élution de l'information stockée dans ces tissus au cours de la vie de l'animal.

Il est à noter aussi que la plupart des marqueurs volatils candidats dans le plasma appartiennent à différentes familles chimiques, y compris les hydrocarbures, les alcools, les aldéhydes, les cétones, les acides carboxyliques, les furannes, les composés soufrés et les composés aromatiques. En effet, la plupart de ces marqueurs ont été identifiés dans des études antérieures comme des marqueurs de pathologies et d'exposition aux substances toxiques [8].

Les niveaux de production de ces marqueurs candidats ont été notamment modulés par rapport au niveau normal par une augmentation ou une diminution dans le plasma en réponse à l'exposition aux micropolluants [9].

Par ailleurs, le nonanal et la butyrolactone ont été similairement identifiés dans le foie et le plasma comme des marqueurs d'exposition d'animaux à la deltaméthrine et au cadmium, respectivement. De plus, plusieurs marqueurs volatils identifiés dans le foie sont différents des marqueurs candidats dans le plasma ce qui suscite une complémentarité informative entre les marqueurs générées dans l'organe de détoxification et les marqueurs libérés dans la circulation sanguine, permettant désormais de renforcer la robustesse du diagnostic d'exposition aux micropolluants.

En conclusion de cette étude, l'absence de marqueurs distinctifs dans le tissu adipeux semble exclure une application directe de cette approche volatolomique sur les produits alimentaires en tout cas d'origine animale alors que les résultats positifs obtenus dans le foie mais également dans le plasma suggère la possibilité d'un diagnostic amont à l'abattoir en utilisant le foie et le plasma des animaux après l'abattage ou en in vivo sur le lieu d'élevage par des prises de sang moins invasives qui permettent de suivre la trace de l'exposition dans la chaine de production.

REFERENCES

[1] Engel, E., Ratel, J., Correction of the data generated by mass spectrometry analyses of biological tissues: Application to food authentication. J. Chromatogr. A 2007, 1154(1-2), 331-341.

[2] Sivadier, G., Ratel, J., Bouvier, F., Engel, E., Authentication of Meat Products: Determination of Animal Feeding by Parallel GC-MS Analysis of Three Adipose Tissues. J. Agric. Food Chem. 2008, 56(21), 9803-9812.

[3] Sivadier, G., Ratel, J., Engel, E., Persistence of pasture feeding volatile biomarkers in lamb fats. Food Chem. 2010, 118(2), 418-425.

[4] Narvaez-Rivas, M., Gallardo, E., Rios, J.J., Leon-Camacho, M., A tentative characterization of volatile compounds from Iberian Dry-Cured Ham according to different anatomical locations. A detailed study. Grasas Aceites 2010, 61(4), 369-377.

[5] Arrebola, J.P., Fernandez-Rodriguez, M., Artacho-Cordon, F., Garde, C., Perez-Carrascosa, F., Linares, I., Tovar, I., Gonzalez-Alzaga, B., Exposito, J., Torne, P., Fernandez, M.F., Olea, N., Associations of persistent organic pollutants in serum and adipose tissue with breast cancer prognostic markers. Sci. Total Environ. 2016, 566, 41-49.

[6] Berge, P., Ratel, J., Fournier, A., Jondreville, C., Feidt, C., Roudaut, B., Le Bizec, B., Engel, E., Use of Volatile Compound Metabolic Signatures in Poultry Liver to Back-Trace Dietary Exposure to Rapidly Metabolized Xenobiotics. Environ. Sci. Technol. 2011, 45(15), 6584-6591.

[7] Bouhlel, J., Ratel, J., Abouelkaram, S., Mercier, F., Travel, A., Baéza, E., Jondreville, C., Dervilly-Pinel, G., Marchand, P., Bizec, B.L., Dubreil, E., Mompelat, S., Verdon, E., Inthavong, C., Guérin, T., Rutledge, D.N., Engel, E., Solid-phase microextraction set-up for the analysis of liver volatolome to detect livestock exposure to micropollutants. J. Chromatogr. A 2017.

[8] Hakim, M., Broza, Y.Y., Barash, O., Peled, N., Phillips, M., Amann, A., Haick, H., Volatile Organic Compounds of Lung Cancer and Possible Biochemical Pathways. Chem. Rev. 2012, 112(11), 5949-5966.

[9] Benarbia, M.E., Macherel, D., Faure, S., Jacques, C., Andriantsitohaina, R., Malthiery, Y., Plasmatic concentration of organochlorine lindane acts as metabolic disruptors in HepG2 liver cell line by inducing mitochondrial disorder. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2013, 272(2), 325-334..

Discussion générale et Perspectives

Ce manuscrit présente une application de la volatolomique à la recherche dans le foie, le plasma et le tissu adipeux d'animaux d'élevage de composés marqueurs de leur exposition à plusieurs familles chimiques de micropolluants clés des produits carnés.

La première phase de ce travail a consisté à lever les deux principaux verrous méthodologiques de l'analyse du volatolome de matrices biologiques complexes qui relèvent du choix i) des conditions d'extraction des composés volatils des tissus et fluides animaux et ii) des méthodes chimiométriques à mettre en œuvre pour mettre en évidence les marqueurs distinctifs de l'exposition aux différents types de micropolluants.

La microextraction en phase solide (SPME) est une méthode d'extraction qui couple l'échantillonnage et la concentration des analytes dans une seule étape d'analyse chimique sans solvant [1]. La SPME se caractérise par plusieurs avantages, elle est simple, sensible et relativement non-invasive pour la nature [2]. Toutefois, l'utilisation de la SPME nécessite une étape d'optimisation selon le type de la matrice étudiée. En partant d'une preuve de concept publiée par Berge *et al*. (2011) qui ont utilisé la SPME pour l'extraction des signatures volatolomiques (SPME-MS) dans le foie, nous avons cherché à améliorer les conditions d'extraction et de préparation de l'échantillon.

Bien que la plupart des protocoles d'extraction par SPME des COVs dans les matrices biologiques privilégient une extraction à haute température pour favoriser la libération des métabolites de la matrice [3], ceci pourrait induire la transformation et la dégradation des métabolites volatils. Dans le cadre de ce travail, nous avons souligné l'avantage de l'extraction du volatolome à une température proche de la réalité physiologique de l'animal (à 40°C) d'une part sur la représentativité de l'extrait et sur la variabilité analytique, et d'autre part sur la facilité de l'interprétation biologique de l'origine métabolique des marqueurs. Cette adoption des conditions d'extraction représentatives de la physiologie animale nécessitera peut-être un couplage avec des systèmes plus performants comme la GC-MS/MS, la GC-HRMS et la GC×GC-MS.

Par ailleurs, la représentativité de l'extrait dépend de la nature de la fibre SPME qui influence la sélectivité des composés extraits [4]. Le travail de mise au point méthodologique élaboré dans la première partie de ce manuscrit a mis en évidence la sélectivité de la CAR/PDMS pour les COVs de faibles poids moléculaires tandis que la DVB/CAR/PDMS extrait efficacement les COVs plus lourds.

Cette complémentarité des deux fibres SPME ouvre des perspectives sur des méthodes instrumentales hybrides basées sur la co-extraction d'une matrice par plusieurs fibres pour élargir la fenêtre d'observation du volatolome. Des futurs développements sont également envisageables en couplage avec des applications des méthodes multi-tableaux pour exploiter au maximum la complémentarité informative des fibres.

Le deuxième volet qui porte sur le développement chimiométrique au cours de ce travail de thèse avait pour objectif de déterminer la méthode exploratoire la plus adaptée pour une exploitation efficace des données volatolomiques. Concrètement, le travail consistait à comparer le potentiel de trois méthodes chimiométriques non-supervisées ACP, ACI et ACC pour révéler des différences volatolomiques et pour identifier des marqueurs d'exposition à chaque type de contamination.

D'abord, les résultats ont démontré l'amélioration des résultats obtenus par ACP et ICA après un autoscaling des variables normalisées. Ensuite, la comparaison des résultats obtenus par ACC sur les données normalisées avec ceux d'ACP et d'ACI après un autoscaling des variables normalisées ont montré que les meilleures séparations des groupes exposés aux micropolluants sont obtenues par ACC. Sur ce point, les scores des groupes séparés selon chaque Composante Principale (PC), Composante Indépendante (IC) ou Composante Commune (CC) ont montré que les valeurs de F obtenues pour les séparations avec ACC sont plus élevées que celles obtenues par ACP et ACI ;

Par ailleurs, les rapports signal/bruit empiriques calculés sur les Loadings de chaque PC, IC et CC intéressante ont souligné que les rapports pour les ICs et les CCs sont proches ce qui explique la sélection des mêmes variables significatives alors que les rapports obtenus selon les PCs sont beaucoup plus faibles, confirmant qu'ACP n'est pas la méthode la plus adaptée à la sélection de marqueurs candidats associés aux séparations.

En résumé, le modèle exploratoire d'ACC s'est montré le plus performant pour révéler des différences volatolomiques et pour déterminer des marqueurs volatils candidats en réponse à l'exposition des animaux aux différents types de micropolluants. En perspective de ce travail, il serait intéressant de revisiter les travaux existants en couplant le modèle ACC avec les données volatolomiques dans le but d'élucider des informations supplémentaires par rapport à celles apportées par l'ANOVA-ACP.

L'application du protocole d'extraction révisé avec le modèle globale d'ACC a mis en lumière des différences spécifiques dans la réponse volatolomique du foie pour plusieurs types d'exposition (deltaméthrine, faible dose de PCBs et monensine) et a souligné une subdivision marquée des groupes en deux sous-groupes, qui suggère une forte toxicité du cadmium, de la forte dose de PCBs, du lindane et de l'ampicilline et une faible toxicité de la deltaméthrine, de la faible dose de PCBs,

de la monensine, des fumonisines et de la zéralenone. Cette étape a permis notamment de présélectionner les COVs qui contribuent le plus à chaque séparation et qui ont servi comme variables pour les modèles spécifiques d'ACC appliqués entre le groupe témoin et chaque groupe exposé. Concrètement, des différences volatolomiques pour les différents types d'exposition sont soulignées sauf pour la zéaralénone.

Par conséquent, ces travaux confirment les résultats de Berge *et al*. (2011) [5] qui ont révélé le potentiel des empreintes volatolomiques de l'hépatome à révéler l'exposition des animaux aux HAPs et aux PBDEs. Toutefois, le passage de l'analyse à basse résolution basée sur l'analyse des empreintes SPME-MS à une plus haute résolution obtenue par la séparation chromtographique couplée à la spectrométrie de masse (SPME-GC-MS), a abouti à l'identification de marqueurs volatils candidats de l'exposition d'animaux aux différents micropolluants.

Particulièrement, la présente étude a mis en évidence des différences volatolomiques pour les groupes exposés aux faible et forte doses de PCBs. Toutefois, Berge *et al*. (2011) ont exclu le potentiel des empreintes volatolomiques pour tracer l'exposition des animaux à une dose de PCBs 100 fois plus faible que la faible dose administrée dans le cadre de notre travail. Cela signifie que les changements volatolomiques dans le foie sont proportionnels à la dose d'exposition aux PCBs, mais aussi il est fort probable que la dimension chromatographique augmente la performance et la sensibilité de l'analyse pour détecter des différences volatolomiques.

Les résultats ont révélé des marqueurs candidats dans le foie d'origines endogène et exogène pour tracer chaque type d'exposition. Les mécanismes biochimiques et chimiques impliqués dans la production des COVs sont interprétés selon les suggestions de Hakim *et al*. (2012) [6] qui ont résumé ces phénomènes comme suit. En effet, les hydrocarbures, les aldéhydes et certaines cétones sont produits dans le corps en réponse au stress oxydatif, déclenché par les quantités élevées d'espèces réactives oxygénées (ROS). En réponse, le corps réagit en activant le processus de détoxification, au cours duquel les enzymes cytochromes p450 du foie catalysent l'addition d'un atome d'oxygène aux composés exogènes, ce qui les rend plus solubles dans l'eau, et à partir desquels des sous-produits comme des alcools et des aldéhydes sont produits. D'autres enzymes hépatiques peuvent également altérer les niveaux de production des COVs, tels que l'ADH, qui transforme les alcools en aldéhydes et l'ALDH, qui oxyde les aldéhydes en acides carboxyliques.

Par ailleurs, les COVs exogènes comme les furannes et les composés aromatiques provenant essentiellement de la pollution atmosphérique et de l'environnement, peuvent provoquer des réactions de peroxydation et des dommages à l'ADN.

L'étude de la sur-activation ou la désactivation de certaines voies métaboliques, telles que la glycolyse, l'apoptose et les gènes suppresseurs est une piste prometteuse qui permet de mieux comprendre les mécanismes de la production/ consommation des COVs dans les cellules hépatiques en réponse aux pathologies ou l'exposition aux micropolluants [6].

En perspectives de ce travail, il est nécessaire de vérifier la robustesse de ces marqueurs qui peut être mise en place à travers trois stratégies clés.

D'abord, il est intéressant de mettre en place d'autres expérimentations animales pour étudier la pertinence des marqueurs volatolomiques dans le foie et le plasma à tracer l'exposition animale aux différents types de micropolluants.

La deuxième stratégie consiste à étudier les voies métaboliques chez l'animal par observation directe en utilisant des lignes de cellules hépatiques qui permettent d'étudier les changements des niveaux des COVs. Ainsi, l'étude des changements volatolomiques identifiés par les voies in vivo et in vitro permet de croiser les marqueurs candidats sélectionnés par les différentes approches pour chaque type d'exposition. De plus, on note une stratégie intéressante proposée par Hakim *et al.* (2012) qui consiste à bloquer certaines fonctions métaboliques aux niveaux de différentes lignées cellulaires afin de comparer les profils de COVs mesurés avant et après le blocage. Il est notamment possible d'expliquer le lien entre la production des COVs et les mécanismes hépatocytaires impliqués dans les cellules exposées à chaque type de contamination.

La troisième stratégie porte sur l'analyse des échantillons identifiés comme contaminés dans le cadre des plans de surveillance et de contrôle (PSPC) pour valider leur robustesse de tracer l'exposition à risque pour les consommateurs.

En ce qui concerne la partie du travail qui présente l'application de la volatolomique dans le plasma à la recherche de marqueurs d'exposition aux micropolluants, les résultats d'ACC globale sur l'ensemble des signatures volatolomiques n'ont pas mis en lumière des réponses spécifiques de l'exposition aux micropolluants. Toutefois, l'application d'ACC entre le groupe témoin et chaque groupe exposé ont souligné des différences volatolomiques pour l'exposition des animaux au cadmium, à la forte dose de PCBs, à la deltaméthrine, à la monensine, à l'ampicilline et aux fumonisines, mais pas pour les groupes exposés à la faible dose de PCBs, au lindane et à la zéaralénone. Ainsi, la volatolomique dans le plasma est une approche pertinente pour déterminer des différences volatolomiques en réponse à l'exposition des animaux aux micropolluants et pour identifier des marqueurs candidats associés à chaque type d'exposition.

Cependant, les signatures volatolomiques dans les tissus adipeux n'ont abouti à aucun changement des niveaux de production des COVs en réponse à l'exposition des animaux aux micropolluants.

Tous ces résultats suggèrent le potentiel des signatures volatolomiques des COVs dans le foie qui est l'organe de détoxification et le plasma qui est le fluide de transfert pour identifier des marqueurs candidats aux différents types d'exposition. De manière attendu, la réponse volatolomique dans les tissus adipeux a tendance à s'agréger et se co-éluer au cours de la durée de vie de l'animal.

La comparaison des marqueurs candidats dans le foie et le plasma ont souligné la butyrolactone comme marqueur commun de l'exposition des animaux au cadmium. Par ailleurs, différents marqueurs ont été identifiés dans le foie et le plasma, ce qui suscite une complémentarité entre les informations volatolomiques du foie et du plasma pour tracer l'exposition aux micropolluants.

Au vu de ces résultats, la réponse volatolomique dans le foie est une approche pertinente qui peut être appliquée dans l'abattoir, on note aussi le potentiel de l'approche volatolomique dans le plasma qui pourrait également servir de modèle pour le développement de nouvelles méthodes de contrôle moins invasives à l'abattoir ou au cours de l'élevage. Compte tenu des résultats obtenus sur l'approche volatolomique dans les tissus adipeux, elle semble difficilement applicable aux produits alimentaires d'origine animale, du moins à la viande.

Pour conclure, les marqueurs volatils identifiés dans le foie et le plasma représentent des pistes sérieuses pour le développement de nouvelles méthodes analytiques rapides et peu couteuses qui peuvent améliorer le diagnostic de pathologies comme le cancer ou tracer l'exposition aux micropolluants. Il est possible aussi d'investir ces marqueurs candidats pour concevoir des nano-capteurs qui auront pour fonctionnalité de tracer des pathologies ou un risque d'exposition.

Parallèlement, d'autres approches omiques adoptées dans le cadre du Projet SOMEAT comme l'analyse des composés polaires dans le foie par HR-MS n'ont pas abouti à l'identification de marqueurs éventuellement complémentaires aux marqueurs volatolomiques. De même, les résultats de l'exploitation des données d'analyse du transcriptome hépatique des animaux ne montrent pas de différences dans le transcriptome du foie entre « cas » et témoin. Par ailleurs, l'étude du lipidome dans le sérum des animaux exposés et non-exposés aux micropolluants a révélé des différences lipidomiques uniquement en réponse à l'exposition des animaux aux faible et forte doses de PCBs. Dans la même optique, une étude protéomique des mêmes échantillons collectés semble fournir des résultats extrêmement prometteurs et des informations complémentaires à celles apportées par le volatolome.

En perspectives, il est envisageable d'affiner l'analyse des différentes données omiques par application des approches chimiométriques multi-tableaux pour explorer des informations communes aux différentes approches et étudier notamment la complémentarité informative des différentes informations spécifiques collectées par chaque approche omique.

De plus, le traitement simultané des données omiques par les outils chimiométriques multi-tableaux pourra conjuguer les potentiels informatifs des différentes approches et révéler des informations supplémentaires sur de nouveaux marqueurs prometteurs capables de tracer l'exposition aux micropolluants.

REFERENCES

[1] Jafari, M.T., Saraji, M., Ameri, A.H., Coupling of solid phase microextraction with electrospray ionization ion mobility spectrometry and direct analysis of venlafaxine in human urine and plasma. Anal. Chim. Acta 2015, 853, 460-468.

[2] Zhang, Q.-H., Zhou, L.-D., Chen, H., Wang, C.-Z., Xia, Z.-N., Yuan, C.-S., Solid-phase microextraction technology for in vitro and in vivo metabolite analysis. TrAC Trends in Analytical Chemistry 2016, 80, 57-65.

[3] Perestrelo, R., Barros, A.S., Rocha, S.M., Camara, J.S., Optimisation of solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry based methodology to establish the global volatile signature in pulp and skin of Vitis vinifera L. grape varieties. Talanta 2011, 85(3), 1483-1493.

[4] Risticevic, S., Pawliszyn, J., Solid-Phase Microextraction in Targeted and Nontargeted Analysis: Displacement and Desorption Effects. Anal. Chem. 2013, 85(19), 8987-8995.

[5] Berge, P., Ratel, J., Fournier, A., Jondreville, C., Feidt, C., Roudaut, B., Le Bizec, B., Engel, E., Use of Volatile Compound Metabolic Signatures in Poultry Liver to Back-Trace Dietary Exposure to Rapidly Metabolized Xenobiotics. Environ. Sci. Technol. 2011, 45(15), 6584-6591.

[6] Hakim, M., Broza, Y.Y., Barash, O., Peled, N., Phillips, M., Amann, A., Haick, H., Volatile Organic Compounds of Lung Cancer and Possible Biochemical Pathways. Chem. Rev. 2012, 112(11), 5949-5966.

Annexe 1

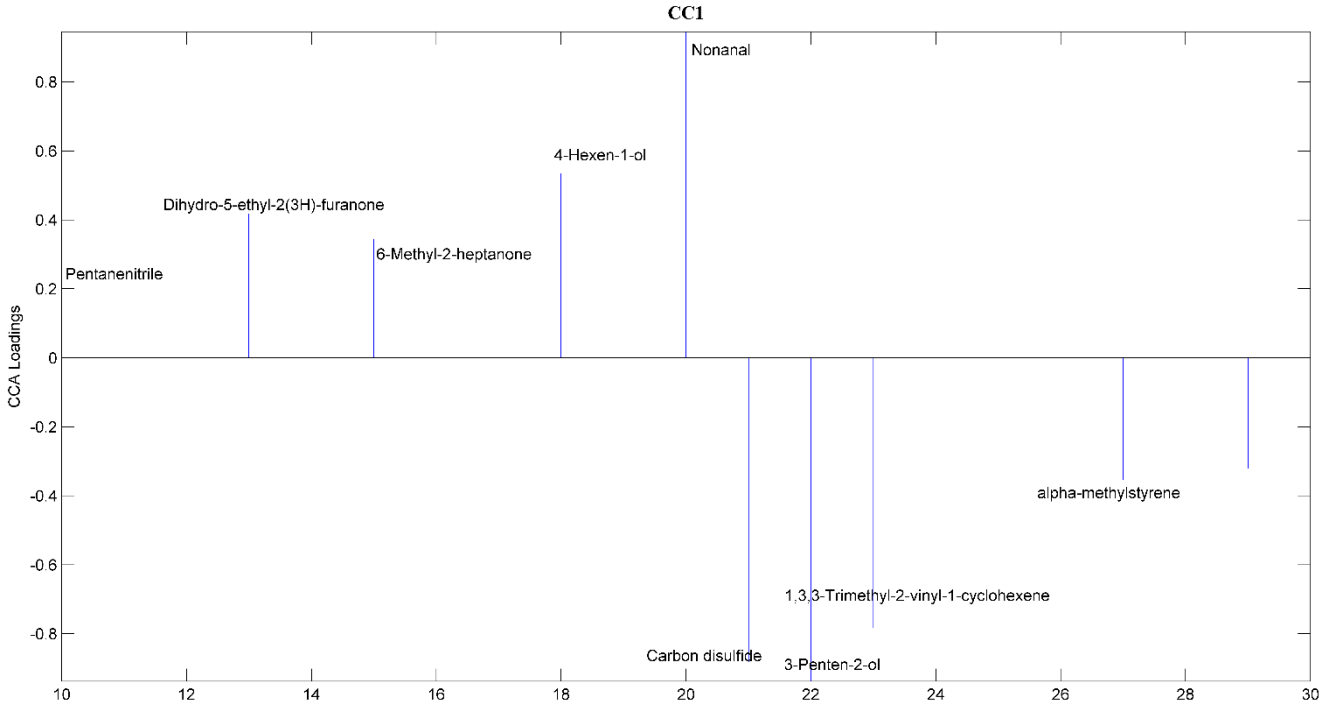


Figure 1. Result of specific CCA analysis of control group and deltamethrin exposed group: Labeled plots of CCA Loadings along CC1.

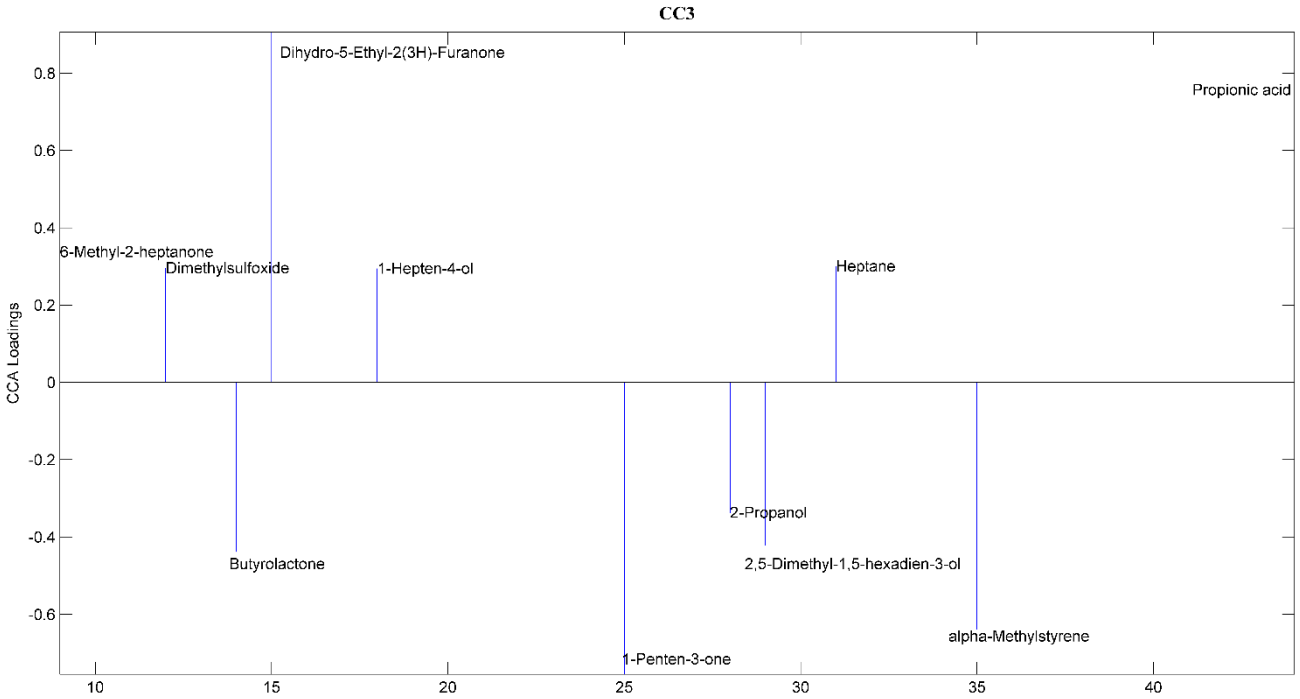


Figure 2. Result of specific CCA analysis of control group and cadmium exposed group: Labeled plots of CCA Loadings along CC3.

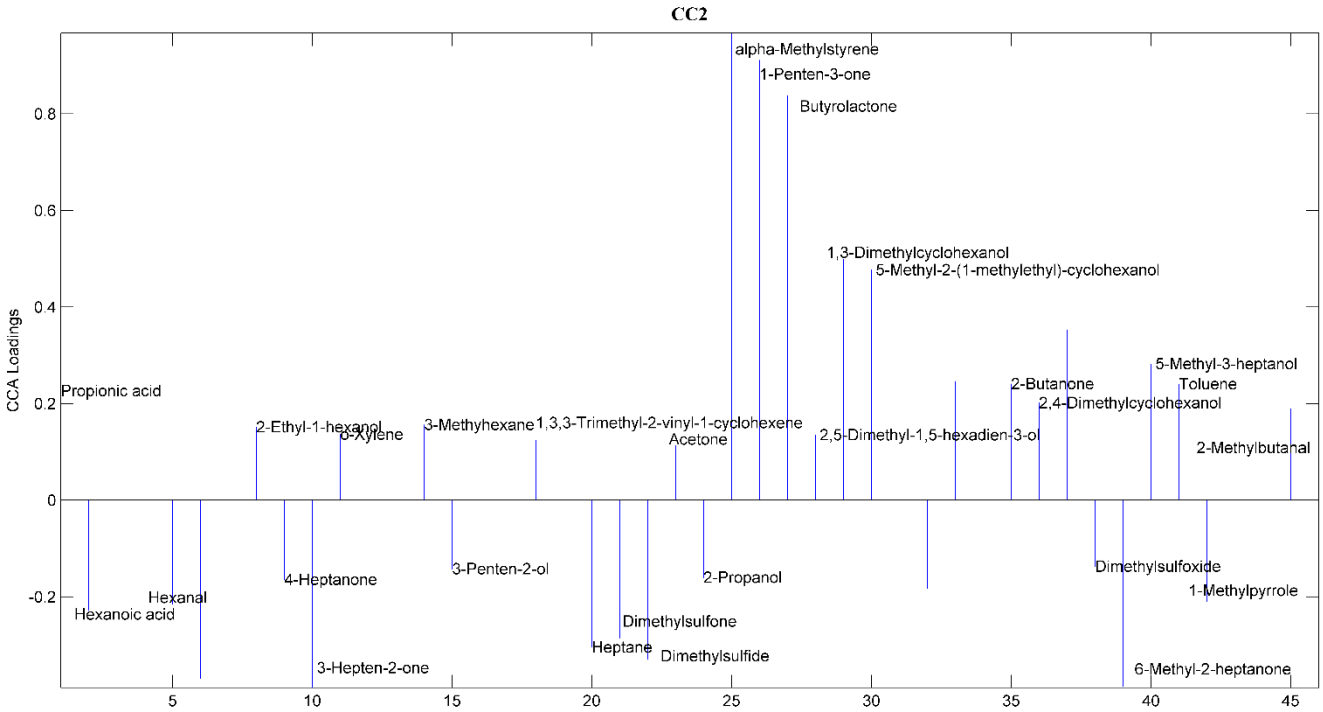


Figure 3. Result of specific CCA analysis of control group and ampicillin exposed group: Labeled plots of CCA Loadings along CC2.

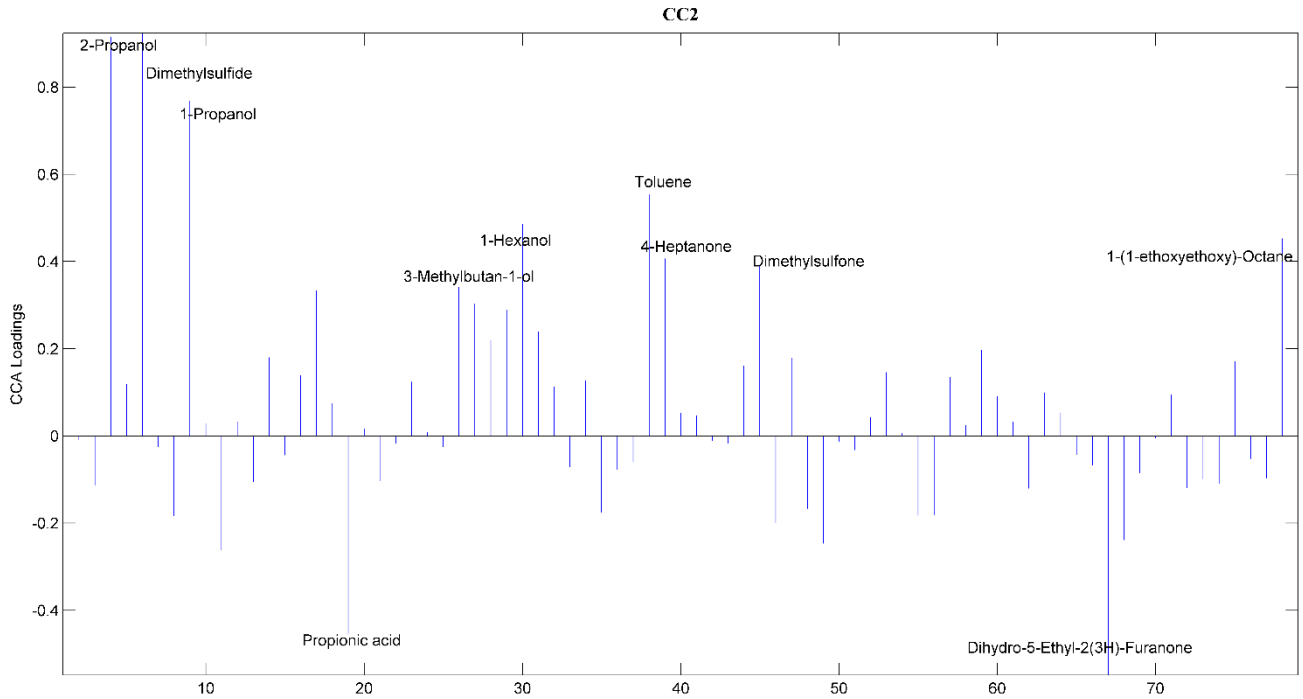


Figure 4. Result of specific CCA analysis of control group and fumonisins exposed group: Labeled plots of CCA Loadings along CC2.

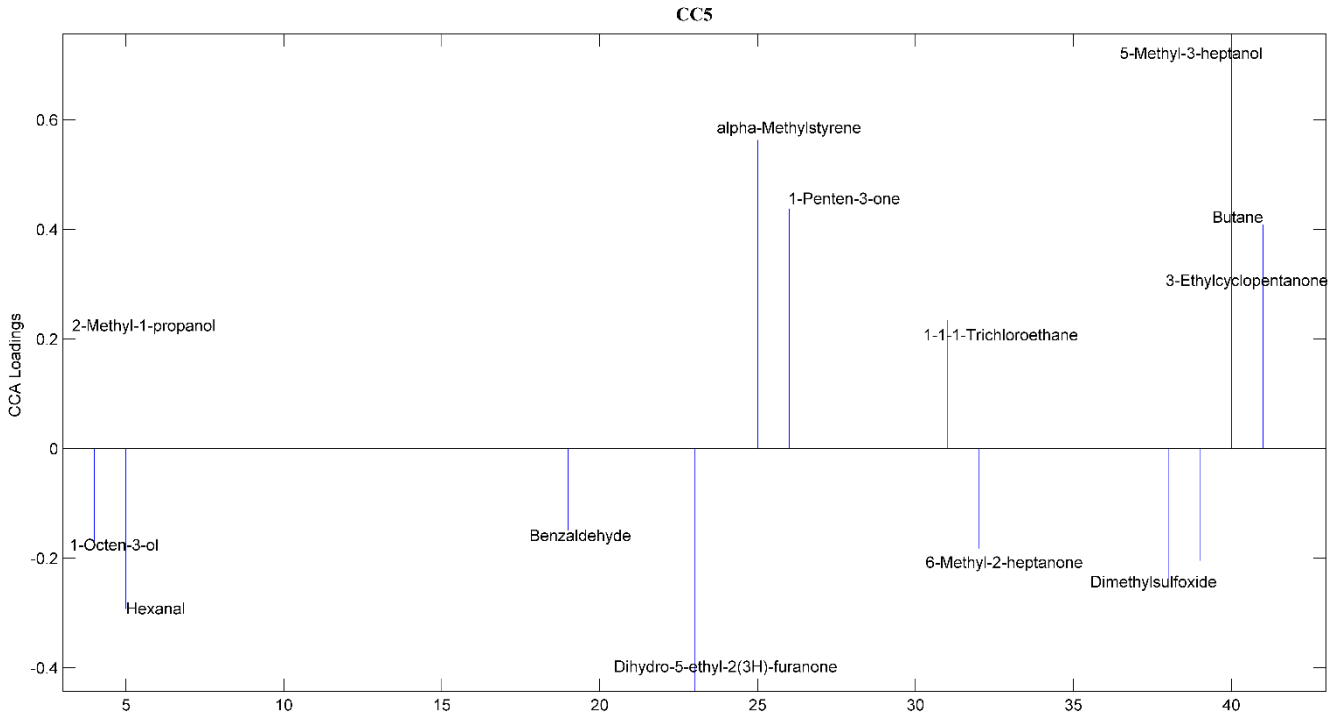


Figure 5. Result of specific CCA analysis of control group and lindane exposed group: Labeled plots of CCA Loadings along CC5.

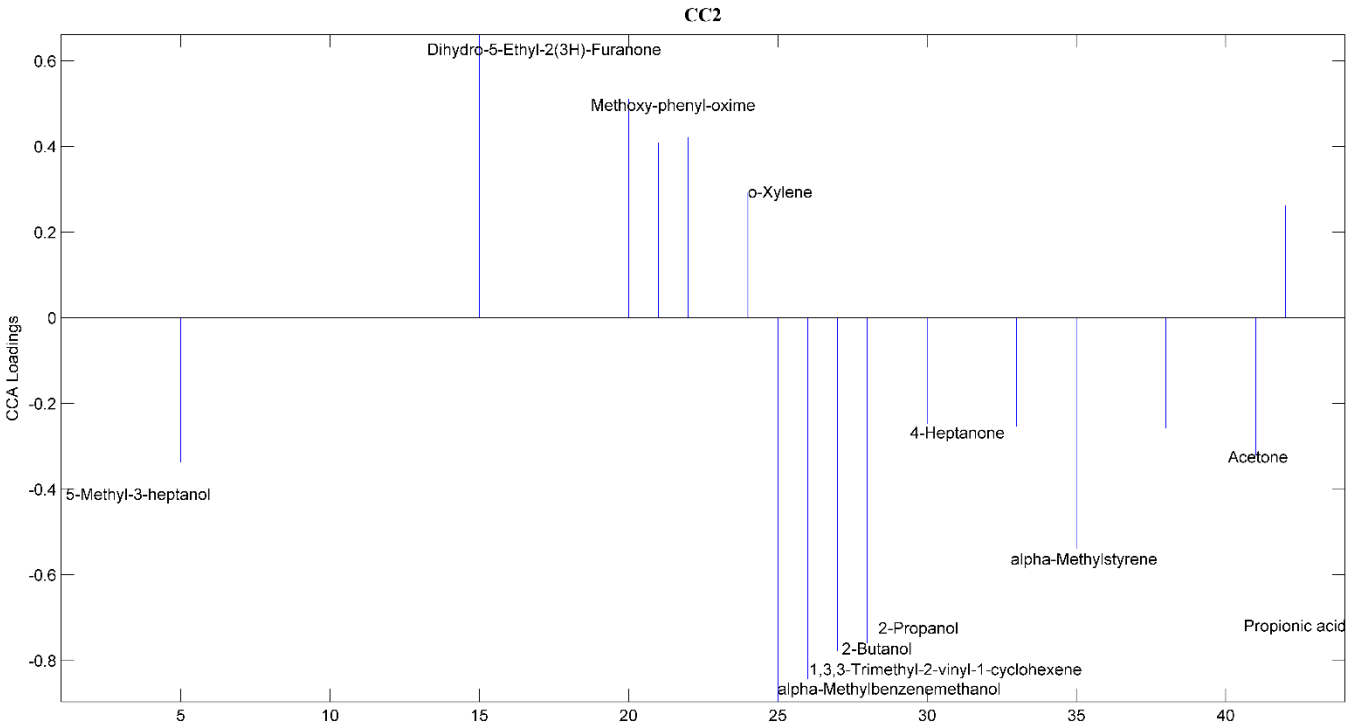


Figure 6. Result of specific CCA analysis of control group and monensin exposed group: Labeled plots of CCA Loadings along CC2.

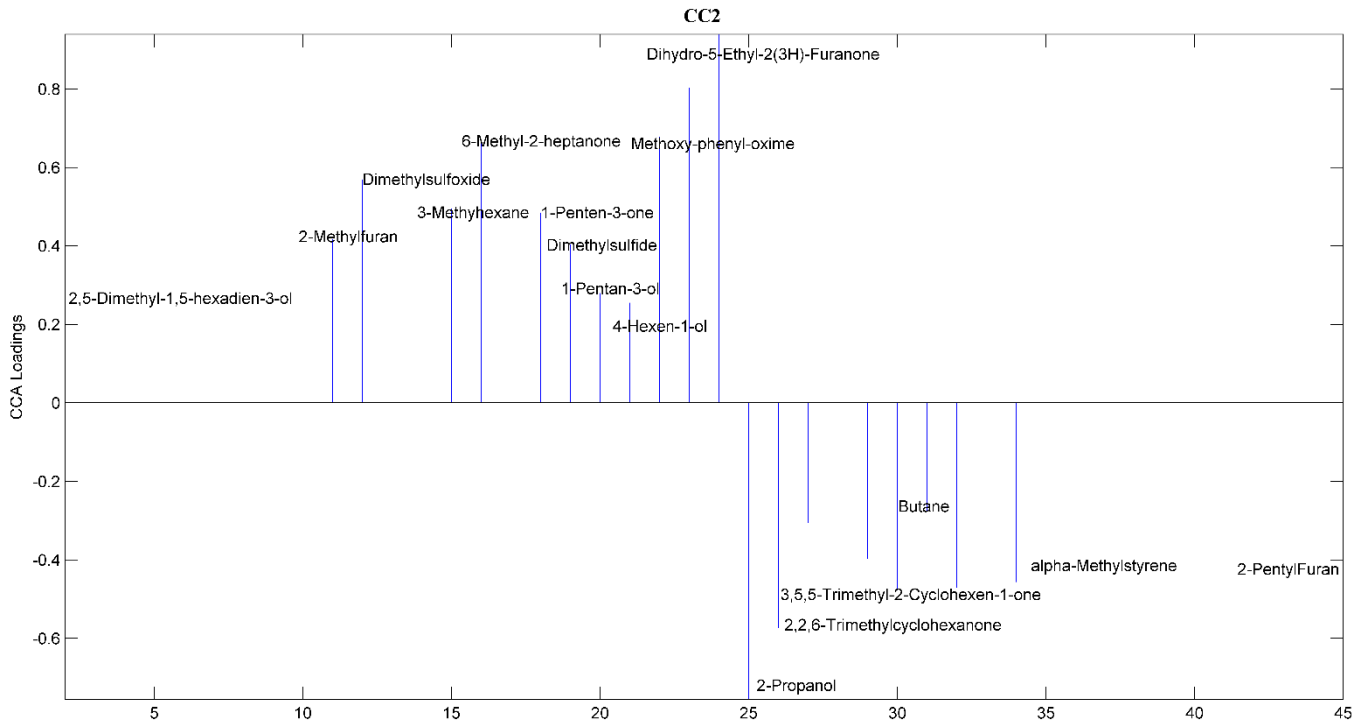


Figure 7. Result of specific CCA analysis of control group and PCB10 exposed group: Labeled plots of CCA Loadings along CC2.

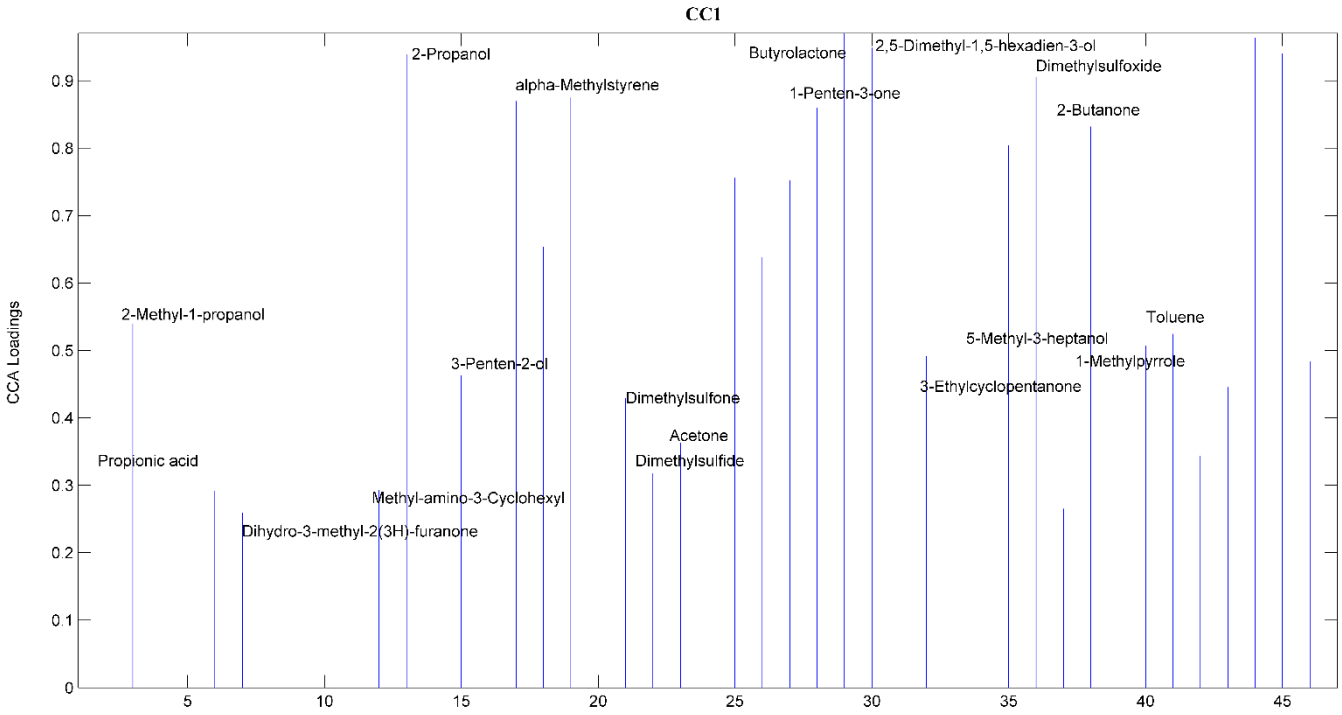


Figure 8. Result of specific CCA analysis of control group and PCB50 exposed group: Labeled plots of CCA Loadings along CC1.

ÉCOLE DOCTORALE
Agriculture, alimentation, biologie, environnement, santé (ABIES)

Titre : Application de la volatolomique à la recherche de marqueurs d'exposition aux micropolluants dans le foie, le plasma et le tissu adipeux.

Mots clés : Volatolomiques, Micropolluants, Marqueurs d'exposition, Foie, Plasma, Tissu adipeux

Résumé : Ce travail de thèse propose d'examiner l'intérêt de la volatolomique pour révéler dans le foie, le plasma et le tissu adipeux des composés organiques volatils (COVs) marqueurs d'exposition des animaux d'élevage aux micropolluants.
Des développements méthodologiques ont d'abord été réalisés pour lever deux principaux verrous à l'application de la volatolomique. Un premier volet de ce travail méthodologique a ainsi permis de proposer des conditions d'extraction par microextraction en phase solide à la fois efficace, fidèle et reproductible pour l'analyse du volatolome de matrices biologiques complexes. Une comparaison de trois méthodes chimiométriques non-supervisées- l'Analyse en Composantes Principales (ACP), l'Analyse en Composantes Indépendantes (ACI) et l'Analyse en Composantes Communes (ACC) – a montré ensuite l'intérêt de l'ACC pour révéler des différences volatolomiques et identifier des marqueurs candidats pour chaque type d'exposition.
En s'appuyant sur ces développements, un second volet de ce travail a permis d'évaluer l'intérêt de la volatolomique pour tracer l'exposition des animaux d'élevage à différents types de micropolluants. Cette recherche a confirmé la pertinence de l'analyse volatolomique du foie et a montré que le plasma pouvait permettre également un diagnostic ouvrant la voie à des contrôles *in vivo* de l'exposition animale. Les résultats montrent également une complémentarité informative entre les deux matrices biologiques. En revanche, le potentiel informatif de l'analyse du volatolome de tissus adipeux s'est révélé beaucoup plus limité, l'étude ne permettant pas d'identifier le moindre marqueur d'exposition.
Ainsi, si la robustesse de ces marqueurs est validée par des travaux ultérieurs, ces résultats ouvrent la voie à un diagnostic de l'exposition animale aux micropolluants à l'abattoir ou sur le lieu d'élevage.

Title : Application of volatolomics to reveal markers of exposure to micropollutants in liver, plasma and adipose tissue

Keywords : Volatolomics, Micropollutants, Exposure Markers, Liver, Plasma, Adipose tissues

Abstract: The present study proposes to examine the relevance of liver, plasma and adipose tissue volatolomics to detect volatile organic compound (VOC) markers of animal exposure to micropollutants. Methodological developments were first carried to solve two main limits to the application of volatolomics.
A first part of this methodological development enabled the determination of the efficient, accurate and reproducible solid phase microextraction conditions for the analysis of the volatolome in complex biological matrices. Then, a comparison of three unsupervised chemometric methods - Principal Components Analysis (PCA), Independent Components Analysis (ICA) and Common Components Analysis (CCA) - highlighted the potential of CCA for the determination of volatolomic differences in VOC profiles and for the identification of candidate VOC markers for each contamination.
Based on these methodological developments, the second part of this work studied the potential of liver, plasma and adipose tissue volatolomics to back-trace animal exposure to different types of micropolluants. These results confirmed the relevance of the volatolomic analysis of the liver and showed that the plasma could also of interest, opening the way to *in vivo* controls of animal exposure to micropollutants. Moreover, the results demonstrated the complementarity of the biological matrices. The informative potential of the volatolome analysis of adipose tissue is much more limited, as the study did not lead to the identification of any marker of exposure. If the robustness of these candidate markers is validated by further studies, these results pave the way for the diagnosis of animal exposure to micropollutants in slaughterhouse and during animal breeding.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France