



HAL
open science

Validation d'une méthode de Multi-Target-Screening par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem et étude de l'utilisation des résultats des criblages toxicologiques dans les services de réanimation et d'urgences du CHU de Grenoble

Gautier Szymanski

► To cite this version:

Gautier Szymanski. Validation d'une méthode de Multi-Target-Screening par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem et étude de l'utilisation des résultats des criblages toxicologiques dans les services de réanimation et d'urgences du CHU de Grenoble. Sciences pharmaceutiques. 2013. dumas-00910222

HAL Id: dumas-00910222

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00910222v1>

Submitted on 27 Nov 2013

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.

AVERTISSEMENT

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

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2013

N°

**Validation d'une méthode de Multi-Target-Screening par chromatographie
liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem et
étude de l'utilisation des résultats des criblages toxicologiques dans les
services de réanimation et d'urgences du CHU de Grenoble**

**Mémoire du diplôme d'études spécialisées de biologie médicale
Conformément aux dispositions du décret N°90-180 du 10 septembre 1990 tient lieu de**

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE,
DIPLOME D'ETAT

Par Mr. Gautier Szymanski
Né le 13/06/1985, à Doullens

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE*

Le 24 septembre 2013

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Président de jury : Mr. le Professeur Vincent Danel

Membres

Mme le Professeur Françoise Stanke-Labesque
Mme le Docteur Mireille Bartoli
Mme le Docteur Leila Potton
Mr. Jean-François Jourdil

Directeur de thèse: Mme le Docteur Mireille Bartoli

**La faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



Doyen de la Faculté : **M. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2012-2013

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES (n=11)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Abcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
WOUESSIDJEWÉ	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=6)

CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
CORNET	Muriel	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH-THEREX-TIMC)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotecnologie (IAB, PU-PH)

PROFESSEUR EMERITE (n=1)

GRILLOT	Renée	Parasitologie – Mycologie Médicale (L.A.P.M)
----------------	-------	--

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES (n=31)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BELAIDI-CORSAT	Elise	Pharmacologie Physiologie –(HP2)
BOURGOIN	Sandrine	Biochimie – Biotecnologie (IAB)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)

Dernière mise à jour : 17/07/2013

Rédacteur : LANTOU FAURE ; Secrétaire doyen Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France – TEL : +33 (0)4 75 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique (Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128)
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie (D.P.M)
MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=3)		
ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
BUSSER	Benoit	Pharmacie (MCU-PH-IAB-INSERM)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I/MCU-PH)
PROFESSEUR CERTIFIE (PRCE) (n=2)		
FITE	Andrée	P.R.C.E
GOUBIER	Laurence	P.R.C.E

Dernière mise à jour : 17/07/2013

Rédacteur : LANTOU FAURE : Secrétaire doyen Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 75 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=4)

BELLETT	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)
DON	Martin	Laboratoire TIMC-IMAG

PROFESSEUR AGREGE (PRAG) (n=1)

GAUCHARD	Pierre-Alexis	(D.P.M)
----------	---------------	---------

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

SUEUR	Charlotte	Virologie (U.V.H.C.I)
VAN NOOLEN	Laëticia	Biochimie Toxicologie (HP2-DBTP-BGM)

ATER (n= 6)

DAYDE David	ATER	Parasitologie Mycologie (J.R)
FAVIER Mathieu	ATER	Pharmacologie - Laboratoire HP2 (JR)
HADDAD-AMAMOU Anis	ATER	Laboratoire de Pharmacie Galénique
HENRI Mariou	ATER	Physiologie – Laboratoire HP2 (JR)
LEHMANN Sylvia	ATER	Biochimie Biotechnologie (JR)
REGENT-KLOEKNER Myriam	ATER	Biochimie (LECA-UJF)

MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=9)

CAVAREC	Fanny	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
GRAS	Emmanuelle	(01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
LESART	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Laboratoire (TIMC-IMAG)
MELAINE	Feriel	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2(JR)
NASRALLAH	Chady	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2(JR)
THOMAS	Amandine	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
LECERF-SHMIDT	Florine	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Pharmacochimie (DPM)
BERTHOIN	Lionel	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Laboratoire (TIMC-IMAG-THEREX)
MORAND	Jessica	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Laboratoire HP2 (JR)

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogénèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Dernière mise à jour : 17/07/2013

Rédacteur : LANTOU FAURE ; Secrétaire doyen Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 75 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

Remerciements

Au Professeur Vincent Danel, pour avoir accepté de présider ce jury et pour vos conseils lors de la mise en place de l'étude prospective.

Au Professeur Françoise Stanke-Labesque, pour votre accueil dans le service de Pharmacologie-Toxicologie, votre disponibilité, et vos conseils dans le suivi thérapeutique pharmacologique.

Au Docteur Mireille Bartoli, pour avoir accepté d'encadrer cette thèse, pour votre esprit critique et les connaissances que vous m'avez transmises.

A Jean-François Jourdil, pour ta disponibilité, mise à rude épreuve, les connaissances analytiques que tu as su me transmettre et tes conseils avisés.

Au Docteur Maxime Maignan, pour vos conseils sur la prise en charge des intoxications médicamenteuses graves dans les services des urgences et votre participation lors de l'étude prospective.

Au Docteur Leila Potton, pour le temps passé à éplucher les dossiers médicaux, pour vos précieux conseils sur la prise en charge des patients hospitalisés dans une unité de soins intensifs, pour votre sympathie et votre disponibilité.

A Zine-Eddine, pour ta participation lors de l'analyse des résultats, un grand merci.

A tous les internes ayant participé de près ou de loin à cette thèse.

Veillez croire en ma sincère reconnaissance.

Aux personnes que j'ai rencontrées lors de cet internat, aussi bien à Clermont-Ferrand qu'à Grenoble, et qui ont participé à ma formation. Pour leurs pédagogies et leurs sympathies.

Je tiens particulièrement à remercier le Professeur Hervé Pelloux, le Professeur Vincent Sapin et le Professeur Marc Berger. Merci aux Docteur Anne-Françoise Sapin, Alain Marques-Verdier, Nathalie Dupre, Marie-Ange Coudore, Chantale Rapatel, Laurence Roszyk, Geoffroie Marceau, Sylvie Bonnemoy, Marie-Pierre Brenier-Pinchart, Claudine Pinel, Bernadette Lebeaux, Daniel Maubon, Jean-Benjamin Murat, Odile Faure, Jacques Croisé, Christine Recule, Isabelle Pelloux, Xavier Fonrose, Julia Tonini, Anne Barret, Hélène Eysseric, Julie Mondet, Raphael Marlut, Pascal Mossuz, Claire Vettier, Bénédicte Bulaboïs et Christine Lefèvre.

Merci, à vous, techniciens et techniciennes, qui m'avez accompagné pendant ces 4 années, particulièrement à l'équipe du laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie.

Vous êtes au centre de notre formation et tous les internes de biologie médicale vous doivent une profonde reconnaissance.

A mes parents, sans qui je ne serai jamais arrivé jusqu'ici. Pour votre soutien, votre éducation, votre gentillesse, pour les valeurs que vous avez su me transmettre. Votre « Tanguy » n'est plus à la maison mais il pense tous les jours à vous.

A mes grands-parents, qui m'ont choyé et bichonné lors de mon enfance, et aujourd'hui encore.

A mon frère, à tous ces moments passés ensemble. Tu as toujours su trouver les mots pour me reconforter, me remonter le moral et m'encourager dans les moments difficiles. Je n'ai plus qu'à t'apprendre à surfer et tu seras parfait ;).

A Marion, pour ta gentillesse et les bons plats que tu vas me préparer.

A mes oncles, tantes, cousins, cousines, et toute ma famille, pour cette cohésion reconfortante.

A ma belle Famille, pour son accueil et son ouverture d'esprit.

A Prudence, à tous ces bons moments de stress partagés, de réveils aux aurores et de couchers.....aux aurores aussi. On va pouvoir enfin en profiter...

A mes amis, sans qui la vie serait moins fun. Je crois que c'est le moment des privées jokes, non ?

A mon Titi, pour sa roublardise et son sens « inné » de la réussite.

A Raymond, ch'rem, ch'pité...comme quoi, avec des soirées canap et l'esprit détendu, on avance.

A Antoine, footballeur émérite du SC Bernaville, on aurait pu t'appeler le président, on aurait pu.....

A Gonzi, alias Papa. Je m'arrêterai là pour les surnoms car zézette n'est pas ton préféré.

A Byndeck, encore un mec à qui je vais devoir apprendre à surfer !

A Paulette, mon Polo, pour ton sens aiguë de l'organisation !

A Miroux ! Je sens encore l'odeur de cette golf GTI !! Aux souvenirs des meetings tunnings sur la place d'Amiens !

A JJ, pour ta maîtrise de la langue française.

A Toinou, pour ta technique de fauchage des blés.

A Yvan, la force tranquille, merci d'avoir canalisé Mr Millet.

A Sylvain, l'homme qui va droit au but, merci d'avoir bougé Mr Caspar.

A Guillaume T. Merci d'avoir partagé ces moments uniques de supporter Lensois.

A Guillaume S. Pour ta rigueur et ta ponctualité.

A Guillaume R. Pour m'avoir toujours laissé quelque chose à manger à l'internat.

A Saber, je t'ai vu une fois en chemise....merci.

A Carine, pour ta faculté d'adaptation en garde.

A Sultan, tu vas nous manquer. Partir en couple c'est toujours plus facile.

A Adrien. Le grand, pas celui d'Annecy. Ta diplomatie et ton tact m'ont toujours impressionné.

A Maelle, pour nous avoir laissé si souvent Guillaume en soirée.

A Pierre. Je n'oublierai jamais ce que tu as fait pour moi ! Un coiffeur comme ça, ça ne se trouve qu'une fois.

A Adrien, l'autre grand, le pro de l'attéro.

A ma concierge préférée, pour tous ces potins (vérifiés ou pas), ces pauses cafés de 5 minutes.....ou pas. Pour ces : « non mais t'es sûre que t'as le temps, j'en ai pour 5 minutes »,et pour cette voie inimitable que tu prends après une bonne menthe à l'eau.

A tous les autres (je suis désolé mais on m'a limité).

Aux Clermontois : Stéphanie, Thomas, Mathieu, Tifanie, Mélanie, Thibault, Sébastien, Guillaume, Vincent, Pascaline, Marion.

Aux pharmaciens (je suis désolé on m'a obligé) : Leponey, Pierrot, Karlito, Dédé (oui oui, c'est une fille), Marjo, Pierrot, Bruno, Polak, Mélanie, Amandine.

A tous les internes que j'ai croisés lors de mon internat.

Enfin, à Paul-Alexandre Mercier et Thomas Berendsen, qui ont su m'attendre pour passer leur thèse.

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	10
TABLE DES ILLUSTRATIONS	12
LISTE DES ABREVIATIONS	14
INTRODUCTION	16
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	20
1. DEFINITION DU CIBLAGE TOXICOLOGIQUE	20
2. RECOMMANDATIONS DE PRESCRIPTION DES CIBLAGES TOXICOLOGIQUES	21
3. TECHNIQUES DE CIBLAGE TOXICOLOGIQUE DISPONIBLES AU LABORATOIRE	24
3.1. <i>CLHP-BD</i>	24
3.2. <i>CPG-SM</i>	27
3.2.1. Avantages	28
3.2.2. Limites	28
4. CIBLAGE TOXICOLOGIQUE PAR CLHP-SM/SM	29
4.1. <i>Rappels de spectrométrie de masse</i>	29
4.1.1. Introduction de l'échantillon	30
4.1.2. Ionisation	31
4.1.3. Sélection des ions	32
4.1.4. Détection des ions	33
4.2. <i>Spectrométrie de masse en tandem</i>	33
4.3. <i>Les différents modes d'acquisition de la SM/SM</i>	35
4.3.1. Mode Full Scan	35
4.3.2. Product Ion Scan (PI)	36
4.3.3. Enhanced Product Ion scan (EPI)	36
4.3.4. Multiple Reaction Monitoring (MRM)	37
4.4. <i>L'acquisition sous le logiciel Analyst® 1.5.2</i>	38
4.4.1. Scheduled MRM	38
4.4.2. Critères IDA	39
4.4.3. EPI	40
4.4.4. Exemple d'une acquisition MRM-IDA-EPI	40
4.4.5. Rapport automatique sous le logiciel Cliquid® 3.2	44
5. VALIDATION D'UNE METHODE DE CIBLAGE TOXICOLOGIQUE.	45
VALIDATION D'UNE METHODE DE CIBLAGE TOXICOLOGIQUE PAR CLHP-SM/SM	49
1. MATERIELS ET METHODES	49
1.1. <i>Réactifs et produits de référence</i>	49
1.2. <i>Préparation des échantillons</i>	50
1.2.1. Molécules testées.	50
1.2.2. Etalon interne (EI)	50
1.2.3. Plasma surchargé	51
1.2.4. Contrôle interne de qualité	51
1.3. <i>Choix de la méthode d'extraction</i>	53
1.4. <i>Instruments</i>	55
1.4.1. Chromatographie	55
1.4.2. Spectrométrie de masse	57
1.4.2.1. Optimisation des paramètres « source »	57
1.4.2.2. Optimisation des paramètres « produit »	58

1.4.2.3. Acquisition	59
1.4.3. Logiciels	60
1.4.4. Banque de transition MRM	60
1.4.5. Bibliothèque de spectres	60
1.5. <i>Evaluation de la sensibilité de la méthode</i>	60
1.6. <i>Limite d'identification (LOI)</i>	61
1.7. <i>Répétabilité</i>	62
1.8. <i>Fidélité intermédiaire</i>	62
1.9. <i>Comparaison de méthodes</i>	63
2. RESULTATS.....	64
2.1. <i>Méthode d'extraction</i>	64
L'intérêt des 3 autres techniques d'extraction est traité ultérieurement (paragraphe 2.5).	65
2.2. <i>Sensibilité de la méthode</i>	65
2.3. <i>Limite d'identification (LOI)</i>	68
2.4. <i>Répétabilité</i>	71
2.5. <i>Fidélité intermédiaire</i>	74
2.6. <i>Comparaison de méthodes</i>	78
3. DISCUSSION	80
3.1. <i>Avantages</i>	80
3.2. <i>Limites</i>	83
3.3. <i>Perspectives</i>	84
ETUDE DE L'UTILISATION DES RESULTATS DES CIBLAGES TOXICOLOGIQUES DANS LES SERVICES DE REANIMATION ET D'URGENCES DU CHU DE GRENOBLE. 1^{ER} JUILLET – 31 DECEMBRE 2012	85
1. MATERIELS ET METHODES.....	85
1.1. <i>Analyse rétrospective</i>	85
1.2. <i>Analyse prospective</i>	86
2. RESULTATS.....	87
2.1. <i>Analyse rétrospective</i>	87
2.1.1. Données cliniques	87
2.1.2. Justification des prescriptions	88
2.2. <i>Analyse prospective</i>	90
2.2.1. Données cliniques	90
2.2.2. Justification des prescriptions	91
2.2.3. Résultats toxicologiques	94
2.2.4. Utilité du criblage toxicologique	95
3. DISCUSSION	97
3.2. <i>Analyse prospective</i>	98
CONCLUSION.....	101
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	103
ANNEXE.....	107

Table des illustrations

Figures :

FIGURE 1 : SCHEMA GENERAL D'UN CRIBLAGE TOXICOLOGIQUE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	21
FIGURE 2 : SCHEMA DECISIONNEL AUX URGENCES DEVANT UNE SUSPICION D'INTOXICATION [6].....	23
FIGURE 3 : SPECTRE DE MASSE DU CELIPROLOL DE MASSE MOLECULAIRE = 379,4 G.MOL-1	30
FIGURE 4 : SCHEMA GENERAL D'UN SPECTROMETRE DE MASSE	30
FIGURE 5 : SOURCE ELECTROSPRAY TURBOV® [23].....	31
FIGURE 6 : PRINCIPE D'IONISATION PAR ELECTROSPRAY	32
FIGURE 7 : ANALYSEUR QUADRIPOLAIRE	33
FIGURE 8 : SCHEMA REPRESENTATIF DU SPECTROMETRE DE MASSE ABSCIEX 3200 QTRAP DE CONFIGURATIO QQLIT.	34
FIGURE 9 : MODE D'ACQUISITION FULL SCAN (A GAUCHE) ET SIM (A DROITE)	35
FIGURE 10 : REPRESENTATION D'UN MODE DE BALAYAGE D'ION PRODUIT	36
FIGURE 11 : REPRESENTATION D'UN MODE DE BALAYAGE EPI.....	36
FIGURE 12 : REPRESENTATION D'UN MODE DE BALAYAGE MRM	37
FIGURE 13 : PRINCIPE DU SCREENING MTS : BALAYAGE MRM-IDA-EPI.....	39
FIGURE 14 : ASSEMBLAGE DES SPECTRES DE MASSE AUX ENERGIES DE COLLISION 20 EV, 35 EV ET 50 EV.....	40
FIGURE 15 : COURANT IONIQUE TOTAL D'UN ECHANTILLON ET SELECTION DES EPI AU TEMPS T = 5,6 MIN	41
FIGURE 16 : EPI DES DEUX TRANSITIONS LES PLUS INTENSES RETROUVEES AU TEMPS DE RETENTION T = 5,5 MIN	42
FIGURE 17 : RECHERCHE D'UNE CORRESPONDANCE ENTRE UN SPECTRE ACQUIS ET	43
FIGURE 18 : CHROMATOGRAMME EXTRAIT SOUS CLIQUID® 3.2	44
FIGURE 19 : EXEMPLE D'UN RESUME DES COMPOSES DETECTES SOUS CLIQUID® 3.2 LORS D'UNE ACQUISITION.....	44
FIGURE 20 : COMPARAISON DU SPECTRE DU CELIPROLOL ACQUIS AU SPECTRE DE REFERENCE DE LA BIBLIOTHEQUE	45
FIGURE 21 : REPARTITION DES TEMPS DE RETENTION DES 700 COMPOSES RECHERCHES AU COURS DU MTS.....	51
FIGURE 22 : COURANT IONIQUE TOTAL DU CONTROLE DE QUALITE INTERNE	52
FIGURE 23 : GRADIENT D'ELUTION DU RUN CHROMATOGRAPHIQUE.....	56
FIGURE 24 : GRADIENT D'ELUTION DU RUN DE PURGE.....	57
FIGURE 25 : SOURCE D'IONISATION ELECTROSPRAY TURBOV® ET	58
FIGURE 26 : MOLECULES TESTEES EN MTS SOUS CLIQUID 3.2	65
FIGURE 27 : DETAILS DES COMPOSES DETECTES EN CLHP-BD ET CLHP-SM/SM (NOMBRE D'OCCURRENCES).....	79
FIGURE 28 : INDICATIONS DES DEMANDES DES CRIBLAGES TOXICOLOGIQUES	88
FIGURE 29 : DEMANDES DE CRIBLAGE TOXICOLOGIQUE PAR LES SERVICES DE REANIMATION ET D'URGENCES	90
FIGURE 30 : INDICATIONS DES DEMANDES DES CRIBLAGES TOXICOLOGIQUES	92
FIGURE 31 : MOLECULES RETROUVEES LORS DES DEMANDES DE CRIBLAGES TOXICOLOGIQUES POSITIFS.....	95

Tableaux :

TABLEAU I : ELEMENTS DE VERIFICATION ET DE VALIDATION DE METHODE QUALITATIVE DE PORTEE DE TYPE B.....	46
TABLEAU II : VALIDATION DES METHODES DE CRIBLAGE TOXICOLOGIQUE PRESENTES SUR LE MARCHÉ DEPUIS 2006.....	47
TABLEAU III : METHODES D'EXTRACTIONS TESTEES EN CHLP-SM/SM.....	53
TABLEAU IV : AVANTAGES ET LIMITES DES 4 PREMIERES TECHNIQUES D'EXTRACTION TESTEES POUR LE CRIBLAGE TOXICOLOGIQUE PAR CLHP-SM /SM.....	64
TABLEAU V : MOLECULES INFUSEES, NON DISPONIBLES DANS LA BANQUE DE TRANSITIONS MRM INITIALE.....	66
TABLEAU VI : MOLECULES EXCLUES DU CRIBLAGE TOXICOLOGIQUE PAR CLHP-SM/SM.....	67
TABLEAU VII : DIFFERENCE DES TEMPS DE RETENTION PAR RAPPORT AU TEMPS DE RETENTION THEORIQUE (N=97).....	67
TABLEAU VIII : LISTE DES COMPOSES DETECTES PAR TECHNIQUE CLHP-SM/SM ET LOI CORRESPONDANTES.....	69
TABLEAU IX : REPETABILITE : MOYENNES ET COEFFICIENTS DE VARIATION DU RAPPORT [AIRE MOLECULE/AIRE ETALON INTERNE] AUX CONCENTRATIONS DE 100 ET 1000 NG/ML (N=6).....	72
TABLEAU X : REPETABILITE : MOYENNES ET COEFFICIENTS DE VARIATION DES TEMPS DE RETENTION ET PURETES A 100 ET 1000 NG/ML (N=6).....	73
TABLEAU XI : FIDELITE INTERMEDIAIRE : MOYENNES ET COEFFICIENTS DE VARIATION DU RAPPORT [AIRE MOLECULE/AIRE ETALON INTERNE] AUX CONCENTRATIONS DE 100 ET 1000 NG/ML (N=6).....	74
TABLEAU XII : FIDELITE INTERMEDIAIRE : MOYENNES ET COEFFICIENTS DE VARIATION DES TEMPS DE RETENTION ET PURETES A 100 ET 1000 NG/ML.....	75
TABLEAU XIII : COMPARAISON DES COEFFICIENTS DE VARIATION DU RAPPORT [AIRE MOLECULE/AIRE ETALON INTERNE] A 10, 100 ET 1000 NG/ML ENTRE LA TECHNIQUE DE PRECIPITATION DE PROTEINES ET LES TECHNIQUES PHREE® OSTRO® ET ISOLUTE SLE+®.....	77
TABLEAU XIV : DONNEES CLINIQUES DES DEMANDES DE CRIBLAGES TOXICOLOGIQUES.....	87
TABLEAU XV : INDICATIONS DES DEMANDES DE CRIBLAGE TOXICOLOGIQUE DANS LES SERVICES DE REANIMATION MEDICALE ET D'ACCUEIL DES URGENCES. ETUDE RETROSPECTIVE, JUILLET 2010 A JUIN 2011.....	89
TABLEAU XVI : DONNEES CLINIQUES RELATIVES AUX DEMANDES DE CRIBLAGE TOXICOLOGIQUE OBTENUES LORS DE LA RECEPTION DU PRELEVEMENT (ETUDE PROSPECTIVE 1 ^{ER} JUILLET 2012 AU 31 DECEMBRE 2013).....	91
TABLEAU XVII : INDICATIONS DES DEMANDES DE CRIBLAGE TOXICOLOGIQUE DANS LES SERVICES DE REANIMATION MEDICALE ET D'ACCUEIL DES URGENCES (ETUDE PROSPECTIVE 1 ^{ER} JUILLET 2012 AU 31 DECEMBRE 2013).....	92
TABLEAU XVIII : RENSEIGNEMENTS CLINIQUES DES DEMANDES DE CRIBLAGE TOXICOLOGIQUE POUR IMV GRAVE OBTENUS AUPRES DU CLINICIEN PRESCRIPTEUR (ETUDE PROSPECTIVE 1 ^{ER} JUILLET 2012 AU 31 DECEMBRE 2013).....	93
TABLEAU XIX : TECHNIQUES DE CRIBLAGE TOXICOLOGIQUE UTILISEES ET DELAI DE RENDU DE RESULTATS.....	94
TABLEAU XX : UTILITE DIAGNOSTIQUE DES DEMANDES DE CRIBLAGE TOXICOLOGIQUE.....	95
TABLEAU XXI : MODIFICATION DE LA PRISE EN CHARGE DES PATIENTS SUITE AUX RESULTATS DE SCREENING TOXICOLOGIQUE.....	96

Liste des abréviations

ATCD : antécédents
AVC : accident vasculaire cérébral
BSTFA : N,O bis(triméthylsilyl) trifluoroacetamide
CE : énergie de collision
CEP : potentiel d'entrée dans la cellule de collision
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CID : dissociation induite par collision
CIQ : contrôle interne de la qualité
CLHP : chromatographie liquide haute performance
CLHP-BD : chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes
CLHP-SM : chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse
CLHP-SM/SM : chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem
CLHP-TOF : chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol
COFRAC : Comité Français d'Accréditation
CPG : chromatographie en phase gazeuse
CPG-SM : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
cps : coup par seconde
CXP : potentiel de sortie de la cellule de collision
DP: Declustering potential
ECG: électrocardiogramme
EEQ : évaluation externe de la qualité
EI : étalon interne
EP : potentiel d'entrée
EPI : Enhanced Product Ion scan
ESI : ionisation par électrospray
eV : électronvolts
GATOX : Groupement des Enseignants de la Toxicologie
GUS : General Unknown Screening
IDA : Information Dependent Acquisition
IE : Impact électronique
IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion
IMV : intoxication médicamenteuse volontaire
LIT : trappe d'ion linéaire (piège à ions linéaire)
LLE : extraction liquide/liquide
LOD : limite de détection
LSD : diethylamide de l'acide lysergique
MRM : Multiple Reaction Monitoring
MTBE : Méthyl terbutyl éther
MTS : Multi-Target-Screening

NL : Constant Neutral Loss
PC : Precursor Ion Scan
PFP : pentafluorophényl
PI : Product Ion Scan
PP : précipitation de protéines
QqLIT : Triple quadripôle associé à une trappe d'ion linéaire
QqQ: triple quadripôle
RTW: fenêtre de temps de rétention
SAU: service d'accueil des urgences
SFBC : Société Française de Biologie Clinique
SFMU: Société Française de Médecine d'Urgence
SFTA : Société Française de Toxicologie Analytique
SIM : Single Ion Monitoring
SKF-525 : proadifen
SLE : Supported Liquid Extraction
SM : spectromètre de masse
SM/SM: spectrométrie de masse en tandem
SPE : extraction sur phase solide
SRLF : Société de Réanimation de la Langue Française
SRM : Selected Reaction Monitoring
STC : Société de Toxicologie Clinique
TMCS : triméthylchlorosilane
TOF: temps de vol
TR : temps de rétention
TS : tentative de suicide
UV : Ultra-violet
v/v : volume/volume

Introduction

Au cours des dix dernières années, la toxicologie analytique s'est considérablement développée. L'évolution des techniques séparatives, associée à des modes de détection performants et la réduction des coûts d'investissement ont facilité l'accessibilité des techniques de pointe aux toxicologues analystes. Les dosages quantitatifs par immunochimie, par chromatographie en phase gazeuse (CPG) ou encore par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) restent les analyses toxicologiques d'urgence. Elles permettent d'obtenir une réponse rapide devant une intoxication aiguë par des médicaments comme le paracétamol, la digoxine, le lithium, le méprobamate ou encore la chloroquine (1).

A ces analyses quantitatives ciblées, se sont associées des techniques de recherche large de toxiques, accompagnées ou non de quantification et appelées « criblage toxicologique », « screening toxicologique », « Multi-Target-Screening » (MTS) ou encore « General Unknown Screening » (GUS). Longtemps restées inaccessibles aux situations d'urgences, elles se sont peu à peu développées pour devenir un outil incontournable au sein des laboratoires de toxicologie des Centres Hospitaliers Universitaires (CHU) (2). La chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (CLHP-BD) a permis l'essor de ces nouvelles approches. Par la suite, la détection par spectrométrie de masse a connu une croissance exponentielle : les techniques de CPG et de CLHP couplées à ce type de détection (CPG-SM et CLHP-SM) se sont démocratisées. Aujourd'hui, nombre de méthodes arrivent sur le marché et les techniques de CLHP couplées à la spectrométrie de masse en tandem (CLHP-SM/SM) occupent une place majeure dans l'arsenal des techniques de toxicologie analytique (2)(3)(4) .

La méthode qui détecte l'ensemble des toxiques, rapidement, et pour un faible coût n'existe pas. Toutes ces techniques (CLHP-BD, CPG-SM, CLHP-SM/SM) sont complémentaires et possèdent leurs avantages et leurs inconvénients.

Devant la multiplicité de ces criblages toxicologiques développés au sein des laboratoires de toxicologie ou proposés par des fournisseurs, deux points semblent essentiels :

- le biologiste toxicologue se doit de maîtriser la sensibilité, la spécificité et les limites de ces techniques, notamment dans le contexte d'accréditation dans lequel baigne actuellement biologie médicale, et de les adapter aux pratiques quotidiennes
- le dialogue et la coopération entre le clinicien et le biologiste toxicologue sont indispensables, afin d'assurer une utilisation optimale et réfléchie de ces nouvelles analyses et d'éviter les dépenses excessives induites par le dépistage systématique.

Les recommandations actuelles préconisent que ces criblages toxicologiques soient réservés aux patients avec troubles neurologiques graves ou coma inexplicé, en l'absence d'orientation précise. Ils doivent l'être également lors de suspicion d'intoxication médicamenteuse grave, lorsque l'évolution clinique et les examens complémentaires sont incompatibles avec l'anamnèse et le toxidrome initial (5)(6)(7).

Pour le moment, très peu d'études concernant l'impact réel de ces criblages toxicologiques sur la conduite diagnostique et thérapeutique sont disponibles ou datent de plusieurs décennies (8)(9)(10)(11).

Le laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie du CHU de Grenoble dispose de deux techniques de screening toxicologique, l'une par CLHP-BD et l'autre par CPG-SM. Lors de mon stage d'internat au sein de ce laboratoire, nous avons eu l'opportunité de mettre en place une

technique de criblage toxicologique par CLHP-SM/SM. Nous avons ensuite décidé d'évaluer l'utilisation des criblages toxicologiques dans les services de réanimation et d'accueil des urgences. Ceci constitue la base de mes travaux de thèse dont les objectifs sont doubles:

- Valider une méthode de criblage toxicologique par CLHP-SM/SM :
 - Choisir une technique de préparation d'échantillon appropriée pour la mise en place de ce criblage toxicologique par CLHP-SM/SM
 - Tester la sensibilité des molécules peu ou non détectées par les autres techniques de criblage toxicologique disponibles au laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie du CHU de Grenoble.
 - Evaluer la possibilité de mise en place d'une méthode semi-quantitative pour ces molécules préalablement sélectionnées
 - Tester la sensibilité des molécules des classes pharmacologiques suivantes : benzodiazépines, antidépresseurs, neuroleptiques, stupéfiants, dont les produits de référence sont disponibles au laboratoire.
 - Valider la méthode selon les critères du Comité Français d'Accréditation (COFRAC SH GTA 04) (12) afin de disposer d'une troisième méthode de criblage toxicologique.

- Evaluer l'utilisation du criblage toxicologique dans les services de réanimation et d'accueil des urgences du CHU de Grenoble.
 - Evaluer les indications des prescriptions des criblages toxicologiques parvenant au laboratoire et leur utilité diagnostique
 - Evaluer l'utilisation des résultats de ces criblages toxicologiques par les médecins des unités de soins.

Nous développerons dans une première partie les recommandations de prescriptions des criblages toxicologiques, les techniques disponibles au sein du laboratoire et le principe analytique de ce nouveau criblage toxicologique par CLHP-SM/SM. Dans un second temps, nous présenterons la validation de cette méthode de criblage toxicologique par CLHP-SM/SM. Enfin, nous exposerons les résultats d'une étude prospective sur les indications de prescriptions et l'utilité diagnostique et thérapeutique des criblages toxicologiques réalisés pour les patients hospitalisés dans les services de réanimation et d'accueil des urgences du 1^{er} juillet au 31 décembre 2012 au CHU de Grenoble.

Rappels bibliographiques

L'analyse toxicologique est utilisée dans de nombreux domaines comme la toxicologie clinique, la toxicologie médico-légale, la toxicologie professionnelle, environnementale ou encore la lutte anti-dopage. Nous ne développerons ici que la partie toxicologie clinique.

1. Définition du criblage toxicologique

Le terme de criblage toxicologique regroupe toutes les techniques permettant de détecter de façon simultanée un nombre conséquent de molécules. Il est constitué généralement d'un système chromatographique associé à un système de détection et à un système informatique de traitement de données. Le système chromatographique permet une séparation des composés présents dans un échantillon et est généralement une CLHP ou une CPG. Les différents types de détecteurs que l'on peut retrouver sont soit des détecteurs Ultra-Violet (UV) à barrette de diodes, soit des spectromètres de masse simple (SM) ou en tandem (SM/SM). Les spectres acquis sont ensuite comparés à des bibliothèques de spectres de référence préalablement réalisées. Le schéma d'un criblage toxicologique est résumé sur la figure 1.

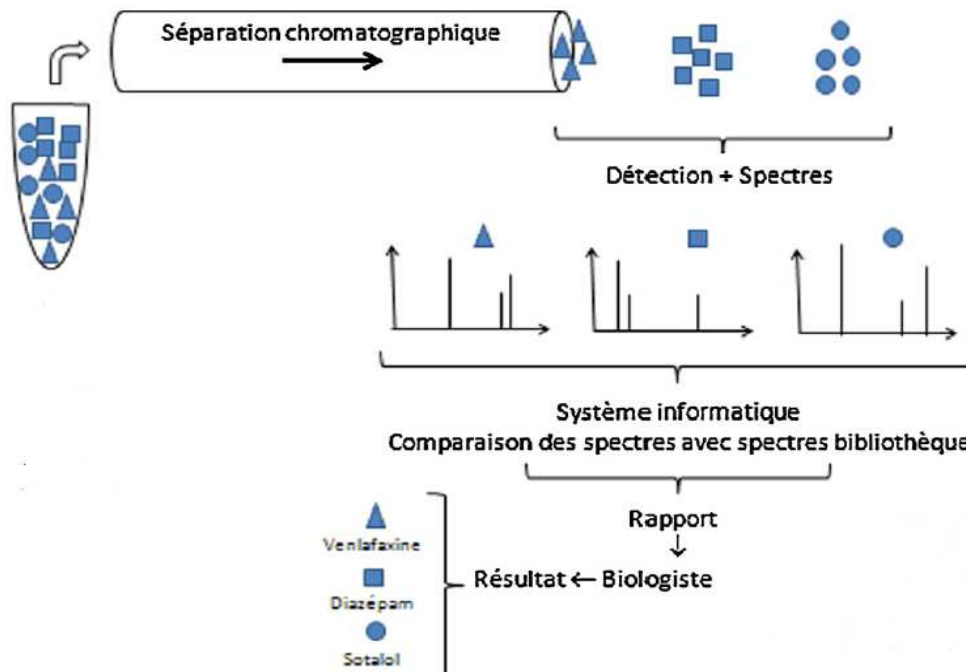


Figure 1 : Schéma général d'un criblage toxicologique par spectrométrie de masse

2. Recommandations de prescription des criblages toxicologiques

La prise en charge d'une intoxication est essentiellement symptomatique et repose avant tout sur la clinique. La majorité des toxiques rencontrés lors d'intoxications médicamenteuses volontaires (IMV) appartient à la classe des psychotropes (13). Lorsque les produits ingérés sont connus, le toxidrome observé correspond généralement à celui qui est attendu (5). Quelle est alors la place de l'analyse toxicologique ?

L'analyse toxicologique permet classiquement de :

- confirmer une intoxication suspectée
- exclure une hypothèse toxique ou poser un diagnostic différentiel d'intoxication
- évaluer la gravité d'une intoxication
- surveiller une thérapeutique et en mesurer l'efficacité.

Plusieurs groupes de travaux multidisciplinaires ont proposé des recommandations sur la prise en charge des patients intoxiqués et la place de l'analyse toxicologique dans cette dernière.

Un groupe d'experts, représentant la Société Française de Toxicologie Analytique (SFTA), la Société Française de Biologie Clinique (SFBC) et la Société de Toxicologie Clinique (STC), aidé par la Société Française de Médecine d'Urgence (SFMU), la Société de Réanimation de la Langue Française (SRLF) et le Groupement des Enseignants de la Toxicologie (GATOX), a élaboré des recommandations de bonnes pratiques pour la prescription, la réalisation et l'interprétation des examens de biologie médicale dans le cadre des intoxications graves (7). Il a évalué la pertinence des analyses toxicologiques pour les toxiques les plus rencontrés en pratique courante et définit une hiérarchisation des délais de réponse en fonction de l'impact des résultats sur la décision clinique. Il en conclut que le criblage toxicologique doit être mis en œuvre uniquement pour les patients dont l'évolution clinique et les examens complémentaires sont incompatibles avec l'anamnèse ou le toxidrome initial. Ceci est d'autant plus vrai s'il existe une défaillance cardio-circulatoire, un coma inexplicé ou des convulsions.

P. Nisse propose un schéma décisionnel devant une suspicion d'intoxication aux urgences (figure 2) (6).

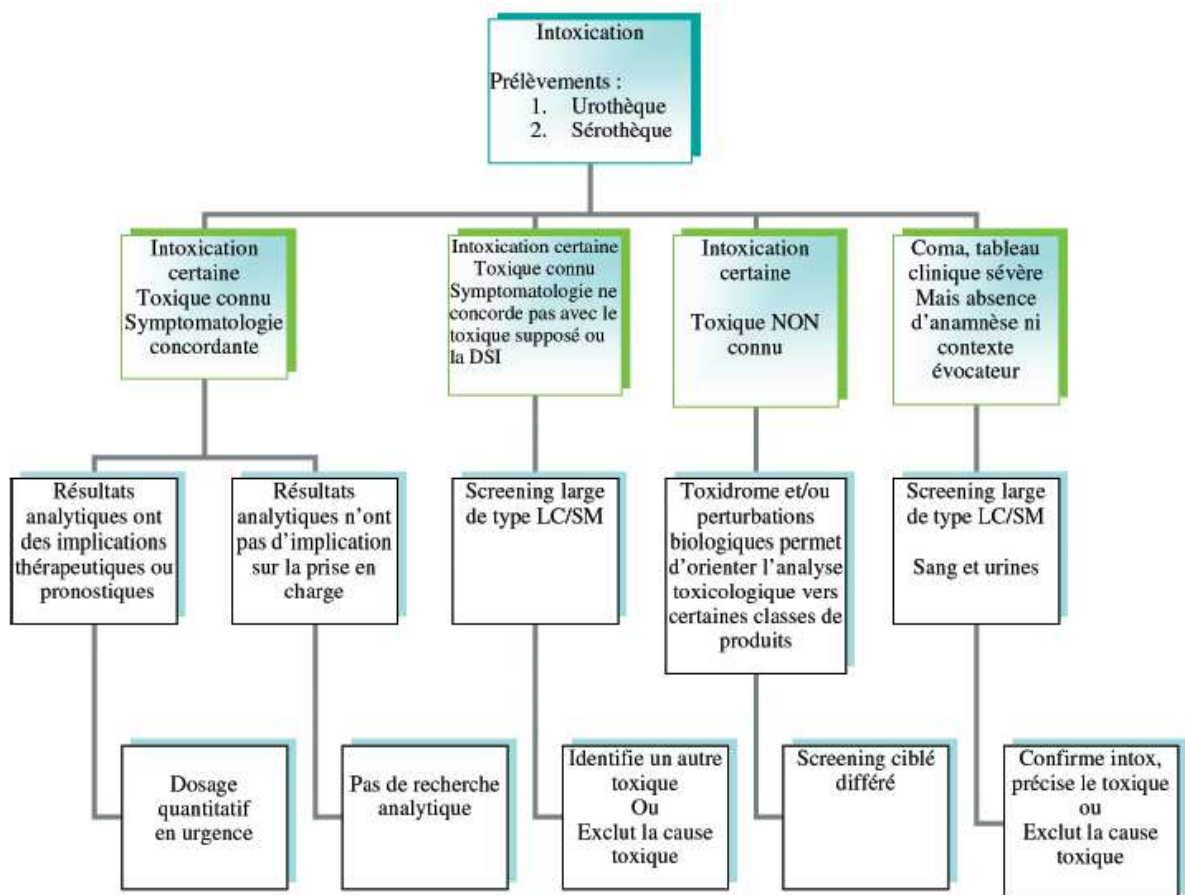


Figure 2 : Schéma décisionnel aux urgences devant une suspicion d'intoxication [6]

LC/SM : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Les criblages toxicologiques restent indiqués lorsque la symptomatologie clinique est discordante avec le toxique suspecté ou lors d'un tableau clinique sévère (coma, troubles neurologiques graves). Ainsi, ils permettent de confirmer l'intoxication, d'identifier d'autres toxiques que ceux suspectés ou d'exclure la cause toxique.

Auparavant, la conférence d'experts de la Société de Réanimation de la Langue Française (SRLF) se rapportant aux intoxications graves par les médicaments et substances illicites admises en réanimation, a conclu en 2006 que les toxiques pour lesquels le dosage sanguin doit impérativement être réalisé sont l'acide valproïque, la carbamazépine, le fer, la digoxine, le lithium, le paracétamol, le phénobarbital et la théophylline(5). La recherche large de toxiques dans le sang ou les urines par méthode chromatographique devant être réservée aux patients

présentant des troubles neurologiques graves ou un coma inexpliqué, en l'absence d'orientation précise.

La recherche systématique en urgence des toxiques n'a plus sa place lors de la prise en charge de patients intoxiqués. La pertinence des prescriptions des criblages toxicologiques n'est pas avérée à ce jour. Les études portant sur la précision diagnostique apportée par les criblages toxicologiques sont rares. La modification de la prise en charge thérapeutique est évaluée entre 0 % et 5 % selon les études (8)(9)(10)(11)(14). Cependant, celles-ci datent pour la plupart de plusieurs décennies et une réévaluation de l'impact des criblages toxicologiques est grandement recommandée (7).

3. Techniques de criblage toxicologique disponibles au laboratoire

Le laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie du CHU de Grenoble dispose actuellement de trois techniques de criblage toxicologique : CLHP-BD, CPG-SM et CLHP-SM/SM.

3.1. CLHP-BD

L'utilisation de la CLHP pour la réalisation de criblage toxicologique a été suggérée depuis les années 70 (15). Les détecteurs à barrette de diodes sont arrivés dans les années 80 et de nombreuses applications ont été développées. Ils permettent l'identification de composés par la détection du spectre d'absorption dans l'ultra-violet (UV), en général sur une gamme de longueurs d'ondes variant de 200 à 400 nm.

L'identification du composé est basée sur deux critères :

- comparaison du spectre d'absorption UV avec un spectre de référence
- comparaison du temps de rétention (TR) observé (c'est-à-dire celui retrouvé pendant l'acquisition) avec le TR théorique (enregistré dans la bibliothèque)

Au laboratoire, les analyses en CLHP-BD sont effectuées avec un chromatographe Shimadzu de la série Prominence LC-20A associé un détecteur UV à barrette de diodes. Les injections automatiques (50 μ L) sont réalisées sur une colonne thermostatée à 30°C Macherey Nagel Nucleodur[®] C₁₈ (150 mm de longueur ; 4,6 mm de diamètre interne ; 5 μ m de diamètre de particules). La chromatographie est réalisée au moyen d'un gradient d'élution en mode de polarité de phase inversée à un débit de 1,3 mL/min. Le programme du gradient d'élution réalisé avec les phases mobiles A : tampon phosphate 0,010 M, pH 2,6 et B : mélange acétonitrile/eau 90/10 (v/v) est le suivant : 85 % de A pendant 2 min ; passage de 85 % à 25 % de A en 40 min ; passage de 25 % à 10 % de A en 6 min ; retour à 85 % de A en 1 min ; équilibre à 85 % de A pendant 10 min.

La préparation d'échantillon est basée sur une technique d'extraction liquide/liquide. L'extraction est réalisée par un mélange hexane/dichlorométhane dans les proportions 4/3 (v/v). Quatre millilitre de ce mélange sont mélangés à 1 mL de plasma préalablement ramené à un pH de 9,2 par l'ajout de 2 mL de tampon carbonate. Après agitation et centrifugation, la phase organique est évaporée. Le résidu sec est repris par un mélange de phase A et B dans les proportions 70/30.

Les étalons internes utilisés sont le loflazépate d'éthyl et la glafénine. Le temps moyen d'extraction est de 45 minutes. Celui de l'analyse est de 60 minutes. La bibliothèque de spectres

de référence utilisée a été développée par le service de Toxicologie et Pharmacologie de CHU de Limoges puis transposée au sein de notre laboratoire.

3.1.1. Avantages

Les deux principaux avantages de cette technique reposent sur la maîtrise de cet outil au sein du laboratoire et sa facilité d'utilisation. En effet, le personnel technique et les biologistes ont une très grande expérience de ce type de criblage toxicologique. De plus, la bibliothèque de spectres utilisée contient plus de 850 références. Cette technique est très sensible pour la classe des psychotropes au sens large (benzodiazépines, antidépresseurs, neuroleptiques...). Enfin une quantification est réalisable pour 98 composés.

3.1.2. Limites

Plusieurs limites subsistent pour cette méthode de recherche large de toxiques. La technique d'extraction en milieu basique est sélective. Certains composés comme la metformine, l'acébutolol ou le labétalol ne sont pas extraits. En ce qui concerne le détecteur à barrette de diodes, il existe des variabilités inter-systèmes. Ce problème de fidélité inter-systèmes nécessite que chaque fabricant développe sa propre bibliothèque de référence. La technique par CLHP-BD n'est pas universelle car certaines molécules n'absorbent que peu ou pas dans l'UV (exemple du baclofène (16)). Certains composés sont caractérisés par le même spectre UV et TR : ils sont donc difficilement différenciables entre eux (venlafaxine et bisoprolol par exemple) ou avec leurs métabolites (comme la cétirizine) (17). Enfin, il subsiste des problèmes de co-élution : deux composés présentant des TR très proches et générant des spectres d'absorption superposés rendent l'identification impossible (exemple du diazépam et de la clomipramine sur notre système).

3.2. CPG-SM

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse date également des années 70. Cette technique est actuellement considérée comme une méthode de référence pour ce type d'application. Cette méthode, après vaporisation du mélange à analyser, permet d'identifier des composés par la comparaison d'un spectre de masse obtenu à un spectre de masse de référence et d'un TR observé à un TR théorique.

Au laboratoire, cette technique est effectuée avec un chromatographe 6890N Network GC System (Agilent Technologies) couplé à un spectromètre de masse 5975 inert XL Mass Selective Detector, équipé d'un passeur d'échantillons liquides 7683 Series Autosampler. Les injections automatiques (1 μ L) sont réalisées en mode splitless pulsé, à une température de 250°C, sur une colonne capillaire de silice fondue : Agilent DB-5ms (30 m de longueur ; 0,25 mm de diamètre interne ; 0,25 μ m d'épaisseur de film). Le gaz vecteur utilisé est l'hélium, à un débit constant de 1 mL/min. Le programme de température du four est le suivant : 100°C pendant 1 min, puis une programmation à 20°C/min jusqu'à 300°C et un plateau de 11 min à 300°C. La détection est réalisée en impact électronique à 70 eV, en mode SCAN avec un balayage des masses de 40 à 600 unités de masse atomique (uma). Les températures de l'interface, de la source et du quadripôle sont respectivement de 315, 230 et 150°C.

La préparation des échantillons est réalisée en Toxitube[®] A Variant (extraction liquide/liquide) (18). La prise d'essai est de 1 mL. La phase organique est récupérée après agitation (10 min) et centrifugation (10 min 1300 g), puis évaporée. L'extrait sec est repris par de l'acétate d'éthyle. La moitié de cette solution est injectée directement, tandis que l'autre moitié est dérivée par du BSTFA 1 % TMCS avant injection.

Le temps moyen de préparation des échantillons est d'environ 2 heures. Celui de l'acquisition est de 26 minutes.

Pour l'identification des composés, nous disposons de 3 bibliothèques commerciales de référence totalisant plus de 200 000 spectres (PMW, NIST et SWGDRUG). Une bibliothèque supplémentaire, développée au laboratoire et composée de 440 composés, permet de coupler spectres de masse et TR afin d'obtenir une identification plus fiable et plus rapide (18)(19)(20) .

3.2.1. Avantages

Cette technique a été très largement développée par Maurer et peut être considérée comme une technique de référence(21)(22)(23)(24). De par l'universalité des spectres obtenus par l'ionisation en mode impact électronique (IE), de nombreuses bibliothèques sont disponibles. Le laboratoire dispose également de sa propre bibliothèque couplant spectres de masse et TR, ce qui augmente nettement la fiabilité de l'identification.

3.2.2. Limites

Cette technique présente deux inconvénients majeurs : elle nécessite d'avoir des molécules volatiles et les composés thermosensibles ne sont pas analysables car ils se dégradent dans l'injecteur, dont la température est élevée. Pour augmenter la volatilité de certaines molécules, celles-ci peuvent être dérivées (méthylation, silylation, acylation...) afin d'abaisser leur point d'ébullition. L'étape de préparation est donc particulièrement importante dans cette méthode de criblage toxicologique. Le temps de préparation est relativement long et nécessite un personnel spécialisé.

4. Criblage toxicologique par CLHP-SM/SM

Au cours de ces dernières années, la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse ou la spectrométrie de masse en tandem s'est considérablement développée et notamment dans les domaines de la toxicologie clinique et médico-légale (23). Elle a permis de combler les manques laissés par les techniques de CLHP-BD et CPG-SM pour les composés hydrophiles, thermolabiles et non volatiles. Après un bref rappel sur la spectrométrie de masse, nous développerons plus particulièrement la technique CLHP-SM/SM que nous voulons valider.

4.1. Rappels de spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est l'étude de la matière à travers la formation d'ions caractérisés par le rapport de leur masse sur leur nombre de charges, noté m/z (25)(26). La première étape consiste donc à produire des ions en phase gazeuse. Chaque ion formé se fragmente ensuite en ions primaires qui peuvent à leur tour se fragmenter en ions secondaires et ainsi de suite. Les ions obtenus sont séparés d'après leur m/z et détectés en fonction de leur nombre. On obtient ainsi un spectre de masse de la molécule mère (figure 3). Les ions fils fournissent des informations sur la nature et la structure de la molécule qui les a produits.

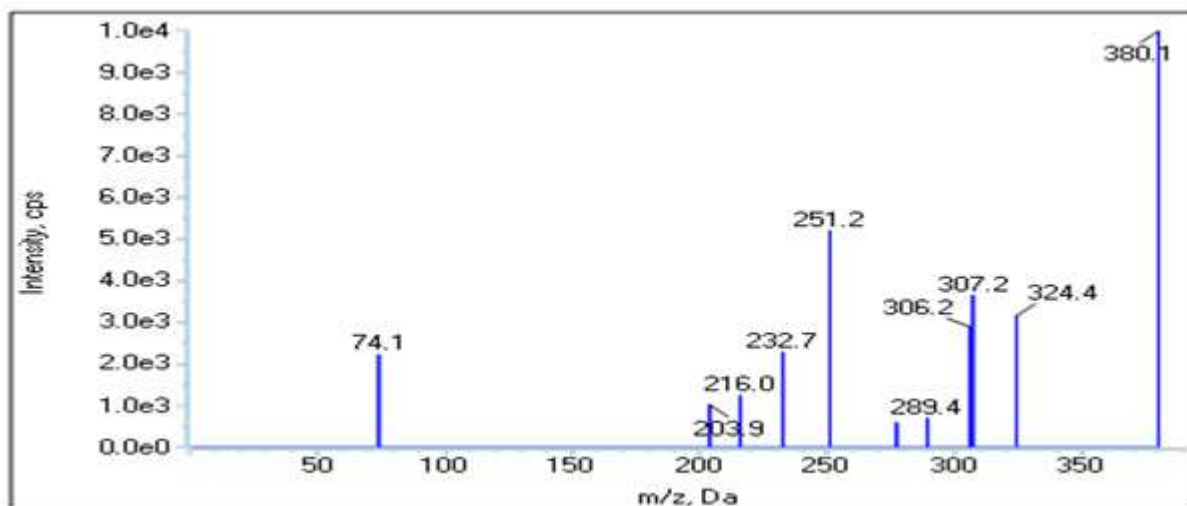


Figure 3 : Spectre de masse du celirolol de masse moléculaire = 379,4 g.mol⁻¹
 cps : coup par seconde ; m/z : rapport masse sur charge ; Da : dalton

De manière générale, un spectromètre de masse se décline selon la figure 4 :

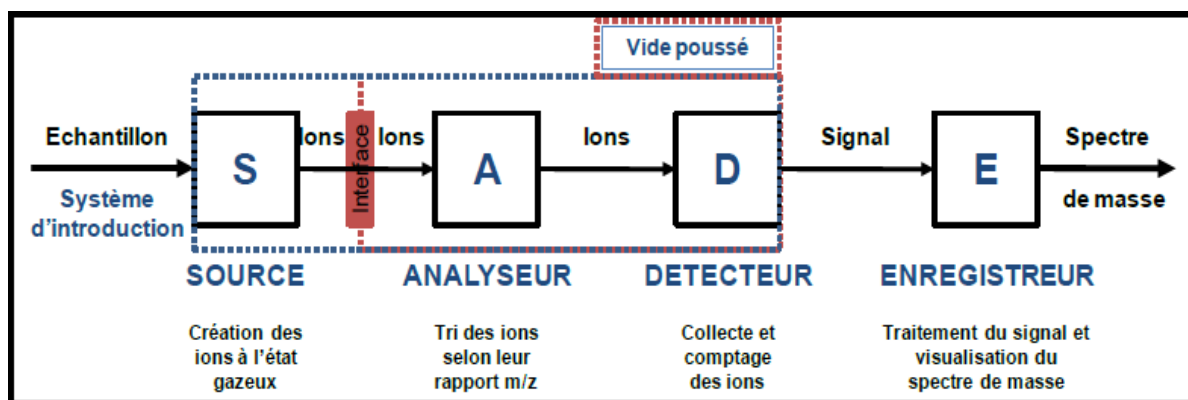


Figure 4 : Schéma général d'un spectromètre de masse.

4.1.1. Introduction de l'échantillon

La première étape consiste à amener à partir d'un système d'introduction, un échantillon à une source d'ionisation afin qu'il puisse y être ionisé. Cette introduction dépendra de l'état physique de l'échantillon (solide, liquide, gazeux) et pourra être réalisée par des systèmes séparatifs comme la CLHP ou la CPG.

4.1.2. Ionisation

La deuxième étape consiste à ioniser et à vaporiser les molécules. Elle se déroule dans la source d'ionisation. Il en existe plusieurs types : impact électronique, ionisation chimique, électrospray (ESI), bombardement d'ions ou d'atomes rapides (FAB), désorption-ionisation laser par matrice assistée (MALDI). Ils sont utilisés en fonction du résultat recherché et des molécules analysées.

La technique d'ionisation principalement employée en CLHP-SM pour une recherche large de toxiques est l'ionisation par électrospray (figure 5). Cette dernière est produite par application à pression atmosphérique, d'un fort champ électrique (haute tension de plusieurs kilovolts) sur un liquide (phase mobile) traversant un tube capillaire avec un faible débit.

Ce champ provoque une ionisation des composés et une accumulation de charges à la surface du liquide, situé à l'extrémité du capillaire, qui va se rompre pour former des gouttelettes fortement chargées contenant les composés ionisés à analyser (figure 6). Les ions sont ensuite désolvatés, et passent en phase gazeuse.

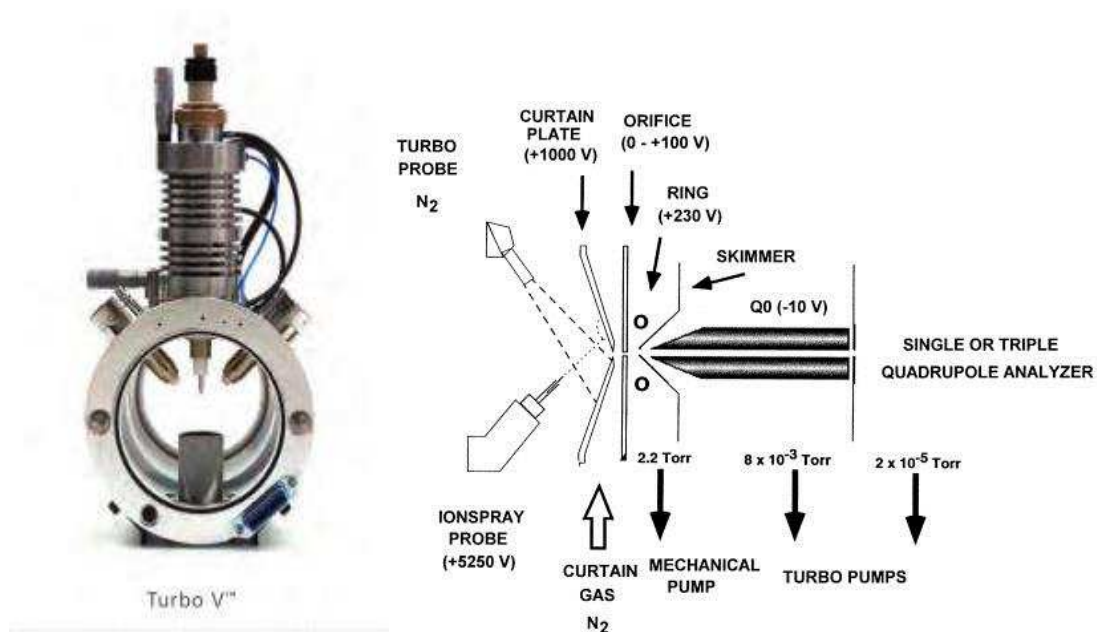


Figure 5 : Source électrospray turboV® [23]

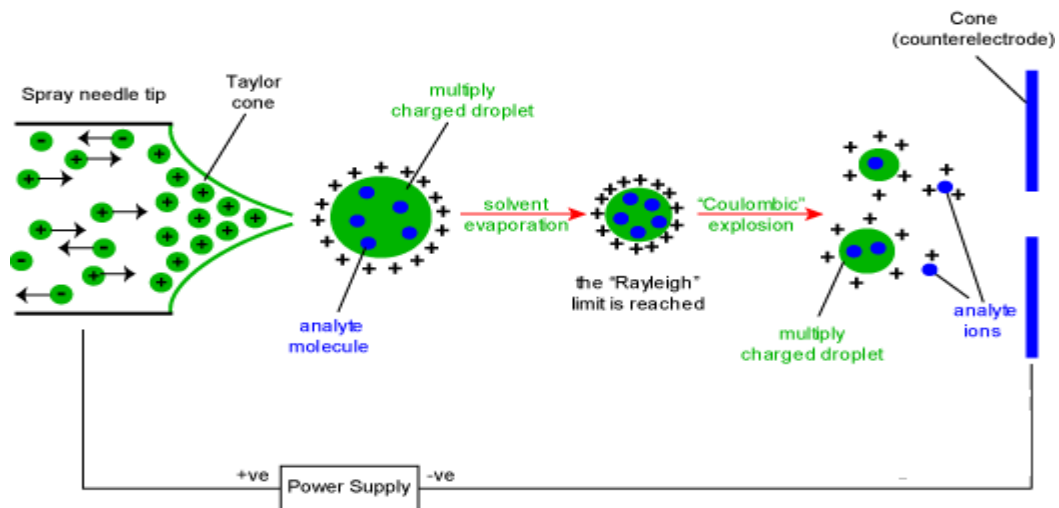


Figure 6 : Principe d'ionisation par électrospray

L'ionisation par électrospray est dite « ionisation douce » car elle conserve les composés sans les fragmenter. On obtient majoritairement des adduits protons dits « ions moléculaires » du type $[m+H]^+$ dans le cas de l'application d'une tension positive ou du type $[m-H]^-$ dans le cas de l'application d'une tension négative.

4.1.3. Sélection des ions

La troisième étape consiste à trier les différents ions produits, et d'éventuellement fragmenter les ions par collision. Les ions moléculaires et les ions fragments, caractéristiques d'une molécule, sont séparés en fonction de leur m/z par application d'un champ magnétique et/ou électronique. Les différents types d'analyseurs utilisés lors de cette étape sont de type quadripolaire (figure 7), piège à ions (trappe ionique ou trappe ionique linéaire (LIT)), à temps de vol (TOF), Orbitrap[®], à secteur magnétique ou encore à transformée de Fourier.

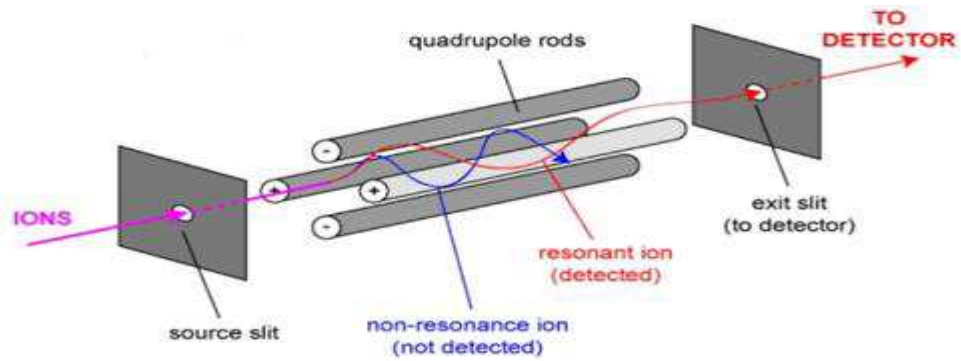


Figure 7 : Analyseur quadripolaire

4.1.4.Détection des ions

Les détecteurs sont basés sur la détection d'un courant d'ion (cylindre faraday) ou sur la génération d'un courant électronique suite à la collision de l'ion avec une surface (multiplicateur d'électrons ou de photons).

4.2. Spectrométrie de masse en tandem

Lorsque les analyseurs précités sont placés en série dans un même appareil, on parle de spectrométrie de masse en tandem (SM/SM). Cette « superposition » d'analyseurs autorise des modes supplémentaires de balayage des ions. Elle permet de décupler la spécificité des analyses et d'enrichir l'information sur les composés étudiés. La SM/SM désigne une spectrométrie de masse où un premier analyseur sert à isoler un ion parent qui subit ensuite une fragmentation donnant des ions fils et fragments neutres. Les ions fils sont ensuite analysés dans un deuxième analyseur (26)(25).

Les analyseurs les plus largement répandus sont les analyseurs quadripolaires. La configuration QqQ indique un instrument avec trois quadripôles dont le second est une cellule de collision (figure 8).

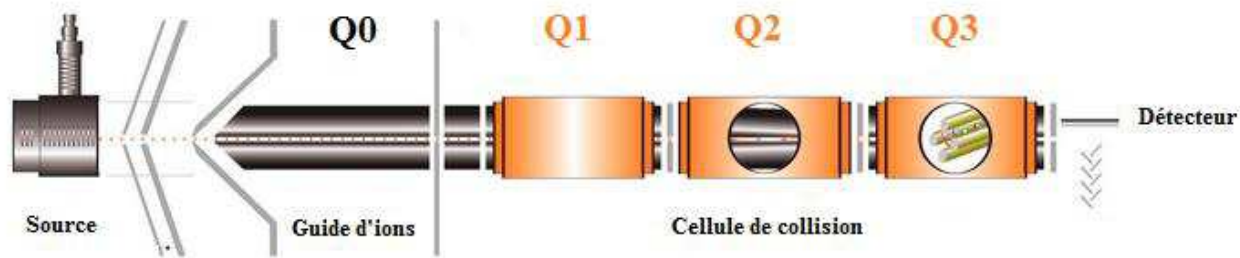


Figure 8 : Schéma représentatif du spectromètre de masse ABSciex 3200 QTRAP de configuration QqLIT.

Les ions sont amenés au premier analyseur par un quadripôle servant de guide d'ion (Q_0). Ensuite, les ions moléculaires sont sélectionnés et accélérés dans le premier quadripôle (Q_1), entraînés dans la cellule de collision (Q_2) dans laquelle ils se fragmentent. Les ions fragments sont alors sélectionnés et accélérés dans le troisième quadripôle (Q_3).

La cellule de collision est un quadripôle cloisonné et parcouru par un gaz neutre (hélium, argon ou azote). La « percussion » des ions sur le gaz provoque une dissociation induite par collision (CID). Il s'agit d'une collision à faible énergie de l'ordre de 1 à 100 électronvolts (eV). Le concours de cette collision avec une énergie appliquée dans Q_2 entraîne une rupture des liaisons covalentes des ions et génère des fragments neutres et chargés.

Dans notre cas, le deuxième analyseur (Q_3) est une trappe ionique linéaire (LIT). Il s'agit d'un analyseur hybride qui combine les fonctions d'un quadripôle et d'une trappe ionique. La LIT permet d'augmenter la sensibilité de l'appareil et autorise des modes de balayage des masses supplémentaires. La configuration SM/SM est alors du type QqLIT.

La spectrométrie de masse en tandem offre la possibilité d'accéder à de multiples informations qualitatives et quantitatives dont la nature va dépendre des instruments et des modes d'acquisitions utilisés.

4.3. Les différents modes d'acquisition de la SM/SM

Nous allons détailler ici les différents modes de balayage offerts par cette configuration ainsi que les modes supplémentaires offerts par des systèmes dont l'analyseur Q_3 est une trappe d'ions linéaire (configuration QqLIT utilisée au laboratoire pour le développement de ce criblage toxicologique).

4.3.1. Mode Full Scan

Ces deux expériences de spectrométrie simple sont disponibles sur des analyseurs de type simple quadripôle et peuvent être effectuées avec les quadripôles Q_1 et Q_3 .

Le mode Full Scan (figure 9) permet d'analyser l'ensemble des ions produits dans la source appartenant à une gamme de rapport m/z déterminée en les balayant successivement. Le mode Single Ion Monitoring (SIM) permet quant à lui de ne filtrer qu'un seul rapport m/z sur un quadripôle.



Figure 9 : Mode d'acquisition Full Scan (à gauche) et SIM (à droite)

Dans ces deux cas, un seul quadripôle est utilisé en tant qu'analyseur, les autres fonctionnent en mode guide d'ions (non sélectifs).

4.3.2. Product Ion Scan (PI)

Ce mode de balayage consiste à sélectionner un ion d'un rapport m/z choisi dans le premier quadripôle, puis après fragmentation dans la cellule de collision, les ions fragments sont analysés dans le troisième quadripôle en mode full scan (figure 10).

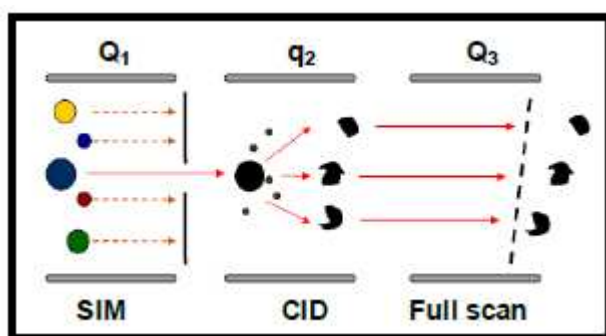


Figure 10 : Représentation d'un mode de balayage d'ion produit

4.3.3. Enhanced Product Ion scan (EPI)

Ce mode d'acquisition est basé sur le même principe que le PI, mais nécessite une configuration QqLIT (figure 11).

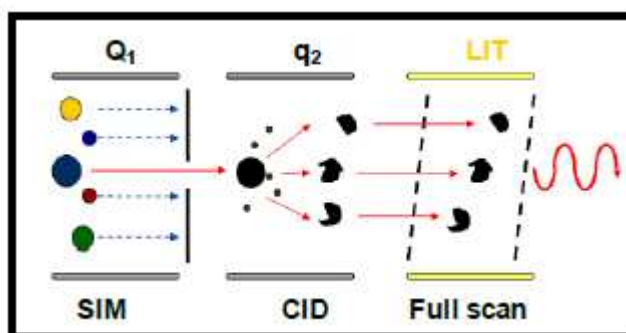


Figure 11 : Représentation d'un mode de balayage EPI

L'utilisation de la LIT permet d'accumuler les ions fragments dans la trappe ionique avant de les libérer dans le détecteur. La sensibilité s'en trouve alors accrue. La LIT permet également, de par ses fonctions de « stockage » des ions, de récolter des ions fragments générés à des niveaux d'énergies de collisions différents. Comme nous le verrons ultérieurement, cette fonction est fondamentale car elle peut générer des spectres de masse plus riches en informations et à l'origine de la constitution de bibliothèques de spectres.

4.3.4. Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Ce mode de balayage fait fonctionner les quadripôles Q_1 et Q_3 en mode SIM. Un ion est sélectionné dans le premier quadripôle, fragmenté dans la cellule de collision, puis son ion fils le plus caractéristique (spécifique et intense) est sélectionné dans le troisième quadripôle (figure 12).

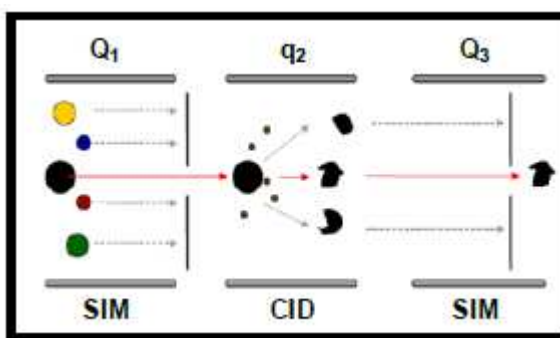


Figure 12 : Représentation d'un mode de balayage MRM

Ce mode de balayage est hautement spécifique car il élimine par deux fois tous les ions autres que ceux d'intérêts.

La relation entre un ion précurseur et un ion produit ($m/z_{\text{ion parent}} / m/z_{\text{ion fils}}$) est communément appelée « transition ionique » ou « transition MRM ». Il est possible de suivre un

nombre important de transitions au cours d'une même analyse. Dans les limites de vitesse d'acquisition (vitesse de scan) de l'appareil, on procède alors séquentiellement à des sélections d'ions parents en Q₁, leurs fragmentations en Q₂ puis la sélection d'ion fils en Q₃. Ce mode de balayage permet ainsi de suivre les transitions MRM de plusieurs centaines de composés au sein d'une même analyse. Pour chaque composé, des paramètres qui leurs sont propres sont optimisés individuellement afin de maximiser le signal et donc la sensibilité.

Ces conditions de détection optimale correspondent aux potentiels appliqués sur les différentes lentilles du spectromètre de masse et à l'énergie de collision nécessaire pour obtenir les ions fragments.

4.4. L'acquisition sous le logiciel Analyst® 1.5.2

Grâce à la trappe ionique, le Multi-Target-Screening (MTS) mis en place au laboratoire associe plusieurs modes de balayage. Dans un premier temps, le Scheduled MRM cible la recherche sur une banque de 700 transitions ioniques. Dans un econd temps et après un tri de l'information (Information Dependant Acquisition ou IDA) le balayage EPI génère trois spectres de masse obtenus à 3 énergies de collision différentes.

4.4.1.Scheduled MRM

La Scheduled MRM, repose sur le principe de la MRM en ajoutant un critère « temps » dans le balayage d'une banque de transitions MRM. La transition est uniquement recherchée dans une fenêtre encadrant le TR du composé (critère Retention Time Window : RTW). Par exemple, pour une RTW de 120 secondes, la transition ionique du céliprolol, dont le TR est de 4,50 min, sera recherchée de 3,50 min à 5,50 min. Cette méthode d'analyse permet de diminuer

le nombre de transitions balayées et concurrentes à un instant t et d'augmenter la sensibilité de la méthode. Cette nouvelle approche, basée sur une amélioration informatique, a permis à Weinmann et al. d'augmenter la banque de transitions MRM de 301 à 700 composés toxiques (27)(28).

4.4.2. Critères IDA

Après chaque scan MRM, les critères de tri de l'information sont basés sur trois points (figure 13) :

- l'élimination des transitions ioniques dont l'intensité mesurée est inférieure à un seuil (bruit de fond) défini : 1000 coups par seconde (cps)
- le déclenchement d'un balayage EPI uniquement pour les deux transitions les plus intenses
- l'exclusion durant 15 secondes d'une transition lorsque celle-ci est détectée après plus de quatre scans consécutifs

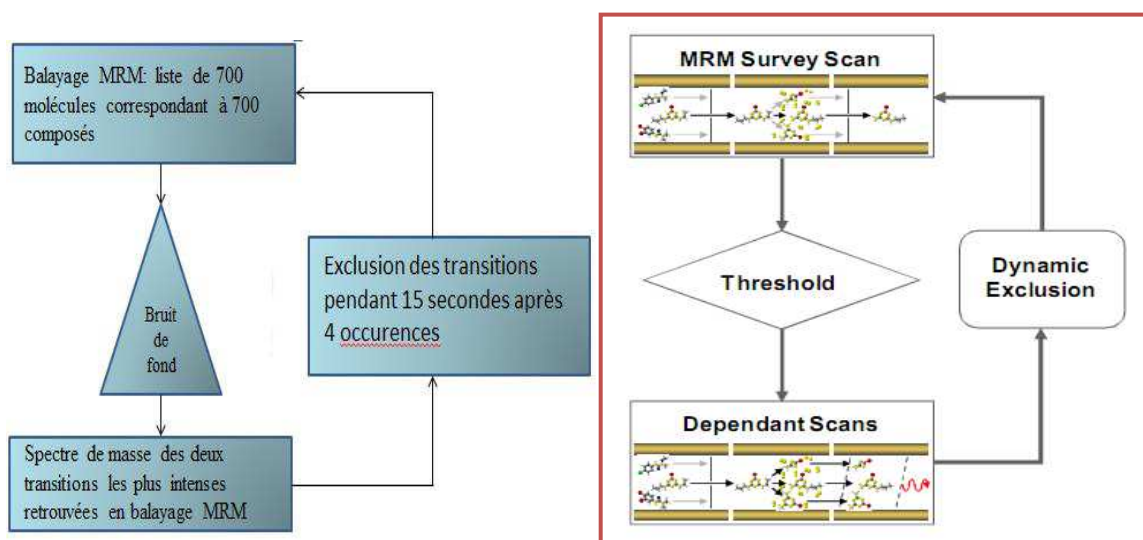


Figure 13 : Principe du screening MTS : balayage MRM-IDA-EPI
(Multiple Reaction Monitoring-Information Dependent Acquisition-Enhanced Product Ion scan)

4.4.3.EPI

Le mode EPI est réalisé à trois énergies de collision différentes (35 +/- 15 eV). Les différents spectres de masse obtenus à ces énergies de collision sont superposés pour être comparés à un spectre de référence (figure 14).

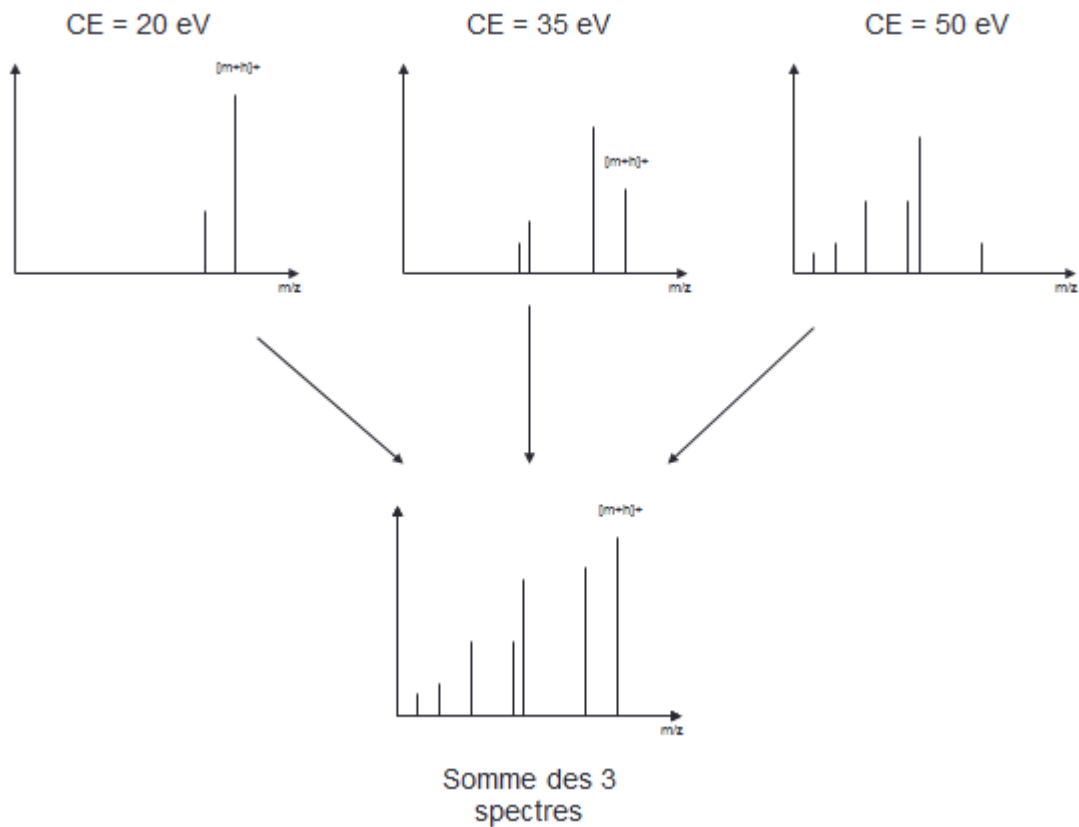


Figure 14 : Assemblage des spectres de masse aux énergies de collision 20 eV, 35 eV et 50 eV

4.4.4.Exemple d'une acquisition MRM-IDA-EPI

L'analyse débute par le balayage des 700 transitions MRM contenues dans la banque (banque fournie par ABSciex). Lorsque le seuil de sensibilité est dépassé, une acquisition est réalisée. La figure 15 présente le courant ionique total d'un échantillon.

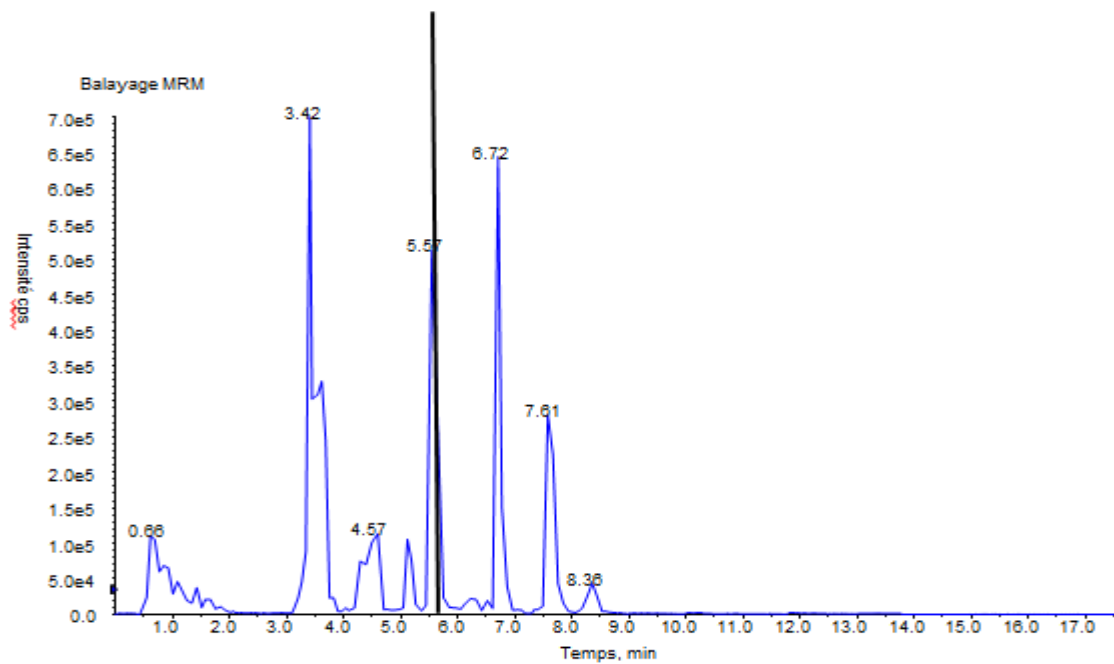


Figure 15 : Courant ionique total d'un échantillon et sélection des EPI au temps $t = 5,6$ min

A chaque scan, seules les deux transitions les plus intenses qui répondent aux critères IDA déclenchent une fragmentation à 3 niveaux d'énergie de collision et donc un balayage en mode EPI (figure16).

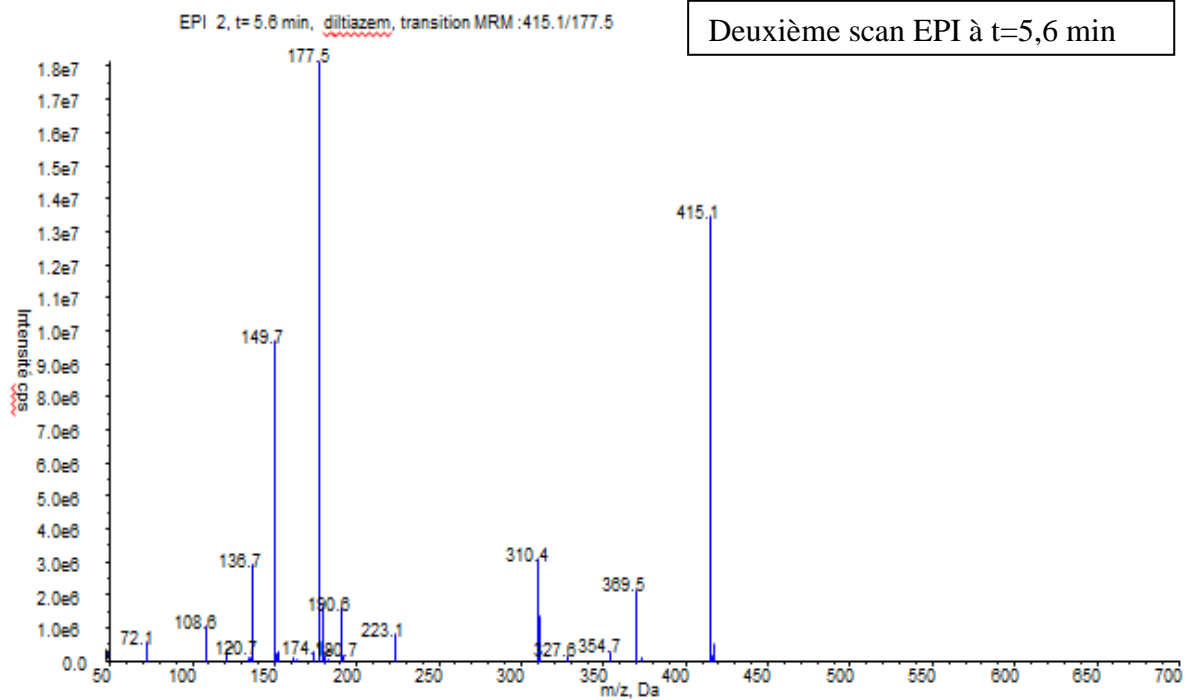
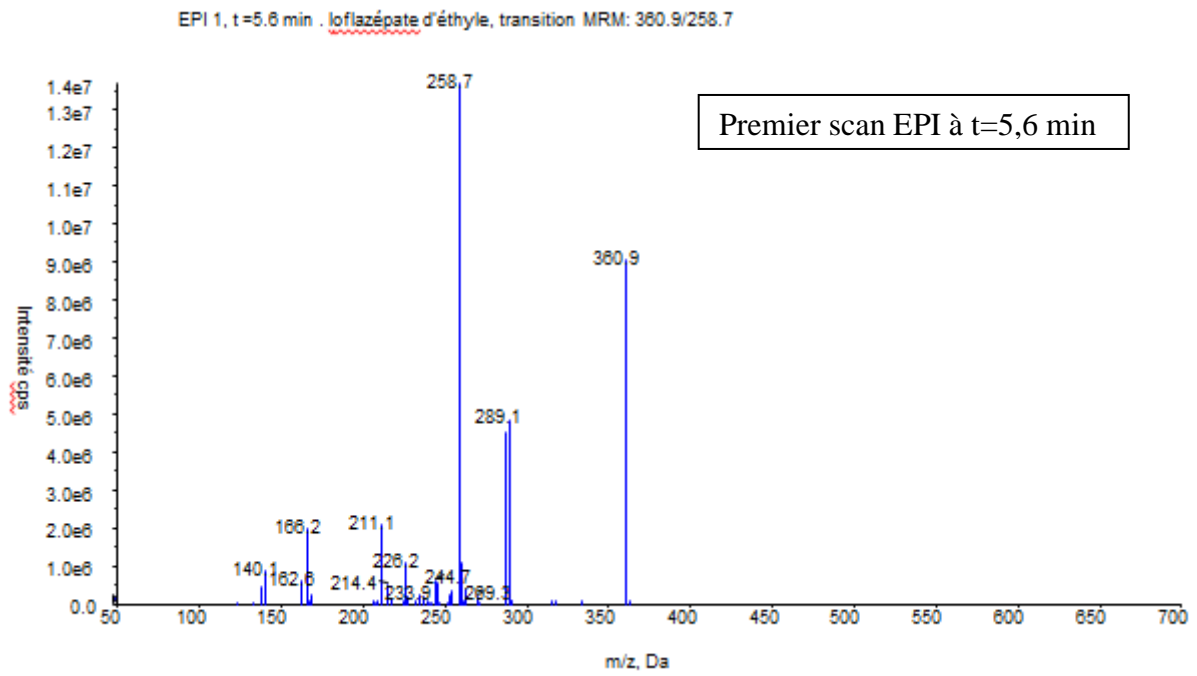


Figure 16 : EPI des deux transitions les plus intenses retrouvées au temps de rétention t = 5,5 min

Un algorithme compare alors les spectres de masse acquis aux spectres de masse disponibles dans la bibliothèque de référence composée de 1250 spectres (Figure 17) (29)(30).

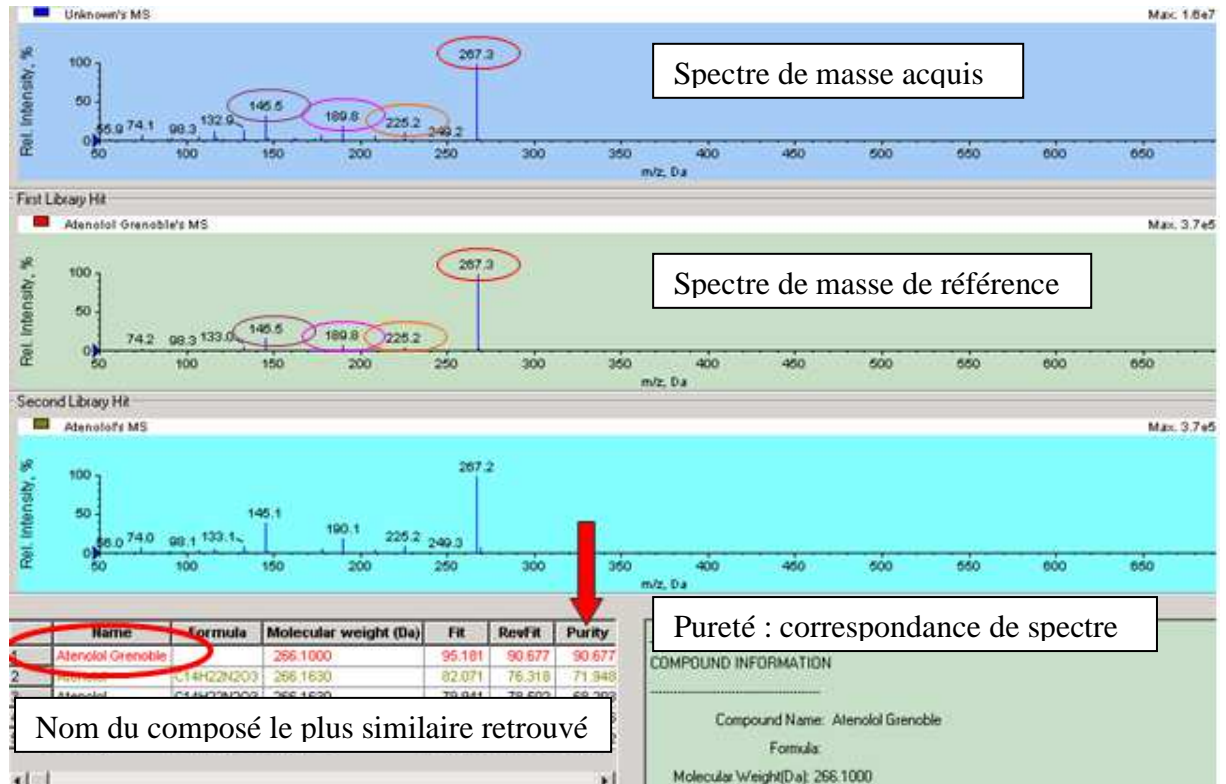


Figure 17 : Recherche d'une correspondance entre un spectre acquis et un spectre de référence présent dans la bibliothèque.

La comparaison des spectres par le logiciel est basée sur la présence et les intensités relatives des ions. La recherche débouche sur une correspondance :

- entre le spectre acquis et le spectre de référence (appelé Fit)
- entre le spectre de référence et le spectre acquis (appelé reverse Fit)

La pureté finale est calculée à partir de ces valeurs. L'identification d'un composé est jugée fiable lorsque la pureté est supérieure à 70 %.

4.4.5. Rapport automatique sous le logiciel Cliquid® 3.2

Le logiciel de traitement des données Cliquid®3.2 permet l'émission d'un rapport automatique de comparaison de spectres, facilitant la lecture et permettant un gain de temps considérable. Ce rapport nous permet d'accéder à différentes informations : chromatogramme (figure 18), résumé des molécules identifiées et détails de chaque composé identifié (figure 19).

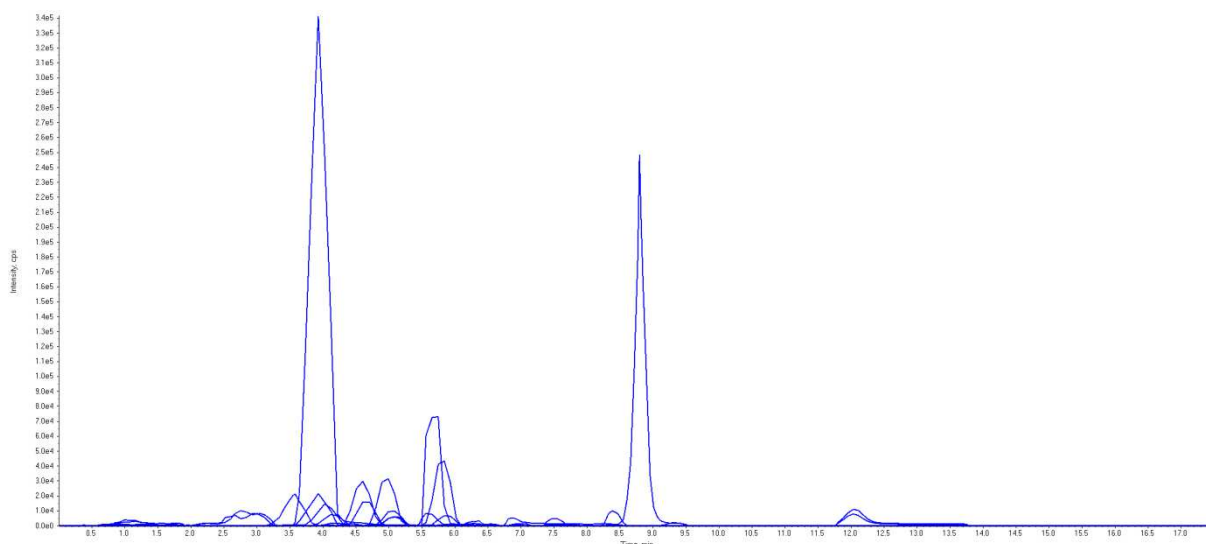


Figure 18 : Chromatogramme extrait sous Cliquid® 3.2

RT (min)	Exp RT (min)	Nom Composé	Surface pic	Purity (%)	Fit (%)	Rev Fit (%)
0.93	0.93	Theophylline	2.73e+004	52.5	52.5	100.0
1.15	1.04	Atenoiol Grenoble	9.27e+004	93.1	93.1	100.0
1.67	1.58	Caffeine	5.13e+004	56.0	56.0	100.0
1.03	1.68	Sotalol Grenoble 2	1.29e+005	86.2	86.2	94.4
2.96	2.76	Nadolol	3.09e+005	90.9	90.9	98.6

Figure 19 : Exemple d'un résumé des composés détectés sous Cliquid® 3.2 lors d'une acquisition

L'identification d'un composé est alors basée sur trois critères de correspondance : la transition MRM (Q_1/Q_3), le TR et la correspondance du spectre acquis avec un spectre de référence (figure 20).

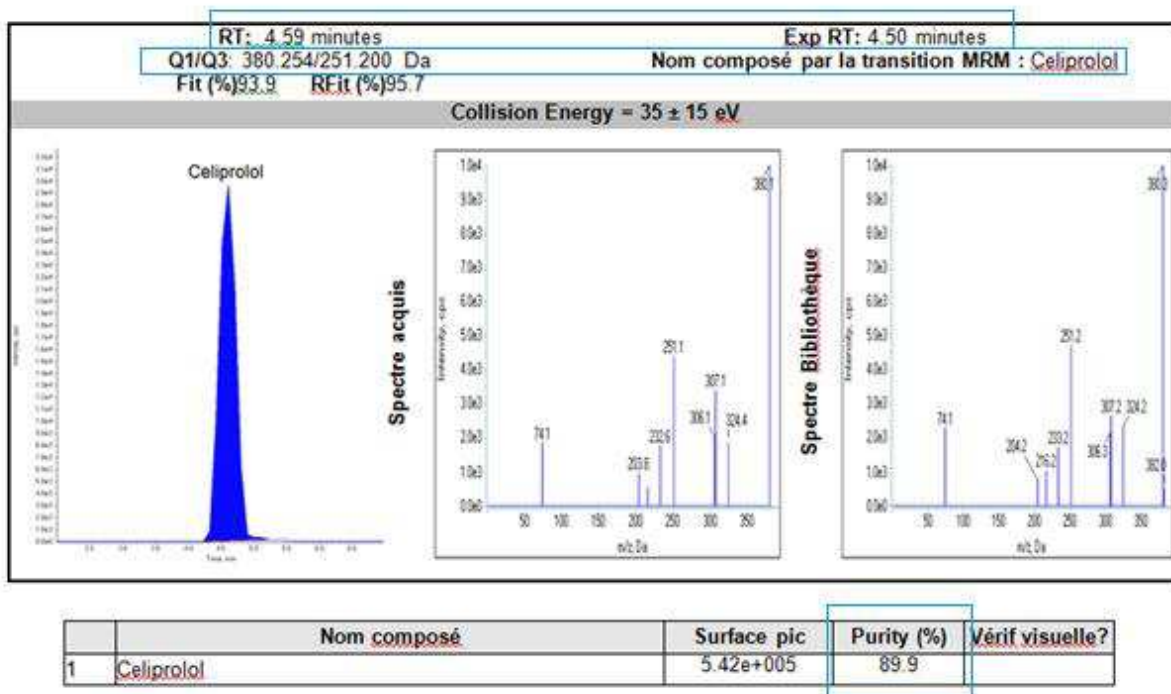


Figure 20 : Comparaison du spectre du céliprolol acquis au spectre de référence de la bibliothèque

5. Validation d'une méthode de criblage toxicologique.

Le criblage toxicologique fait partie des méthodes d'analyses qualitatives de biologie médicale. Pour la méthode que nous voulons utiliser au laboratoire, il s'agit d'une méthode de portée B, c'est-à-dire que l'on modifie une méthode validée (27) pour l'ajuster aux besoins du laboratoire. En se référant au « guide technique d'accréditation, de vérification/validation des méthodes en biologie médicale » (SH GTA 04) (12), ainsi qu'aux recommandations de la Société Française de Toxicologie Analytique (31), les différents paramètres que nous devons vérifier

et/ou connaître sont les suivants : la spécificité analytique, la sensibilité diagnostique, la contamination entre échantillons, la stabilité des réactifs, la robustesse par la comparaison de méthode (tableau I).

Tableau I : Eléments de vérification et de validation de méthode qualitative de portée de type B.

PARAMETRES A VERIFIER ET / OU A CONNAITRE	Bibliographie	Vérification sur site Portée de type A	Validation Portée de type B
Spécificité analytique	Oui	Non	Oui
Sensibilité diagnostique	Oui	Non	Oui
Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)	Oui	Oui	Oui
Stabilité des réactifs (après ouverture, embarqués)	Oui	Non	Oui
Robustesse	Oui	Non	Oui
Comparaison avec méthode de référence	Oui	Non	Oui (si existe)
Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire	Oui (si existe)	Oui (si possible)	Oui

La spécificité analytique et la sensibilité diagnostique sont les paramètres essentiels à maîtriser. Leur surveillance passe, d'une part, par la comparaison des résultats obtenus avec d'autres méthodes complémentaires ou des techniques de référence mises en œuvre pour vérifier les premiers résultats, et, d'autre part, par l'étude des contrôles internes de qualité (CIQ) et des évaluations externes de la qualité (EEQ) permettant d'évaluer la performance de la technique et de réaliser une comparaison avec les autres méthodes. Pour maîtriser une technique, l'utilisation, la gestion et le suivi de CIQ et EEQ sont indispensables. Le problème réside dans le fait qu'il n'existe pas de CIQ et EEQ pour tous les composés. Dans la littérature, les validations de méthodes des techniques de criblages toxicologiques sont très variables (tableau II).

Tableau II : Validation des méthodes de criblage toxicologique présentes sur le marché depuis 2006

Composés analysés	E	Extraction	Colonne chromatographique	Phase mobile	Mode de détection	Appareil	Validation de méthode
700 stupéfiants, médicaments et composés toxiques(27)	U	Dilution, PP	Restek Allure PFP propyl (50 x 2,1 mm, 5 µm)	Gradient d'élu­tion eau/acé­toni­trile, 2mM formiate d'amonium et 0,2 % d'acide formique chacun	ESI + MRM (balayage), IDA, EPI	QqQ Qq LIT	Comparaison à la technique de routine en CPG-SM
	U, S	LLE					
780 composés toxiques(32)	Sg,U	SPE (HCX)	Zorbax SB-Aq (150 x 2,1 mm, 3,5 µm)	Gradient d'élu­tion 0,1 % d'acide formique et de méthanol	ESI +, PIS	Ion trap	LOD de 24 composés
320 pesticides et métabolites(33)	Sg	PP, SPE (WAX)	Intersil ODS3 C18 (100 x 1 mm, 3 µm)	Gradient d'élu­tion 10 mM d'acide formique et d'acé­toni­trile	ESI + et ESI - PIS SM2 et SM3	Ion trap	LOD des 320 pesticides Effet matrice sur 14 molécules
Plus de 300 composés, stupéfiants et métabolites(34)	U	LLE (acide et basique)	Acquity UPLC HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	Gradient d'élu­tion 0,05 % d'acide formique et de méthanol	ESI +, balayage à 10 et 45 V	TOF	Comparaison entre 6 laboratoires, spécificité, effet matrice, comparaison de méthode
Approximativement 50500 composés(35)(36)	C	Incubation avec HCl, LLE	Zorbax Eclipse C18 (150 x 2,1 mm, 3,5 µm)	Gradient 0,1 % d'acide formique et d'acé­toni­trile	ESI+, full-scan	TOF	Test sur 108 composés de classes pharmacologiques variées.
	Sg,U	PP, LLE					
	U	Dilution					

U : urine ; S : sérum ; Sg : sang total ; C : cheveux ; LLE : extraction liquide/liquide ; SPE ; extraction sur phase solide ; PP : précipitation de protéines ; ESI : ionisation électrospray ; MRM : multiple reaction monitoring ; IDA : information dependant acquisition ; PIS : product ion scan ; QqQ : triple quadripôle ; QQLIT : triple quadripôle et trappe d'ion linéaire ; TOF : temps de vol ; CPG-SM, chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ; LOD : limite de détection.

Weinmann et al. comparent sa technique de MTS à la méthode de CPG/SM qu'ils utilisent en routine (27). Liu et al. mesurent la limite de détection (LOD) de 24 composés parmi les 780 détectés (32). Dulaurent et al. dans une technique de recherche large de pesticides dans le sang réalisent la LOD de tous les composés que sa méthode peut détecter (33). Lee et al. étudient quant à eux, une comparaison de méthodes inter-laboratoires (34). Enfin Poletini et al. testent 108 composés présents dans sa bibliothèque (35)(36).

Actuellement, il n'existe pas de procédure de validation pour ces techniques de dépistage toxicologique. De ce fait, nous nous sommes basés sur les recommandations COFRAC et les

propositions de la Société Française de Toxicologie Analytique pour la validation de méthodes des analyses qualitatives en toxicologie (31).

Nous avons donc réalisé les mesures suivantes : limite d'identification de tous les composés détectés ; répétabilité et reproductibilité de composés présélectionnés.

Validation d'une méthode de criblage toxicologique par CLHP-SM/SM

1. Matériels et Méthodes

1.1. Réactifs et produits de référence

L'acétonitrile, le méthanol et l'acide formique sont fournis par Carlo Erba (Val de Reuil, France). Le formiate d'ammonium et les étalons internes (glafénine, loflazébate d'éthyl, SKF-525A) sont fournis par Sigma-Aldrich Chemicals (St. Quentin Fallavier, France). Les plaques OSTRO[®] et Phree[®], pour les techniques de précipitation de protéines, ont été gracieusement fournies par Waters[®] (Milford, MA, Etats-Unis), Phenomenex[®] (Aschaffenburg, Allemagne). Biotage[®] (Uppsala, Suède) a fourni les plaques Isolute[®] SLE+.

L'eau de qualité ultrapure (résistivité ≥ 18.0 M Ω /cm), utilisée pour la préparation des phases mobiles, est préparée à partir d'un système de purification d'eau Milli-Q[®] de Millipore (Molsheim, France).

Les plasmas témoins sont fournis par l'Etablissement Français du Sang de Grenoble. Des analyses en CLHP-BD et CPG-SM ont permis de vérifier que ces plasmas ne contenaient aucun toxique.

Les laboratoires fournisseurs des produits de référence utilisés pour la surcharge des plasmas sont disponibles en annexe .

Les solutions de produits de référence, de glafénine, loflazébate d'éthyl et SKF-525 sont à une concentration de 100 mg/L dans le méthanol et conservées à -20°C (exception faite pour le baclofène, dont la solution de référence est réalisée dans l'eau et conservée à + 4°C)

1.2. Préparation des échantillons

1.2.1. Molécules testées.

Chaque technique de criblage toxicologique possède ses avantages et ses inconvénients. Le laboratoire de Toxicologie doit optimiser ses techniques pour dépister, identifier et quand cela est nécessaire, quantifier un toxique. De par les inconvénients des deux techniques de criblage toxicologique disponibles au laboratoire, nous avons décidé d'évaluer en priorité les molécules suivantes : la metformine, les bêta-bloquants, les inhibiteurs calciques et les antiarythmiques.

C'est à partir de ces molécules que nous avons évalué la répétabilité et la fidélité intermédiaire de notre technique de criblage toxicologique.

Par la suite, nous avons étendu le nombre de molécules testées en fonction des toxiques les plus couramment retrouvés dans les intoxications médicamenteuses volontaires (13) : benzodiazépines, antidépresseurs tricycliques, antidépresseurs non tricycliques, neuroleptiques et stupéfiants.

1.2.2. Etalon interne (EI)

Le choix des étalons internes est basé sur la durée de l'acquisition (17,5 minutes), la disponibilité des molécules au sein du laboratoire et la répartition des TR des composés présents dans la banque de transition MRM. Le choix s'est porté sur la glafénine, le loflazébate d'éthyl et le SKF-525. Ces molécules sont couramment utilisées comme étalon interne dans nos techniques

de criblage toxicologique (CLHP-BD, CPG/SM) et sont idéalement réparties sur le temps de l'acquisition (TR respectifs de 4 min, 5,6 min, et 9 min) (figure 21).

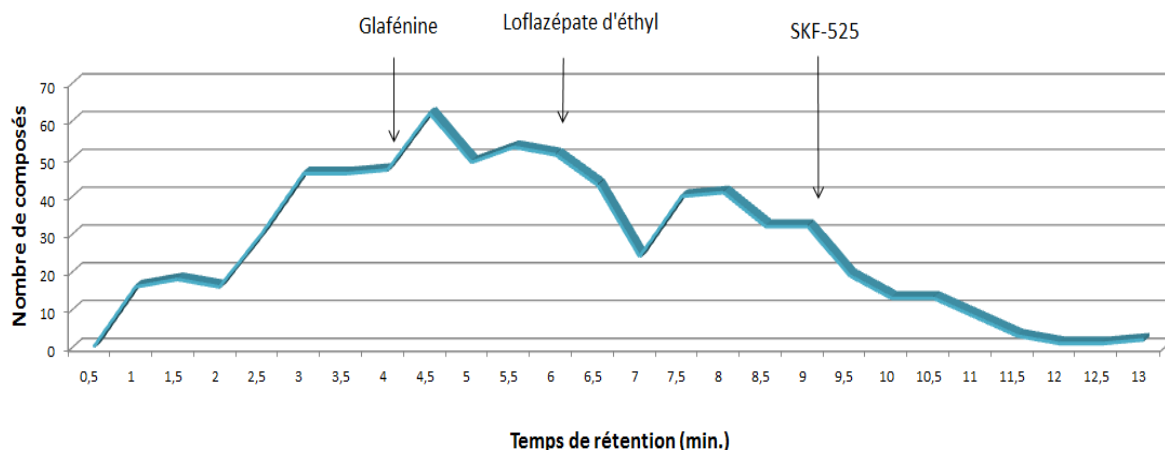


Figure 21 : Répartition des temps de rétention des 700 composés recherchés au cours du MTS

La présence de 3 étalons internes couvrant le temps de l'acquisition permet d'avoir un regard critique sur la qualité de cette dernière tout au long de son exécution.

1.2.3. Plasma surchargé

Chaque molécule est initialement testée à des concentrations de 100 et 1000 ng/mL dans un mélange de trois plasmas. Chaque plasma surchargé contient de 1 à 10 molécules. Le volume total des solutions de référence ne dépasse pas 10 % du volume final de plasma surchargé (généralement $\leq 100 \mu\text{L}$ pour 1 mL de plasma surchargé), ceci dans le but d'empêcher toute précipitation du plasma par les solutions méthanoliques de référence.

1.2.4. Contrôle interne de qualité

Afin de s'assurer du bon déroulement de l'acquisition, un contrôle interne de qualité (ACQ Science) est utilisé avant chaque série d'analyses.

Il s'agit d'un mélange de 12 composés (metformine, colchicine, propranolol, aténolol, sotalol, bisoprolol, labétalol, vérapamil, diltiazem, amiodarone, codéine, morphine).

Chaque acquisition a été validée par la présence de ces composés, la correspondance des TR observés avec les TR théoriques et la correspondance du spectre de masse acquis avec le spectre de masse de référence issu de la bibliothèque (pureté >70 %) (figure 22).

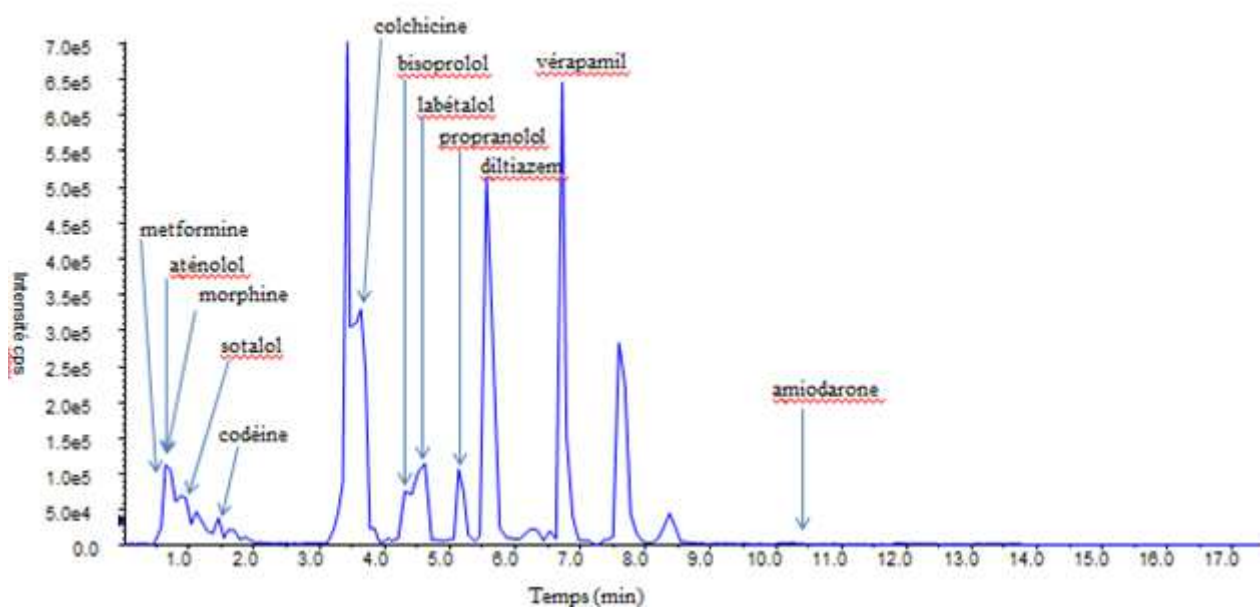


Figure 22 : Courant ionique total du contrôle de qualité interne

1.3. Choix de la méthode d'extraction

Nous avons comparé 7 méthodes d'extraction (tableau III)

Tableau III : Méthodes d'extractions testées en CHLP-SM/SM

N°	Technique d'extraction	Principe
1	Extraction CLHP-BD	Extraction liquide/liquide en milieu basique Hexane/dichlorométhane
2	Extraction CPG-SM	Extraction liquide/liquide par Toxitube® A Variant Heptane/isopropyl/dichlorométhane
3	Extraction basique pH =11(37)	Extraction liquide/liquide 1-chlorobutane
4	Précipitation de protéine	Précipitation par l'acétonitrile
5	Phenomenex Phree®	Phospholipids removal
6	Biotage Isolute® SLE+	Extraction liquide par le MTBE sur support solide (terre de diatomée)
7	Waters Ostro®	Phospholipids removal

Quatre techniques ont été initialement testées pour choisir la méthode la plus appropriée afin de valider notre criblage toxicologique par CHLP-SM/SM (technique 1 à 4).

A posteriori et suite aux résultats de fidélité intermédiaire (cf. 2.5), nous avons eu l'opportunité de tester trois techniques nouvellement mises sur le marché (technique 5 à 7).

Les techniques 1 à 4 ont été testées sur un panel de 16 bêta-bloquants (acébutolol, aténolol, bétaxolol, bisoprolol, carvedilol, céliprolol, esmolol, metoprolol, nadolol, nébivolol, oxprénolol, pindolol, propranolol, sotalol, tertalolol, timolol) surchargés dans deux pools de plasma à la concentration de 100 ng/mL. Les modes opératoires étaient les suivants :

- **Extractions CHLP-BD et CPG-SM** : décrites précédemment (cf. 3.1 et 3.2)

- **Extraction basique (37)** : technique d'extraction liquide/liquide. L'extraction est réalisée par 0,5 mL d'acétate de butyl. La prise d'essai est de 1 mL de plasma ajustée à pH 11 par 0,3 mL de tampon TRIS. La phase organique est récupérée après agitation et centrifugation. Après évaporation, le résidu sec est repris par 100 µL de phase mobile CHLP puis placé dans un vial avec insert d'injection pour être analysé.
- **Précipitation de protéines** : la solution de précipitation est composée d'acétonitrile et des étalons internes à la concentration de 300 ng/mL. La prise d'essai de chaque échantillon biologique ou plasma surchargé est de 100 µL. Cette dernière est mélangée à 200 µL de solution de précipitation. Après vortex (30 secondes) et centrifugation à 25000 g. pendant 10 min, 200 µL de surnageant sont récupérés et placés dans un vial avec insert d'injection pour être analysés.

Les techniques 5 à 7 ont été testées sur un pool de dix molécules couvrant le run chromatographique (aténolol, bisoprolol, nadolol, nébivolol, sotalol, diltiazem, lercanidipine, vérapamil, amiodarone, colchicine). Ces composés ont été surchargés dans un pool de plasma aux concentrations de 10, 100 et 1000 ng/mL. Des tests de fidélité intermédiaire ont été réalisés afin de comparer ces trois méthodes à la technique d'extraction initialement choisie. Les modes opératoires étaient les suivants :

- **Technique Phenomenex Phree[®] et Waters Ostro[®]** : extraction sur plaques de 96 puits basée sur le principe de précipitation de protéines et d'élimination des phospholipides sur support solide. La solution de précipitation est composée d'acétonitrile, de 1% d'acide formique et des étalons internes à la concentration de 300 ng/mL. La prise d'essai de chaque plasma surchargé est de 100 µL. Cette dernière est mélangée à 300 µL de solution de

précipitation dans les supports d'extraction fournis par Phenomenex et Waters. Le filtrat est récupéré après application d'une pression positive de 5 psi pendant 30 secondes.

- **Technique Biotage Isolute[®] SLE+** : extraction sur plaques de 96 puits basée sur une extraction liquide/liquide sur support solide. Elle repose sur l'utilisation de terre de diatomée modifiée. Le plasma est initialement dilué au demi. La prise d'essai est de 100 µL. Cette dernière est déposée sur le support. Après 5 minutes, elle est éluée à deux reprises par 500 µL de méthyl ter-butyl éther (MTBE). Le filtrat est collecté après application d'une pression positive de 5 psi pendant 30 secondes.

1.4. Instruments

Le système chromatographique consiste en une CLHP Shimadzu (Kyoto, Japon) composée d'une pompe quaternaire Prominence LC-20AD, d'un injecteur automatique 70 positions SIL-20 AC (thermostaté à 4°C) et d'un four colonne CTO-20AC.

La détection par MS/MS est réalisée sur spectromètre de masse ABSciex API 3200 QTRAP (Toronto, Canada), équipé d'une source d'ionisation électrospray Turbo V[®].

1.4.1. Chromatographie

Les injections automatiques sont réalisées sur une colonne chromatographique Restek (Bellefonte, Etats-Unis) Allure PFP Propyl (50 mm de longueur ; 2,1 mm de diamètre interne, 5 µm de diamètre de particules) équipée d'une précolonne Restek de chimie de phase stationnaire identique.

La chromatographie est réalisée en mode gradient d'éluion avec deux phases mobiles. La phase mobile A (aqueuse ; solvant faible) est composée de 2 mM de formiate d'ammonium comprenant 0,2 % d'acide formique. La phase mobile B (organique ; solvant fort) est composée de formiate d'ammonium 2 mM dans l'acétonitrile comprenant 0,2 % d'acide formique.

Le gradient commence par 10 % de phase B à un débit de 0,5 mL/min et augmente linéairement pendant 10 minutes pour atteindre 90 % de phase B et un débit de 1 mL/min. Ce plateau est maintenu pendant 5 minutes. Enfin, les conditions initiales sont restaurées en 0,5 minutes et maintenues pendant 2 minutes afin de rééquilibrer le système (figure 23).

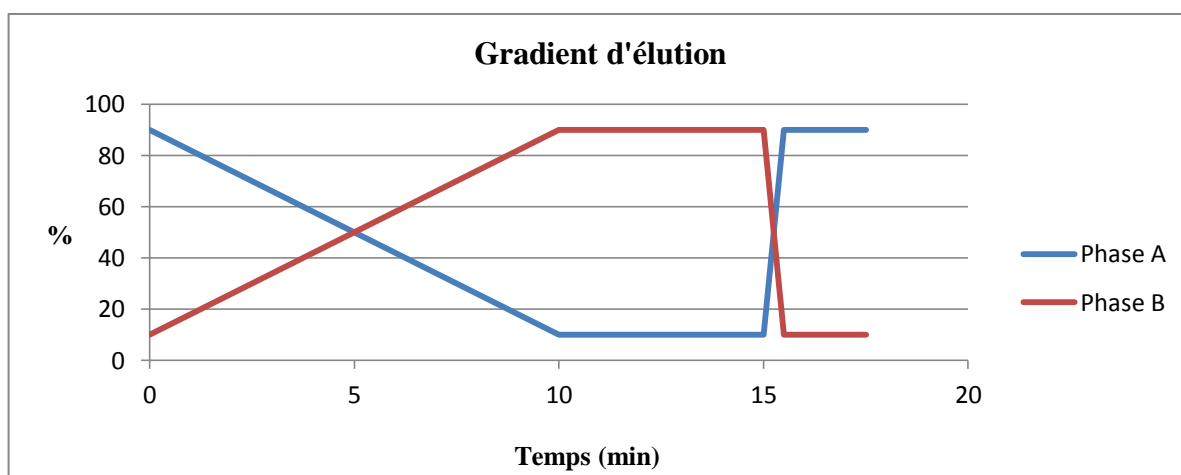


Figure 23 : Gradient d'élution du run chromatographique

A la fin de chaque série d'échantillons, un run particulier de purge est réalisé par un gradient d'élution qui débouche sur 100 % de phase B. La colonne est ensuite rincée par une troisième phase mobile (phase C) composée d'un mélange eau/méthanol 50/50 (v/v). Cette purge permet de nettoyer, préserver et stocker la colonne dans des conditions optimales (figure 24).

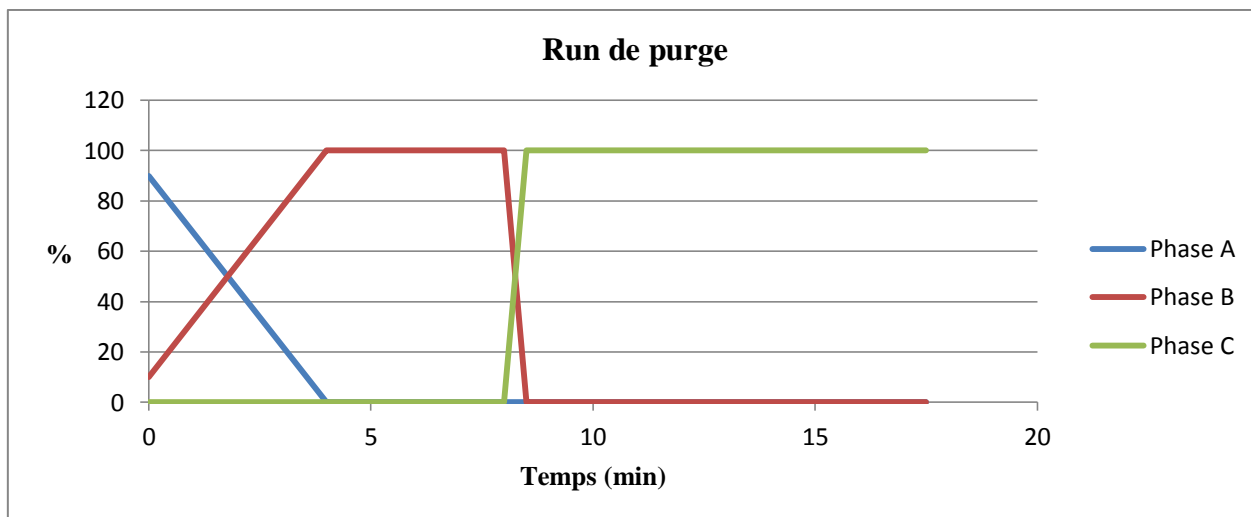


Figure 24 : Gradient d'élution du run de purge

1.4.2. Spectrométrie de masse

Afin d'analyser les composés chromatographiés dans des conditions optimales, deux familles de paramètres demandent d'être optimisés dans le spectromètre de masse : les paramètres « source » et les paramètres « produits »

1.4.2.1. Optimisation des paramètres « source »

Il s'agit de paramètres déterminés puis fixés au niveau de la source d'ionisation et de la cellule de collision (figure 25).

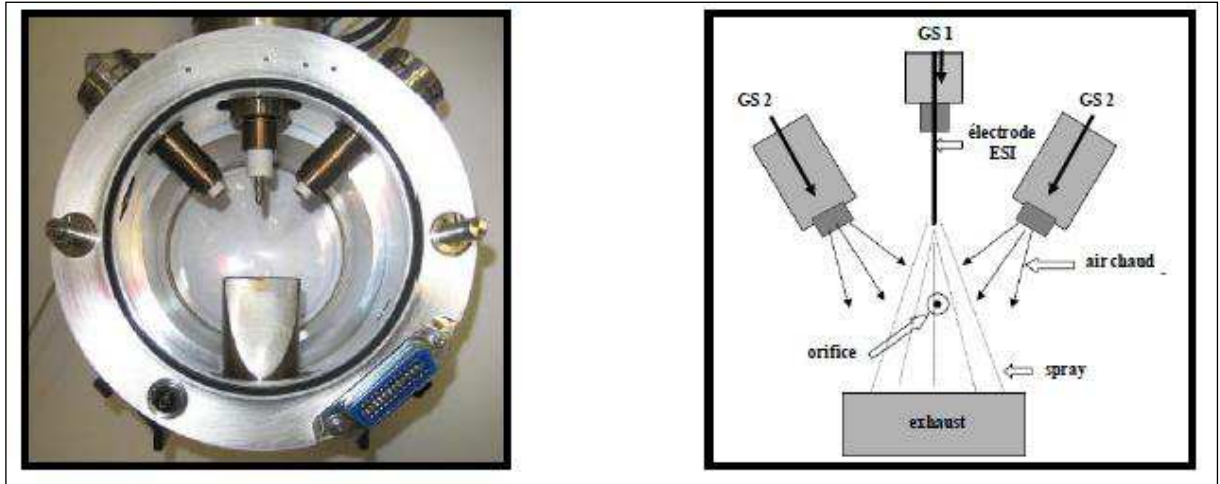


Figure 25 : Source d'ionisation électrospray TurboV® et schéma descriptif (GS1 : gaz de nébulisation ; GS2 : gaz de désolvatation)

Ils demeurent constants pour l'ensemble des composés et durant la globalité de l'analyse :

- Polarité d'Ionisation : positive
- Tension d'ionisation: 4000 V
- Température de la source : 500°C
- Pression du gaz rideau (curtain gaz) : 20 psi
- Pression du gaz de nébulisation (GS1): 40 psi
- Pression du gaz auxiliaire (GS2) : 70 psi
- Pression du gaz de collision : 6 psi

1.4.2.2. Optimisation des paramètres « produit »

Il s'agit de paramètres (tensions) composés-dépendants. La méthode ABSciex livre ses paramètres avec des valeurs génériques. Il est tout à fait possible de les optimiser un à un et

composé par composé en pratiquant une infusion¹ afin de maximiser la réponse de l'appareil. Par défaut, les valeurs de ces paramètres sont les suivantes :

- Potentiel de « déclusterisation² » (DP) : 40 V
- Potentiel d'entrée (EP) : 10 V
- Potentiel d'entrée dans la cellule de collision (CEP) : 10 V
- Energie de collision (CE) : 35 (+/- 15) eV
- Potentiel de sortie de la cellule de collision (CXP) : 4 V

1.4.2.3. Acquisition

L'acquisition est réalisée en mode « Scheduled MRM » sur une liste de 729 transitions ioniques. Le temps d'un cycle est de 2,6 secondes.

Les critères IDA (Information Dependent Acquisition) sont les suivants : Seuil minimal d'intensité : 1000 cps; fenêtre de TR (RTW) : +/- 60 s ; sélection des deux transitions MRM les plus intenses par cycle ; exclusion des transitions MRM retrouvées quatre fois consécutivement pendant 15 secondes.

Les spectres EPI sont acquis sur un balayage de masses de 50 à 700 uma et obtenus à 3 niveaux de CE (35 +/- 15eV).

¹ Infusion : injection en continu d'un composé en solution pure, sans séparation chromatographique, afin d'optimiser chacun de ces paramètres « produits ».

² Un cluster est dans notre cas, est un amas d'ions qui se forme spontanément après l'ionisation. L'objectif est d'appliquer un potentiel permettant de « casser » ces amas (clusters).

1.4.3. Logiciels

Les logiciels utilisés sont Analyst[®] version 1.5.2 et Cliquant[®] 3.2 développés par la société ABSciex[®].

1.4.4. Banque de transition MRM

La banque de transitions MRM est celle développée par la société ABSciex[®] (27). Elle est initialement composée de 700 transitions MRM correspondant à 700 molécules. Chaque molécule est caractérisée par sa transition MRM, son TR, ses DP, EP, CE, CEP et CXP.

1.4.5. Bibliothèque de spectres

La bibliothèque de spectres utilisée pour comparer les spectres acquis est celle développée par Weinmann et al. (29).

1.5. Evaluation de la sensibilité de la méthode

Pour ce faire, chaque molécule testée, est surchargée dans un mélange de plasma, à des concentrations de 100 ng/mL et 1000 ng/mL.

Lorsqu'une molécule n'est pas détectée, une nouvelle injection est réalisée, en solution méthanolique (solution dite pure), à des concentrations de 100 et 1000 ng/mL, tout en fixant le TR de la molécule à 0 min. Cela permet, d'une part, d'éliminer tout effet matrice régulièrement retrouvé dans les techniques sur matrice biologique après précipitation de protéines, et, d'autre part, de s'affranchir d'un possible décalage du TR observé par rapport au TR théorique attendu

inscrit dans la banque de transition MRM. Avec un TR de 0 min, une molécule est recherchée sur l'ensemble de l'acquisition et le critère RTW ne s'applique pas.

Pour chaque composé, le TR observé est comparé au TR théorique attendu inscrit dans la banque de transition MRM. Si l'écart entre les deux est jugé trop important (supérieur à 0,5 min), le TR observé du composé est incrémenté à la banque de transitions MRM.

Les spectres de masse acquis sont comparés à la bibliothèque de spectre de référence. Si la correspondance « spectre de masse acquis/spectre de référence » est inférieure à 70 % (limite inférieure de pureté), le spectre de masse acquis est incrémenté dans la bibliothèque de spectre de référence.

1.6. Limite d'identification (LOI)

La LOD de est définie comme le plus petit signal exprimé en quantité ou en concentration qui peut être distingué d'un blanc dans les mêmes conditions (12). Notre technique étant avant tout une méthode qualitative, la mesure de la LOD selon les recommandations COFRAC n'est pas applicable ici. Nous avons donc réalisée une LOI comme on peut le voir dans diverses méthodes de criblage toxicologique, sans tenir compte du rapport signal/bruit (33)(38).

Pour chaque composé détecté, à 100 ng/mL ou 1000 ng/mL, une gamme de concentrations est réalisée (de 10 à 100 ng/mL ou de 100 à 1000 ng/mL) dans un mélange de plasma afin d'en déterminer la limite d'identification. La LOI a été définie comme la plus petite concentration permettant l'identification du composé avec les critères suivants :

- détection de la transition MRM
- correspondance du spectre acquis avec le spectre de référence, pureté > 70 %.

1.7. Répétabilité

Les mesures de répétabilité ont été effectuées sur un même échantillon, un jour donné, selon les recommandations du guide d'accréditation COFRAC SH GTA 04 (12). Elles ont été réalisées à deux niveaux de concentrations (100 et 1000 ng/mL) surchargées dans un mélange de plasma et répétées 6 fois le même jour, comme le préconise la Société Française de Toxicologie Analytique (31). Elle a été réalisée sur un panel de 32 molécules appartenant à différentes classes pharmacologiques : bêta-bloquants, inhibiteurs calciques, anti-arythmiques et biguanides.

Les paramètres suivants ont été étudiés : rapport [aire molécule/aire étalon interne] ; TR ; correspondance de spectre. L'étalon interne choisi pour le calcul du rapport « aire molécule / aire étalon interne » est le SKF-525. La validation de la répétabilité de la méthode est basée sur le calcul du coefficient de variation (CV) et sa comparaison au CV limite acceptable (fixé à 20 % dans notre étude).

1.8. Fidélité intermédiaire

Les mesures de fidélité intermédiaire (reproductibilité) ont été effectuées sur des échantillons différents, à des jours différents selon les recommandations du guide d'accréditation COFRAC SH GTA 04 (12). Les molécules, les modalités de préparation des échantillons ainsi que les paramètres étudiés sont les mêmes que ceux utilisés pour les mesures de répétabilité. Le CV limite acceptable est fixé à 20 %.

1.9. Comparaison de méthodes

La technique de criblage toxicologique par CLHP-BD étant celle utilisée en première intention dans notre laboratoire, nous avons comparé nos techniques CLHP-SM/SM et CLHP-BD. Cette comparaison de méthode a été réalisée rétrospectivement sur 30 échantillons positifs reçus au laboratoire, initialement analysés en CLHP-BD puis en aveugle en CLHP-SM/SM.

2. Résultats

2.1. Méthode d'extraction

Parmi les 4 premières techniques testées, le choix de la méthode s'est basé sur la comparaison des paramètres suivants : praticabilité (technicité, temps de préparation), sélectivité (analyse de la présence des composés, de leur spectre de masse et de leur correspondance avec le spectre de référence), coût (tableau IV).

Tableau IV : Avantages et limites des 4 premières techniques d'extraction testées pour le criblage toxicologique par CLHP-SM /SM

N°	Technique d'extraction	Principe	Avantages	Limites
1	Extraction CLHP-BD	Extraction liquide/liquide Hexane/dichlorométhane	Coût Effet matrice moindre	Sélectivité Temps de préparation Volume de l'échantillon
2	Extraction CPG-SM	Extraction liquide/liquide par toxitube® A Variant Heptane/isopropyl/dichlorométhane	Effet matrice moindre	Sélectivité Coût Volume de l'échantillon (Arrêt de commercialisation)
3	Extraction basique pH=11(37)	Extraction liquide/liquide 1-chlorobutane	Coût Effet matrice moindre	Sélectivité Temps de préparation Technicité Volume de l'échantillon
4	Précipitation de protéines	Précipitation par l'acétonitrile	Coût Temps de préparation Volume de l'échantillon	Effet matrice

La technique d'extraction utilisée pour le criblage par CLHP-BD s'est révélée comme prévu trop sélective. Sur les 16 bêtabloquants testés, 3 ne sont pas détectés (aténolol, nadolol et sotalol) car supposés non extraits.

L'analyse des échantillons après extraction liquide/liquide à pH 11 ne permet pas de détecter l'aténolol et le sotalol. De plus, elle est longue et fastidieuse à réaliser.

La technique de précipitation de protéines à l'acétonitrile et d'extraction par toxitube A[®] permettent d'identifier tous les composés. L'extraction par toxitube A[®] se révèle être une bonne technique mais trop longue et trop coûteuse.

Notre choix s'est donc porté sur la technique de précipitation de protéines à l'acétonitrile qui est la méthode la plus rapide. La préparation de l'échantillon ne dure qu'une quinzaine de minutes. C'est une technique également peu sélective car l'extraction n'est pas influencée par le pH. Enfin, elle est peu coûteuse. C'est donc la méthode d'extraction que nous avons utilisé pour tester notre nouvelle technique de criblage toxicologique par CLHP-SM/SM.

L'intérêt des 3 autres techniques d'extraction est traité ultérieurement (paragraphe 2.5).

2.2. Sensibilité de la méthode

Au total, 146 molécules ont été analysées. Les différentes classes pharmacologiques testées sont représentées dans la figure 26.

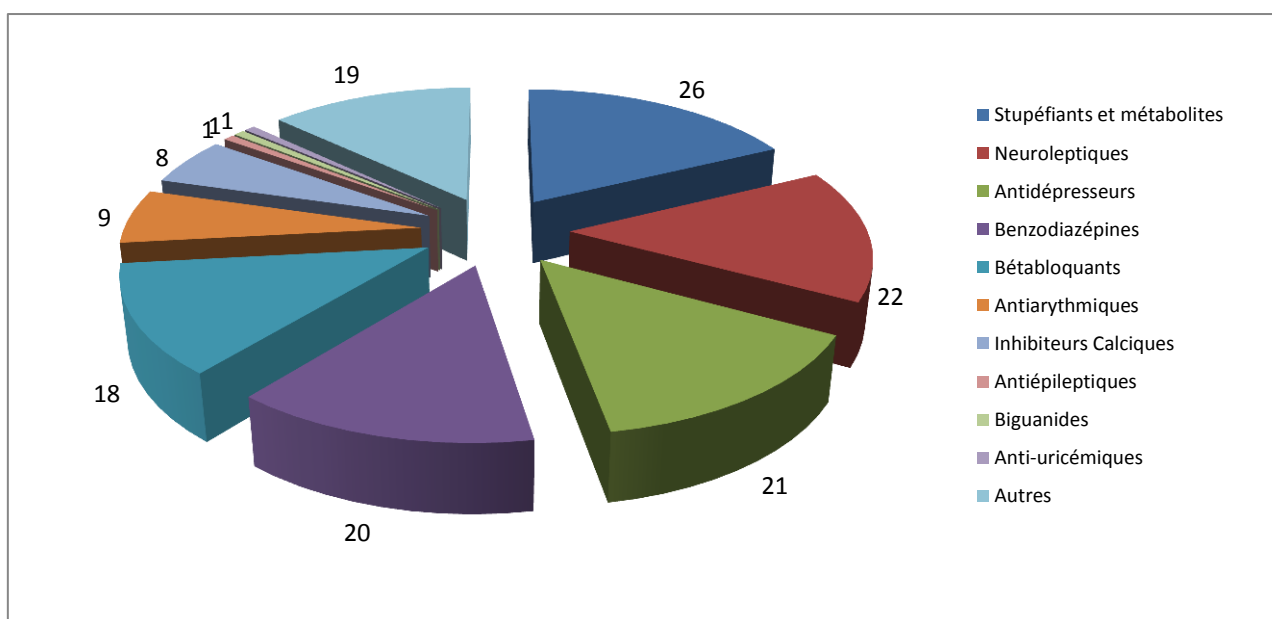


Figure 26 : Molécules testées en MTS sous Cliquid 3.2

Sur ces 146 molécules analysées, 29 ne font pas partie de la banque de transitions MRM initiale et ont donc été ajoutées (Tableau V).

Tableau V : Molécules infusées, non disponibles dans la banque de transitions MRM initiale

Molécules	classe pharmaceutique	Molécules	classe pharmaceutique
Cibenzoline	Antiarythmique	Métopimazine	Neuroleptique
Spartéine	Antiarythmique	Pimozide	Neuroleptique
Médifoxamine	Antidépresseur	Pipotiazine	Neuroleptique
Milnacipran	Antidépresseur	Propériciazine (périciazine)	Neuroleptique
Viloxazine	Antidépresseur	Sultopride	Neuroleptique
Amoxapine	Anti-dépresseur tétracyclique	4 MTA	Stupéfiant
Topiramate	Anti-épileptique	Coca éthylène	Stupéfiant
Alpha-méthyl prednisolone	Anti-inflammatoire stéroïdien	Codéthyline	Stupéfiant
Prednisolone	Anti-inflammatoire stéroïdien	Ethyl amphétamine	Stupéfiant
Pholcodine	Antitussif	Ethylmorphine	Stupéfiant
Colchicine	Anti-uricémique	GHB	Stupéfiant
8-OH-Midazolam	Benzodiazépine	Méphédronne	Stupéfiant
Labétalol	Béta-bloquant	Oxo-LSD	Stupéfiant (métabolite)
Norpropoxyphène	Métabolite	Psilocybine	Stupéfiant
Baclofen	Myorelaxant		

De plus, 29 molécules ont été exclues de cette méthode (tableau VI).

Tableau VI : Molécules exclues du criblage toxicologique par CLHP-SM/SM

Molécules exclues	Raison de l'exclusion	Molécules exclues	Raison de l'exclusion
Dosulépine	Infusion non réalisable	Oxycodone	Non détectable
GHB	Infusion non réalisable	Pseudo éphedrine	Non détectable
Médifoxamine	Infusion non réalisable	Témazépam	Non détectable
Norpropoxyphène	Infusion non réalisable	Topiramate	Non détectable
Psilocybine	Infusion non réalisable	Zuclopentixol	Non détectable
Alimémazine	Non détectable	Nifédipine	Peu sensible
Clozapine	Non détectable	Ethylmorphine	Peu sensible
Codéthyline	Non détectable	Fluvoxamine	Peu sensible
Dextropropoxyphène	Non détectable	THC	Peu sensible
Ephédrine	Non détectable	THC COOH	Peu sensible
Ethyl amphétamine	Non détectable	THC-OH	Peu sensible
Féلودipine	Non détectable	Amitriptyline	Détectable mais problème d'homologie de spectre
Fluoxétine	Non détectable	Nortriptyline	Détectable mais problème d'homologie de spectre
Mescaline	Non détectable	Protriptyline	Détectable mais problème d'homologie de spectre
Olanzapine	Non détectable		

Les raisons sont multiples : impossibilité d'infuser la molécule (présence d'ions interférents lors de l'infusion) ; molécule dont la transition MRM n'a jamais été détectée aux concentrations testées; sensibilité considérée comme médiocre à 1000 ng/mL ; problème d'homologie de spectre empêchant l'identification d'une molécule avec certitude.

Les paramètres de 97 composés testés et non infusés ont été comparés aux données fournies par ABSciex. La différence moyenne entre le TR théorique et le TR réel de ces composés est de 0,8 min (tableau VII).

Tableau VII : Différence des temps de rétention par rapport au temps de rétention théorique (n=97)

	Minimum (min.)	Maximum (min.)	Médiane (min.)
Delta TR	0	1,9	0,8

Pour 49 % des composés testés, un spectre de masse a dû être incrémenté dans la bibliothèque de référence afin d'obtenir une correspondance de spectre supérieure à 70 %.

Trente-trois molécules n'étaient pas visibles lors du premier passage. Cette non-détection était due dans 51,5 % des cas à l'absence de spectre de masse de référence dans la bibliothèque, ou à un spectre peu représentatif. Dans 21,2 % des cas, l'intensité de la transition était trop faible et donc éliminée avec le bruit de fond (intensité < 1000 cps). Pour 21,2 %, le TR réel était décalé de plus d'une minute par rapport au TR théorique (exclusion par le paramètre RTW). Enfin la présence de « transitions interférentes » a empêché la détection de composés dans 6,1 % des cas.

2.3. Limite d'identification (LOI)

Cent dix-sept molécules ont pu être détectées et leur LOI ainsi déterminée. La LOI était inférieure ou égale aux concentrations toxiques pour l'ensemble des composés dont on connaissait les concentrations toxiques, mis à part pour 5 molécules (alprazolam, amlodipine, colchicine, fentanyl, LSD) (tableau VIII).

Tableau VIII : Liste des composés détectés par technique CLHP-SM/SM et LOI correspondantes

Molécules	Classes thérapeutiques	Concentration thérapeutique µg/L(39)	Concentration toxique µg/L(39)	Limite d'identification (LOI) µg/L
Kétamine	Anesthésique	40-300	ND	60
Dihydrocodéine	Antalgique	30-250	500-1000	100
Fentanyl	Antalgique	1-2	2-20	10
Morphine	Antalgique	10-120	>150	100
Codéine	Antalgique/antitussif	50-250	300-1000	100
Ajmaline	Antiarythmique	200-1000	5500	40
Amiodarone	Antiarythmique	1000-2500	>2500	30
Cibenzoline	Antiarythmique	200-400	500-1000	20
Disopyramide	Antiarythmique	2000-7000	8000	10
Flécaïnide	Antiarythmique	200-1250	1500	10
Lidocaïne	Antiarythmique	1500-5000	6000-10000	20
Mexilétine	Antiarythmique	500-2000	2000-4000	100
Propafénone	Antiarythmique	400-1100	1100-2000	10
Spartéine	Antiarythmique	500-1000	ND	10
Atropine	Anticholinergique	45689	30-100	10
Scopolamine	Anticholinergique	ND	ND	50
Amoxapine	Antidépresseur	10-200	ND	30
Citalopram	Antidépresseur	10-200	400-600	100
Doxépine	Antidépresseur	10-250	1000*	100
Milnacipran	Antidépresseur	ND	ND	20
Paroxétine	Antidépresseur	70-150	300	80
Sertraline	Antidépresseur	50-250	290**	100
Venlafaxine	Antidépresseur	200-750	ND	100
Viloxazine	Antidépresseur	5000-10000	ND	100
Maprotyline	Antidépresseur tétracyclique	75-250	300-800	100
Miansérine	Antidépresseur tétracyclique	20-90	ND	10
Mirtazapine	Antidépresseur tétracyclique	20-100	ND	10
Clomipramine	Antidépresseur tricyclique	100-250	ND	100
Imipramine	Antidépresseur tricyclique	45-150	ND	90
Trimipramine	Antidépresseur tricyclique	70-170	400-500	100
Diphényldramine	Anti-histaminique H1	25-100	200-2000	20
Loratadine	Anti-histaminique H1	15-27	ND	100
Acide niflumique	Anti-inflammatoire non stéroïdiens	ND	ND	100
Prednisolone	Anti-inflammatoire stéroïdien	500-1000	ND	100
Dextrométorphane	Antitussif	10-40	100	100
Pholcodine	Antitussif	ND	ND	10
Colchicine	Anti-uricémique	3	5-24	20
7-amino-flunitrazépam	Benzodiazépine	ND	ND	10
8-OH-Midazolam	Benzodiazépine	ND	ND	80
Alprazolam	Benzodiazépine	20-40	75	100
Bromazépam	Benzodiazépine	80-170	300-400	100
Clobazam	Benzodiazépine	100-400	ND	90

Molécules	Classes thérapeutiques	Concentration thérapeutique µg/L	Concentration toxique µg/L	Limite d'identification (LOI) µg/L
Clonazépam	Benzodiazépine	20-70	100	60
Desmethyldiazépam (=Nordiazépam)	Benzodiazépine	200-800	2000	30
Diazépam	Benzodiazépine	125-1000 (selon indication)	1500	10
Estazolam	Benzodiazépine	55-200	ND	30
Flunitrazépam	Benzodiazépine	5-15	50	20
Lorazépam	Benzodiazépine	2-250	300-600	70
Lormétazépam	Benzodiazépine	1-20	ND	100
Midazolam	Benzodiazépine	80-2400 (selon indication)	>1500	100
Nitrazépam	Benzodiazépine	30-120	200-500	70
Oxazépam	Benzodiazépine	100-2000	3000-5000	40
Prazépam	Benzodiazépine	10-40	ND	20
Tétrazépam	Benzodiazépine	50-600	ND	10
Triazolam	Benzodiazépine	2-20	40	30
Zolpidem	Benzodiazépine apparentée	80-300	500	100
Acébutolol	Béta-bloquant	500-1250	15000	10
Aténolol	Béta-bloquant	100-600	2000	50
Bétaxolol	Béta-bloquant	5-50	ND	30
Bisoprolol	Béta-bloquant	10-60	ND	10
Cartéolol	Béta-bloquant	10-100	ND	60
Carvedilol	Béta-bloquant	20-150	ND	60
Céliprolol	Béta-bloquant	50-100	ND	20
Esmolol	Béta-bloquant	150-2000	ND	20
Labétalol	Béta-bloquant	25-200	500-1000	30
Métoprolol	Béta-bloquant	2-340	750-1000	50
Nadonol	Béta-bloquant	2-250	1300*	70
Néбиволol	Béta-bloquant	1 (métaboliseur rapide) - 3 (métaboliseur lent)	480**	30
Oxprénolol	Béta-bloquant	50-300	2000-3000	20
Pindolol	Béta-bloquant	20-80	700	10
Propranolol	Béta-bloquant	50-300	1000-2000	60
Sotalol	Béta-bloquant	500-3000	5000-10000	90
Tertalolol	Béta-bloquant	ND	ND	10
Timolol	Béta-bloquant	5-100	ND	10
Metformine	Biguanide	1000-4000	45000-70000	100
Périmopril	Inhibiteur de l'enzyme de conversion	80-150	ND	100
Amlodipine	Inhibiteur Calcique	6-18	88-100	500
Diltiazem	Inhibiteur Calcique	20-400	800	10
Lercanidipine	Inhibiteur Calcique	ND	ND	20
Nicardipine	Inhibiteur Calcique	35-135	ND	10
Verapamil	Inhibiteur Calcique	15-600	900	10
Nitrendipine	Inhibiteur Calcique	10-50	ND	500
6 MAM	Métabolite	/	ND	50
Alpha-méthyl prednisolone	Métabolite	ND	ND	100

Molécules	Classes thérapeutiques	Concentration thérapeutique µg/L	Concentration toxique µg/L	Limite d'identification (LOI) µg/L
BE	Métabolite	/	ND	100
EDDP	Métabolite	/	ND	100
Oxo-LSD	Métabolite	/	ND	10
EME	Métabolite	/	ND	20
Ethylmorphine	Métabolite	/	ND	100
Baclofen	Myorelaxant	80-600	1100-3500	700
Acépromazine	Neuroleptique	ND	ND	10
Acéprométazine	Neuroleptique	ND	ND	40
Amisulpride	Neuroleptique	100-400	10000	20
Chlorpromazine	Neuroleptique	30-300	500-2000	100
Cyamémazine	Neuroleptique	ND	ND	100
Flupenthixol	Neuroleptique	1-15	ND	100
Halopéridol	Neuroleptique	5-18	50-100	200
Hydroxyzine	Neuroleptique	5-90	100	100
Lévomépromazine	Neuroleptique	20-150	500	50
Loxapine	Neuroleptique	10-30	1000	100
Pimozide	Neuroleptique	1-20	ND	70
Pipotiazine	Neuroleptique	1-60	100	10
Propériciazine (périciazine)	Neuroleptique	5-50	100	100
Risperidone	Neuroleptique	4-30	80	40
Sultopride	Neuroleptique	ND	ND	10
Tiapride	Neuroleptique	1000-2000	ND	10
4 MTA	Stupéfiant	ND	1000	30
Coca éthylène	Stupéfiant	/	ND	100
Cocaïne	Stupéfiant	/	ND	10
LSD	Stupéfiant	/	2-5*	100
MBDB	Stupéfiant	/	ND	100
MDA	Stupéfiant	/	1000	20
MDMA	Stupéfiant	/	350-500	60
Méphédron	Stupéfiant	/	ND	20
Méthadone	Stupéfiant	100-500	200	10
Méthamphétamine	Stupéfiant	/	200-1000	100

ND : Non déterminé ; * : concentration létale ; ** : case report.

2.4. Répétabilité

En l'absence de l'utilisation d'étalons internes plus adaptés et/ou isotopiquement marqués, les coefficients de variation du rapport [aire molécule/aire EI] pour les mesures de répétabilité sont plutôt satisfaisants (tableau IX).

Tableau IX : Répétabilité : moyennes et coefficients de variation du rapport [aire molécule/aire étalon interne] aux concentrations de 100 et 1000 ng/mL (n=6)

Molécules	Moy. [A M/A EI] 100 ng/mL	CV (%)	Moy. [A M/A EI] 1000 ng/mL	CV (%)
Acébutolol	8,63E-02	9,4	6,57E-01	10,8
Aténolol	2,03E-02	21,4	2,11E-01	8,5
Bétaxolol	2,54E-02	10,4	1,75E-01	3,9
Bisoprolol	1,40E-01	20,9	7,68E-01	7,6
Cartéolol	8,53E-02	23,3	6,48E-01	17,7
Carvedilol	1,43E-02	8,6	1,42E-01	7,5
Céliprolol	1,04E-01	10,2	8,18E-01	7,3
Esmolol	6,47E-02	3,6	4,26E-01	6,8
Labétalol	1,99E-02	6,4	1,48E-01	5,2
Métoprolol	3,66E-02	12,6	2,11E-01	3,7
Nadolol	5,43E-02	24,0	4,97E-01	27,1
Néбиволol	3,00E-02	17,7	2,92E-01	5,5
Oxprenolol	3,93E-02	6,6	2,75E-01	4,8
Pindolol	1,02E-01	16,3	6,78E-01	3,4
Propranolol	2,95E-02	8,5	1,47E-01	7,1
Sotalol	4,25E-02	16,3	3,53E-01	13,4
Tertalolol	1,81E-01	6,6	1,23E+00	4,3
Timolol	7,19E-02	16,2	3,85E-01	5,4
Diltiazem	1,40E-01	11,2	1,39E+00	6,0
Lercanidipine	3,75E-01	2,7	3,54E+00	4,9
Nicardipine	1,99E-01	10,6	1,72E+00	5,5
Vérapamil	3,00E-01	6,4	2,59E+00	7,3
Metformine	2,27E-01	4,3	1,22E+00	3,1
Ajmaline	4,95E-02	9,9	4,48E-01	8,9
Amiodarone	6,75E-02	4,5	5,99E-01	6,7
Cibenzoline	1,49E-01	7,5	ND	ND
Disopyramide	5,17E-01	15,2	4,00E+00	12,9
Flécaïnide	1,79E-01	11,2	1,34E+00	7,9
Lidocaïne	2,73E-01	13,5	2,26E+00	9,3
Mexilétine	4,75E-02	12,4	2,98E-01	26,0
Propafénone	2,66E-01	20,0	2,14E+00	8,0
Spartéine	4,73E-01	15,4	4,21E+00	6,5

Moy. A M/A EI : rapport [aire molécule / aire étalon interne (SKF-525)] ; CV : coefficient de variation

Cinq molécules ont un CV supérieur à 20 % à la concentration de 100 ng/mL (aténolol, bisoprolol, cartéolol, nadolol et propafénone), deux à la concentration de 1000 ng/mL (nadolol et mexilétine). Les données n'ont pu être récupérées pour la cibenzoline, le spectre de masse étant saturé.

En ce qui concerne les valeurs de TR et de pureté, tous les coefficients de variation étaient inférieurs à 20 % (tableau X). Ces données n'ont pu être recueillies pour la cibenzoline à 1000 ng/mL (spectre de masse EPI saturé).

Tableau X : Répétabilité : moyennes et coefficients de variation des temps de rétention et puretés à 100 et 1000 ng/mL (n=6)

Molécules	Concentration : 100 ng/mL				Concentration : 1000 ng/mL			
	Moy. TR (min.)	CV (%)	Moy. Pureté (%)	CV (%)	Moy. TR (min.)	CV (%)	Moy. Pureté (%)	CV (%)
Acébutolol	3,97	0,2	85,6	2,0	3,98	0,3	91,8	4,9
Aténolol	0,91	14,4	90,2	4,2	0,86	5,4	96,9	1,6
Bétaxolol	5,72	0,3	91,4	1,1	5,71	0,1	85,8	0,5
Bisoprolol	5,05	0,2	95,9	0,9	5,04	0,1	97,1	2,1
Cartéolol	3,04	1,3	81,5	2,9	3,05	0,5	90,2	6,0
Carvedilol	7,09	0,1	97,4	2,0	7,10	0,1	90,6	2,4
Céliprolol	4,66	0,1	90,6	2,8	4,66	0,2	93,7	2,8
Esmolol	4,74	0,2	94,1	3,2	4,75	0,1	96,6	1,2
Labétalol	5,18	0,1	93,0	2,5	5,19	0,2	97,6	1,1
Métoprolol	4,25	0,2	89,7	4,3	4,26	0,2	89,6	2,9
Nadolol	2,94	3,0	85,3	4,9	2,98	0,7	92,3	1,8
Néбиволol	7,63	0,2	98,2	0,6	7,63	0,2	97,3	0,3
Oxprenolol	5,15	0,2	88,6	0,6	5,16	0,1	93,8	2,4
Pindolol	3,60	0,2	88,6	1,3	3,60	0,6	93,4	1,4
Propranolol	5,99	0,1	73,0	3,5	6,00	0,1	86,8	4,2
Sotalol	1,31	11,6	91,3	6,3	1,38	14,9	97,2	1,2
Tertalolol	5,93	0,1	96,9	2,3	5,93	0,0	94,6	4,8
Timolol	4,10	0,2	97,0	1,5	4,09	0,2	99,8	0,3
Diltiazem	6,45	0,1	90,7	1,3	6,46	0,1	66,5	6,3
Lercanidipine	10,20	0,0	80,5	8,1	10,20	0,0	71,5	7,6
Nicardipine	7,56	0,0	97,0	1,3	7,55	0,1	62,6	14,1
Vérapamil	7,77	0,1	93,7	3,9	7,78	0,0	62,2	17,3
Metformine	0,64	1,0	75,4	4,6	0,62	0,4	82,7	3,6
Ajmaline	4,87	0,8	91,8	2,6	4,94	0,0	92,6	4,1
Amiodarone	11,20	0,6	99,9	0,2	11,30	0,0	84,4	9,7
Cibenzoline	6,21	0,7	82,4	6,6	ND	ND	ND	ND
Disopyramide	5,38	0,6	95,8	0,9	5,45	0,0	93,2	1,9
Flécaïnide	7,36	0,7	85,7	2,2	7,44	0,0	95,8	3,3
Lidocaïne	4,22	0,9	89,4	3,9	4,27	0,0	92,3	1,9
Mexilétine	4,70	0,6	82,4	7,5	4,76	0,0	96,0	2,3
Propafénone	7,34	0,6	97,5	1,1	7,41	0,0	93,0	1,9
Spartéïne	3,60	1,1	95,9	0,0	3,35	0,0	76,8	9,6

Moy. : moyenne; TR : temps de rétention ; CV : coefficient de variation

La pureté moyenne retrouvée à 100 et 1000 ng/mL est respectivement de 90,2 % (min : 73 % ; max : 99,9 %) et 88,9 % (min : 62,2 % ; max : 99,8 %). Les puretés moyennes de la nifédipine, du vérapamil et du diltiazem sont légèrement inférieures à 70 % (respectivement 66,6 %, 66,2 % et 66,5 %). Ceci s'explique par la richesse de leurs spectres de masse à 1000 ng/mL.

2.5. Fidélité intermédiaire

A l'issue des tests de fidélité intermédiaire, les coefficients de variation sont supérieurs à 20 % dans 46,8 % des cas à la concentration de 100 ng/mL et 50 % des cas à 1000 ng/mL. Ceci exclut la possibilité de mise en place d'une technique semi-quantitative pour les molécules testées (tableau XI).

Tableau XI : Fidélité intermédiaire : moyennes et coefficients de variation du rapport [aire molécule/aire étalon interne] aux concentrations de 100 et 1000 ng/mL (n=6).

Molécules	Moy. [A M/A EI] 100 ng/mL	CV (%)	Moy. [A M/A EI] 1000 ng/mL	CV (%)
Acébutolol	1,54E-01	17,1	8,50E-01	24,2
Aténolol	2,93E-02	22,2	2,56E-01	28,7
Bétabolol	3,57E-02	16,9	2,12E-01	17,2
Bisoprolol	1,87E-01	13,8	9,71E-01	18,5
Cartéolol	1,41E-01	15,0	9,59E-01	36,6
Carvédilol	1,42E-02	34,2	1,41E-01	32,5
Céliprolol	1,74E-01	15,9	1,11E+00	20,0
Esmolol	9,14E-02	19,3	5,27E-01	18,5
Labétolol	3,46E-02	22,4	1,97E-01	16,4
Métoprolol	5,46E-02	8,0	2,88E-01	19,3
Nadolol	1,05E-01	11,6	6,61E-01	27,1
Néбиволol	2,82E-02	41,8	2,99E-01	19,8
Oxprenolol	5,34E-02	15,7	3,60E-01	17,2
Pindolol	1,43E-01	20,6	9,50E-01	25,3
Propranolol	3,67E-02	17,4	1,73E-01	15,1
Sotalol	4,11E-02	62,7	4,17E-01	35,7
Tertalolol	2,45E-01	12,9	1,53E+00	17,1
Timolol	1,11E-01	14,4	4,80E-01	24,4
Diltiazem	2,46E-01	22,3	1,62E+00	35,3
Lercanidipine	5,12E-01	22,3	4,12E+00	47,1
Nifédipine	1,95E-01	23,3	1,42E+00	43,2
Vérapamil	3,64E-01	18,3	2,77E+00	39,0

Molécules	Moy. [A M/A EI] 100 ng/mL	CV (%)	Moy. [A M/A EI] 1000 ng/mL	CV (%)
Metformine	5,42E-01	18,5	3,28E+00	14,1
Ajmaline	7,47E-02	29,9	5,08E-01	26,1
Amiodarone	7,16E-02	12,7	7,43E-01	8,1
Cibenzoline	1,84E-01	18,4	1,56E+00	8,4
Disopyramide	6,33E-01	22,9	4,10E+00	14,6
Flécainide	1,65E-01	19,3	1,29E+00	17,8
Lidocaïne	2,87E-01	21,5	2,46E+00	16,4
Mexilétine	4,58E-02	22,4	2,58E-01	39,1
Propafénone	2,51E-01	21,3	2,06E+00	16,4
Spartéine	6,08E-01	23,4	4,33E+00	29,9

Moy. A M/A EI : rapport des aires Molécules / étalon interne (SKF-525) ; CV : coefficient de variation

Les CV des TR et de la pureté des spectres sont tous inférieurs à 20 % (tableau XII).

Tableau XII : Fidélité intermédiaire : moyennes et coefficients de variation des temps de rétention et puretés à 100 et 1000 ng/mL

Molécules	Concentration : 100 ng/mL				Concentration : 1000 ng/mL			
	Moy. TR (min.)	CV (%)	Moy. Pureté (%)	CV (%)	Moy. TR (min.)	CV (%)	Moy. Pureté (%)	CV (%)
Acébutolol	3,96	0,6	86,0	1,7	3,94	1,1	87,1	7,0
Aténolol	1,17	6,4	94,2	1,1	0,79	8,3	96,4	3,7
Bétaxolol	5,67	1,1	92,0	2,2	5,66	1,0	87,8	5,3
Bisoprolol	5,02	0,8	95,1	2,6	5,00	0,8	98,5	0,9
Cartéolol	3,00	3,8	71,5	17,6	2,94	6,1	94,2	4,4
CarvEdilol	7,05	0,7	93,6	3,2	7,05	0,8	93,2	5,2
Céliprolol	4,64	0,7	92,4	3,0	4,62	1,1	93,1	4,1
Esmolol	4,71	0,8	95,6	2,0	4,71	1,0	97,4	0,8
Labétolol	5,15	1,0	91,5	4,6	5,14	0,9	96,0	1,3
Métoprolol	4,24	0,9	91,4	2,2	4,22	0,9	88,1	6,1
Nadolol	3,00	0,9	84,2	4,9	2,96	0,8	91,8	1,1
Néбиволol	7,58	0,7	96,7	0,6	7,58	1,0	93,8	7,0
Oxprénolol	5,12	0,9	87,6	0,8	5,11	1,0	96,7	2,9
Pindolol	3,59	0,6	90,4	2,3	3,57	0,9	93,7	0,8
Propranolol	5,95	1,0	71,9	4,6	5,95	1,0	89,1	2,3
Sotalol	1,26	19,3	82,4	3,5	1,29	19,5	97,5	1,7
Tertalolol	5,89	1,0	95,9	1,9	5,87	1,1	95,9	1,8
Timolol	4,07	0,6	95,3	3,2	4,06	1,0	99,4	0,6
Diltiazem	6,45	0,3	91,0	2,9	6,48	0,9	73,7	14,2
Lercanidipine	10,17	0,4	80,7	8,0	10,17	0,9	82,1	11,5
Nicardipine	7,53	0,4	99,3	0,9	7,57	0,8	90,7	2,4
Vérapamil	7,77	0,4	85,3	4,2	7,80	0,8	74,3	11,1
Metformine	0,68	14,8	79,3	9,3	0,64	3,9	84,9	7,1
Ajmaline	4,67	1,1	98,7	1,3	4,66	0,9	78,8	10,7
Amiodarone	10,78	0,8	100,0	0,0	10,77	1,0	96,2	2,9
Cibenzoline	5,97	1,2	93,5	3,7	5,93	0,9	ND	ND

Molécules	Concentration : 100 ng/mL				Concentration : 1000 ng/mL			
	Moy. TR (min.)	CV (%)	Moy. Pureté (%)	CV (%)	Moy. TR (min.)	CV (%)	Moy. Pureté (%)	CV (%)
Disopyramide	5,17	1,2	97,8	0,7	5,14	1,1	90,4	6,6
Flécaïnide	7,09	1,0	97,0	2,6	7,09	0,9	86,1	11,2
Lidocaïne	4,00	1,7	90,0	3,9	3,97	1,2	95,6	4,4
Mexilétine	4,50	1,1	59,9	16,7	4,47	0,7	91,3	3,8
Propafénone	7,08	0,9	99,4	0,3	7,08	0,9	83,9	7,9
Spartéine	3,42	2,5	94,6	1,3	3,06	8,0	80,6	9,0

Moy. : moyenne; TR : temps de rétention ; CV : coefficient de variation

Les puretés moyennes retrouvée à 100 et 1000 ng/mL sont respectivement de 89,8 % (min : 59,9 % ; max : 100 %) et 90,3 % (min : 73,7 % ; max : 99,4 %). La pureté moyenne de la mexilétine à 100 ng/mL est de 59,9 %. Ceci s'explique par un spectre pauvre aux faibles concentrations. Nous avons tout de même gardé cette molécule malgré une pureté inférieure à 70 %.

Suite à ces résultats non satisfaisant de fidélité intermédiaire, nous avons testé 3 autres techniques d'extraction (Ostro[®], Phree[®], et Isolute SLE+[®])

Ces trois méthodes ont été comparées avec la technique de précipitation de protéines à l'acétonitrile pour répondre au manque de reproductibilité établi précédemment (tableau XIII).

Tableau XIII : Comparaison des coefficients de variation du rapport [aire molécule/aire étalon interne] à 10, 100 et 1000 ng/mL entre la technique de précipitation de protéines et les techniques Phree® Ostro® et Isolute SLE+®

	Ostro®	Phree®	Isolute® SLE+	Précipitation de protéine
10 ng/mL				
Aténolol	ND	ND	ND	ND
Bisoprolol	11,46%	12,13%	ND	14,84%
Sotalol	ND	ND	ND	ND
Nadolol	ND	ND	ND	ND
Diltiazem	45,37%	39,39%	ND	42,03%
Lercanidipine	39,54%	ND	23,72%	42,56%
Vérapamil	66,75%	51,38%	65,07%	32,59%
Amiodarone	ND	ND	ND	ND
Colchicine	ND	ND	ND	ND
Néбиволol	ND	30,61%	ND	ND
100 ng/mL				
Aténolol	22,90%	ND	ND	22,24%
Bisoprolol	14,39%	13,54%	64,74%	13,81%
Sotalol	13,93%	14,83%	ND	62,68%
Nadolol	23,73%	38,14%	ND	11,58%
Diltiazem	17,77%	16,25%	48,98%	22,32%
Lercanidipine	18,37%	10,56%	40,45%	22,31%
Vérapamil	13,61%	13,50%	36,11%	18,29%
Amiodarone	31,53%	41,94%	ND	12,75%
Colchicine	14,21%	32,62%	ND	24,70%
Néбиволol	19,83%	10,15%	31,95%	41,78%
1000 ng/mL				
Aténolol	13,91%	11,81%	ND	28,74%
Bisoprolol	14,06%	15,43%	38,52%	18,46%
Sotalol	21,14%	5,13%	ND	35,65%
Nadolol	23,33%	24,48%	ND	27,05%
Diltiazem	17,44%	9,68%	25,30%	14,48%
Lercanidipine	11,41%	10,72%	27,64%	27,11%
Vérapamil	8,28%	9,07%	31,67%	9,24%
Amiodarone	25,75%	32,14%	37,81%	8,13%
Colchicine	15,43%	10,74%	64,45%	19,82%
Néбиволol	14,35%	8,92%	23,22%	19,76%

ND : non déterminé

La technique Isolute SLE+[®] s'est montrée la plus sélective mais le fournisseur préconise une utilisation en milieu acide, basique et neutre pour extraire le maximum de composés. Les techniques Phree[®] et Ostro[®] se sont révélées très rapides (10 minutes de préparation) et très propres (diminution du bruit de fond sur les acquisitions). Les CV du rapport [aire molécules/aire étalon interne] obtenus avec ces 3 techniques se sont révélés très variables d'un composé à l'autre et d'une technique à l'autre. Le gain apporté n'a donc pas été suffisamment significatif pour que nous décidions de basculer sur l'une de ces méthodes (également plus coûteuses) pour remplacer la simple précipitation de protéine adoptée au départ.

2.6. Comparaison de méthodes

Cette technique de criblage toxicologique par CLHP-SM/SM a été comparée à la technique de criblage toxicologique par CLHP-BD utilisée en première intention au laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Grenoble. Trente échantillons de sérum positifs issus des demandes de criblage toxicologique par les unités de soins et analysés par CLHP-BD ont été rétrospectivement analysés. Finalement, 131 composés ont été identifiés par les deux méthodes : 74 % détectés en CLHP-BD versus 73,3 % en CLHP-SM/SM. 54,2 % des composés étaient identifiés par les deux méthodes (figure 27).

Cette méthode de criblage toxicologique a permis d'identifier 17 molécules non retrouvées en CLHP-BD. Dix-huit composés n'ont pas été détectés par la technique CLHP-SM/SM. Dix de ces composés n'ont pas été testés (desméthylclobazam, étifoxine, étomidate, laudanosine, lévétiracétam, phénobarbital, propofol, tramadol, trimébutine, zopiclone). Pour les autres, la concentration retrouvée en CLHP-BD est inférieure à la limite de détection ou la molécule est considérée comme non détectable (fluoxétine, olanzapine).

<u>CLHP-SM/SM (73,30%)</u>			
Kétamine (1)	Prazépam (1)	Irbesartan (1)	Lidocaïne(9)
Amiodarone (1)	Aténolol (1)	Bumétanide (1)	Cétirizine (1)
Clobazam (1)	Gliclazide (2)	Heptaminol (1)	Metformine (2)
Métronidazole (2)	Nicardipine (1)	Ofloxacine (1)	Paracétamol (8)
Urapidil (1)			
<u>CLHP-SM/SM et CLHP-BD (54,2%)</u>			
Alprazolam (4)	Amitriptyline (1)	Amoxapine (1)	Bisoprolol (3)
Bromazépam (6)	Cétirizine (1)	Clobazam (1)	Clomipramine (1)
DDP (2)	Diazépam (3)	Indapamide (1)	Kétamine (1)
Lévomépromazine (2)	Lidocaïne (3)	Lormétazépam	Méthodone (1)
Midazolam (2)	Mirtazapine (4)	Ofloxacine	Oxazépam (2)
Paracétamol (1)	Paroxétine (1)	phénytoïne (1)	Primidone (1)
Propranolol (1)	Rispéridone (1)	Tétrazépam (1)	Trimetoprim (1)
Urapidil (1)	Venlafaxine (2)	Zolpidem (1)	Zopiclone (1)
<u>CLHP-BD (74%)</u>			
Desméthyldiazépam (2)	Laudanosine (4)	Citalopram (2)	Cyamémazine (4)
Desmethyloclobazam (1)	Diazépam (1)	Etifoxine (1)	Etomidate (1)
Fluoxétine (3)	Lévétiracétam(1)	Olanzapine (1)	Propofol (3)
Phénobarbital (1)	Rispéridone (1)	Tramadol (1)	Trimébutine (1)
Zolpidem (3)	Zopiclone (2)		

Figure 27 : Détails des composés détectés en CLHP-BD et CLHP-SM/SM (nombre d'occurrences)

3. Discussion

3.1. Avantages

L'objectif principal de ce premier travail était d'élargir par une technique CLHP-SM/SM nos capacités de détection de médicaments ou de toxiques pour lesquels nos deux techniques de criblages toxicologiques initiales, à savoir la CLHP-BD et la CPG-SM, présentaient des limites.

A partir d'une méthode commercialisée « validée » mais en adaptant l'étape de préparation des échantillons, nous avons testé la sensibilité de 146 composés.

La validation d'une méthode de criblage toxicologique reste difficile à réaliser notamment par le nombre important de composés identifiables (4)(23)(40) et en l'absence de recommandations précises du COFRAC. Avec une banque de données initialement composée de 700 transitions MRM, incrémentée par la suite à 729 transitions MRM, nous n'avons testé que 146 molécules. Ces dernières nous semblaient prioritaires de par leur manque de sensibilité en techniques de CLHP-BD et CPG-SM ou de leur fréquence d'utilisation lors d'IMV (13)(41)(42). La plupart des techniques de recherche large de toxiques publiées récemment sont validées par la détermination de la variation du TR d'un nombre limité de composés ainsi que par la détermination de la limite de détection d'une partie ou de tous les composés. Dulaurent et al. (33), sur une recherche large de pesticides dans le sang (320 pesticides) effectuent les mesures de répétabilité et de fidélité intermédiaire sur un pool de 6 pesticides et déterminent la limite de détection des 320 pesticides. Lee et al. (34) les réalisent sur un pool de 29 composés pour une méthode qui en détecte plus de 300. Enfin Liu et al. dans une première méthode n'estiment que la limite de détection de 24 composés pour une méthode en détectant 780 (32). Dans une seconde méthode, ils procèdent de la même façon pour 30 benzodiazépines (43).

Nous nous sommes donc basés sur l'ensemble de ces expériences, sur les recommandations du COFRAC et de la SFTA. A partir d'une bibliothèque de 729 transitions MRM, nous avons donc validé qualitativement cette technique de criblage toxicologique sur un pool de 32 composés, ces molécules étant les toxiques que nous voulions détecter en priorité.

Les coefficients de variation des TR et de pureté des spectres étaient inférieurs à 20 % pour ces composés aussi bien pour les mesures de répétabilité que de fidélité intermédiaire. Nous nous sommes tenus de déterminer les limites de détection de tous les composés testés et retenus pour notre méthode. Cette limite de détection ou plutôt d'identification a été réalisée sans tenir compte du rapport signal/ bruit, comme on peut le voir régulièrement dans les méthodes de recherche large de toxiques (33)[34](38)(43). La LOI était inférieure aux concentrations toxiques exceptées pour 5 composés que sont l'alprazolam, l'amlodipine, la colchicine, le fentanyl et le LSD. Les faibles sensibilités de la méthode pour la détection de l'amlodipine et du fentanyl ne s'avèrent pas satisfaisantes car ces molécules faisaient parties de celles peu détectables en CLHP-BD, tout comme le fentanyl.

En revanche, ce criblage toxicologique nous permet aujourd'hui de détecter avec une sensibilité suffisante la metformine, le baclofène, la lercanidipine, le sotalol, le nadolol, l'aténolol, le cartéolol, l'acébutolol, le labétalol et les antiarythmiques, autant de molécules qui ne sont pas ou peu identifiables en CLHP-BD. D'autre part, la haute spécificité SM/SM permet de distinguer des composés tels que la venlafaxine et le bisoprolol qui présentent des TR et spectres d'absorptions identiques dans notre méthode de CLHP-BD.

Outre la validation des composés mal ou non détectés en CLHP-BD, cette nouvelle technique offre la possibilité d'un criblage toxicologique rapide, avec un volume d'échantillon réduit (100 μ L), permettant de détecter la majorité des toxiques retrouvés dans les IMV. Ceci en

fait une méthode complémentaire et intéressante de notre criblage toxicologique par CLHP-BD ou éventuellement une alternative en cas de maintenance. Le temps de réalisation assez court (45 minutes) est en adéquation avec les disponibilités de l'appareil. En effet, l'API 3200 QTRAP n'est pas un appareil dédié aux criblages toxicologiques. La rapidité de la technique de préparation des échantillons était un critère majeur de sélection.

La comparaison de méthodes avec la technique de CLHP-BD a permis de démontrer la complémentarité de ces deux criblages toxicologiques. Sur 30 échantillons positifs, 17 molécules n'ont pas été détectées par la technique CLHP-BD. Six de ces molécules n'étaient pas détectables par cette technique (irbésartan, bumétamide, gliclazide, heptaminol, metformine, nicardipine) du fait d'une faible absorbance dans l'UV ou de la sélectivité de la technique d'extraction utilisée pour ce criblage toxicologique (extraction à pH basique).

Les 11 autres sont couramment retrouvées par ce criblage toxicologique. Cette non détection pourrait être due au phénomène de coélution ou à une LOD moins bonne qu'en CLHP-SM/SM.

Par ailleurs, 18 composés n'ont pas été détectés par la technique CLHP-SM/SM. Neuf de ces composés n'ont pas été testés (desméthylclobazam, étifoxine, étomidate, laudanosine, lévétiracétam, phénobarbital, propofol, tramadol, trimébutine, zopiclone). Pour les autres, la concentration retrouvée en CLHP-BD était inférieure à la limite de détection ou la molécule était considérée comme non détectable (fluoxétine, olanzapine). Ceci confirme qu'il faut améliorer régulièrement la banque de transitions (optimisation des paramètres « produits » par infusion) et la bibliothèque de spectres (incrémentation de la bibliothèque avec des spectres de masse « maison »).

3.2. Limites

Malgré l'utilisation d'une technique d'extraction non sélective, certains composés restent peu sensibles ou non détectables par cette méthode de criblage toxicologique. Sur 146 composés testés, 21 ont été considérés comme non détectables ou peu sensibles. Des composés comme l'amitriptyline, la nortriptyline ou la protriptyline, qui présentent des TR et spectres de masse EPI très proches restent difficilement différenciables.

C'est principalement par les résultats de fidélité intermédiaire du rapport « aire molécule/aire EI » que cette technique de MTS a montré ses limites. Tout comme l'avait démontré Dresen et al. (27), le dosage quantitatif et semi quantitatif reste difficilement applicable sans l'aide d'étalons internes analogues isotopiquement marqués. En effet, même si les résultats de répétabilité sont assez prometteurs (27 composés avec un CV inférieur à 20%), les résultats de fidélité intermédiaire le sont beaucoup moins avec 50 % des molécules ayant un CV supérieur à 20 %. Ces résultats non satisfaisants de fidélité intermédiaire peuvent s'expliquer en partie par les effets matrices régulièrement rencontrés avec les techniques de précipitation de protéines (44) et d'ionisation de type électrospray (suppression ionique). L'utilisation de techniques dites de « phospholipide removal », permettant une diminution de ces effets matrices, s'est révélée partiellement satisfaisante : elles permettent une diminution nette du bruit de fond mais les résultats de fidélité intermédiaire restent mitigés.

Il apparaît clairement que les techniques de criblage toxicologique dites « clé en mains » doivent être validées lorsqu'elles sont installées dans les laboratoires. On s'aperçoit que la différence des TR moyen est de 0,8 min. Pourtant, les TR ont été corrigés par la société ABSciex à deux reprises. Les TR doivent donc être systématiquement vérifiés, d'autant plus qu'ils représentent est l'un des critères de sélection.

Le manque de reproductibilité inter-appareil dans la production de spectres de masse est décrit (45). Il empêche la diffusion d'une bibliothèque de spectre universelle. Pour cette raison, nous avons dû incrémenter un spectre de masse pour 49 % des molécules testées et initialement présentes dans la banque de transition MRM.

En revanche, la reproductibilité sur un même appareil demeure satisfaisante et nous permet d'identifier d'une injection à l'autre des composés de façon fiable.

3.3. Perspectives

Certaines molécules restent encore à tester. Nous pensons notamment au tramadol, au zopiclone, aux antiépileptiques, à la chloroquine ou à la quinine. Il reste encore d'autres classes thérapeutiques à vérifier comme les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC), les antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II ou les sulfamides hypoglycémiantes.

Il serait également intéressant d'évaluer les effets matrices sur un pool de molécules de propriétés physico-chimiques différentes et réparties le long de l'acquisition.

D'abord très motivé par la perspective de la mise en place d'un criblage toxicologique 24h/24h, je suis aujourd'hui plus sceptique quant à la possibilité et l'intérêt de celui-ci. La technique demande une certaine expérience des systèmes de chromatographie et de spectrométrie de masse, ce qui, en mon sens, ne peut s'acquérir en quelques journées de formation à la garde. De plus l'interface informatique reste très délicate et sensible.

On peut également se poser la question suivante : la mise en place d'un screening 24h/24h n'aurait-elle pas pour effet d'augmenter les prescriptions ?

Etude de l'utilisation des résultats des criblages toxicologiques dans les services de réanimation et d'urgences du CHU de Grenoble. 1^{er} juillet – 31 décembre 2012

1. Matériels et méthodes

1.1. Analyse rétrospective

Nous avons initialement réalisé une analyse rétrospective des demandes de criblage toxicologique, provenant des services de réanimation médicale et d'accueil des urgences du CHU de Grenoble du 1^{er} juillet 2010 au 30 juin 2011. Ces demandes ont été extraites de la base de données du laboratoire (logiciel synergie).

Les principaux objectifs étaient de répertorier les contextes dans lesquels des demandes de criblages toxicologiques sont prescrites et d'évaluer leur justification. Après concertation pluridisciplinaire et en se référant aux recommandations actuelles (6)(5)(7), les contextes considérés comme justifiés étaient : une absence d'orientation précise (coma inexpliqué, état de mal épileptique, troubles cardiovasculaires et/ou hémodynamique, dégradation de l'état du patient) ; les intoxications médicamenteuses volontaires (IMV) graves avérées ou suspectées (IMV avec symptomatologie initiale grave ; IMV avec antécédents psychiatriques, d'IMV ou de toxicomanie ; quantification d'un toxique suspecté ; incohérence symptomatologie/toxique suspecté) et les contextes médico-légaux. L'utilité diagnostique des résultats toxicologiques a ensuite été évaluée selon les critères suivants : diagnostic d'une étiologie toxique, exclusion d'une étiologie toxique, confirmation de l'intoxication, identification de toxiques autres que ceux suspectés, absence d'utilité.

Etant donné la difficulté d'évaluer de manière objective l'utilité des criblages toxicologiques, et l'impossibilité d'affirmer une modification de prise en charge du patient à la suite de cette étude rétrospective, nous avons réalisé secondairement, et sur le même principe, une étude prospective des demandes de criblage toxicologique s'étendant à tous les services de réanimation et d'accueil des urgences.

1.2. Analyse prospective

Chaque prescription de recherche large de toxiques est validée après concertation clinico-biologique téléphonique, selon les justifications définies lors de l'étude rétrospective. Les informations cliniques sont obtenues, au moment de la demande, auprès du médecin prescripteur. Toute prescription réalisée pendant le service de garde est systématiquement réévaluée pendant les heures ouvrables du laboratoire. Sont exclues les demandes définies comme non justifiées : absence de critères de gravité, de contexte médico-légal ou délai trop important entre la demande et la réalisation de l'analyse (criblages toxicologiques non effectués pendant le service de garde).

Les données cliniques recueillies sont l'âge, le sexe, les antécédents médicaux et le traitement en cours, le score de Glasgow, les résultats d'imagerie médicale réalisée. Dans un contexte d'IMV, les données suivantes sont colligées : toxiques et quantités supposés ingérés, les critères cliniques de gravité transmis par le médecin prescripteur et la prise en charge initiale.

La technique par CLHP-BD est utilisée en première intention pour l'analyse des échantillons biologiques. Les méthodes par CPG-SM ou CLHP-SM/SM sont choisies en fonction des toxiques suspectés et de la symptomatologie clinique.

Chaque résultat, positif ou négatif, est transmis au médecin prescripteur ou référent. Il lui est alors demandé l'utilité de ces derniers et s'il y a lieu ou non à une modification de la prise en charge du patient : maintien ou sortie du service, maintien ou arrêt des moyens thérapeutiques

engagés, réalisation ou annulation d'examens complémentaires (essentiellement radiographiques ou toxicologiques).

Cette étude a reçu un avis favorable du Comité d'Ethique du Centre d'Investigations Cliniques de l'inter-région Rhône Alpes (numéro IRN 2012-10).

2. Résultats

2.1. Analyse rétrospective

2.1.1. Données cliniques

Quatre-vingt seize demandes ont été extraites de la base de données du laboratoire : 80 provenant de la réanimation médicale et 16 du Service d'Accueil des Urgences (SAU) (tableau XIV)

Tableau XIV : Données cliniques des demandes de criblages toxicologiques

	Réanimation médicale (n=80)	SAU (n=16)	Toute demande confondue (n=96)
Sexe ratio H/F	47/33	9/7	56/40
Age médian (rang)	49,5 (19-85)	50,8 (21-89)	49 (18-89)
ATCD psychiatriques	66,2 % (53)	68,7 % (11)	66,6 % (64)
ATCD IMV	31,2 % (25)	43,7 % (7)	33,3 % (32)
ATCD alcoolisme/toxicomanie	31,2 % (25)	18,7 % (3)	29,2 % (28)
Pathologies chroniques	58,7 % (47)	56,2 % (9)	58,3 % (56)
Score de Glasgow médian	6 (3-15) (n=80)	9 (5-12) (n=5)	6 (3-15) (n=85)
>7	67,5 % (54)	60% (3)	67 % (57)
< ou = à 7	32,5 % (26)	40 % (2)	32,9 % (28)

La majorité des patients, pour lesquels une demande de criblage toxicologique était prescrite, était connu pour des antécédents psychiatriques (66,6 % des cas). Des antécédents d'IMV/TS (tentative de suicide) étaient retrouvés dans 33,3 % des cas, des antécédents d'alcoolisme ou de toxicomanie dans 29,2 % des cas. Un tiers des patients présentait un score de Glasgow inférieur ou égal à 7. L'âge médian était de 49 ans, et le sexe ratio d'environ 3 hommes pour 2 femmes.

2.1.2. Justification des prescriptions

Les absences d'orientation précise devant une symptomatologie clinique et les IMV graves constituent chacune environ un tiers des prescriptions (figure 28). Les contextes médico-légaux ne représentent quant à eux qu'une faible proportion des demandes (5,2%).

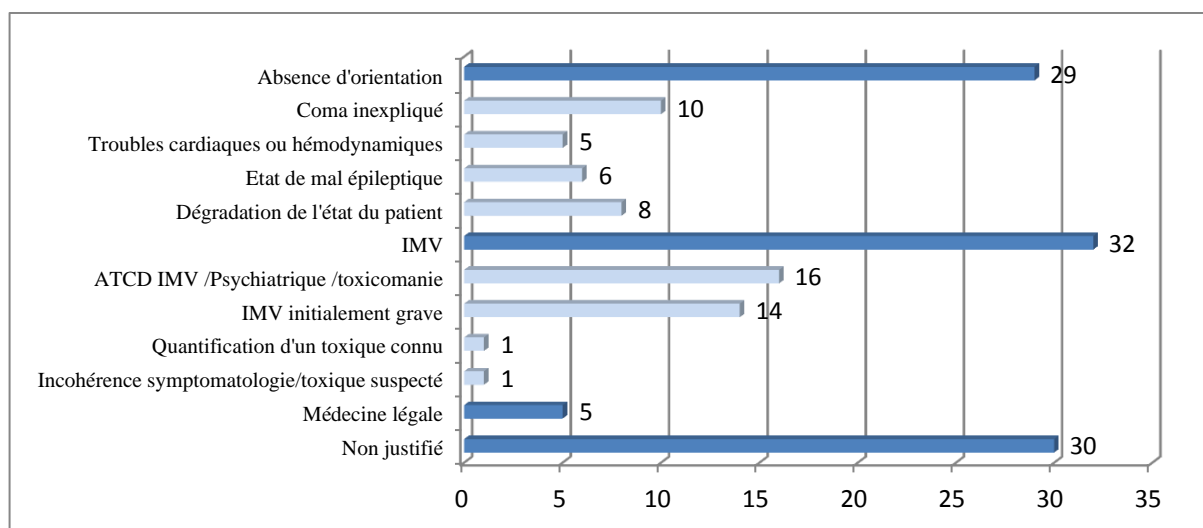


Figure 28 : Indications des demandes des criblages toxicologiques

(Etude rétrospective juillet 2010 à juin 2011)

Les trois indications principales que sont le coma inexpliqué, les IMV initialement graves, et les IMV graves chez des patients présentant des antécédents psychiatriques représentent plus de 40% des demandes. Dans plus de 30 % des cas, ces criblages toxicologiques sont qualifiés de non justifiés au regard des recommandations de la SFMU et de la SFRL (6)(5). Ces demandes

étaient réalisées dans des contextes d'IMV sans critère de gravité, de décompensation sur pathologie chronique connue. Dans d'autres cas, le délai entre la demande et la réalisation de l'analyse était trop important.

Cinquante pour cent des prescriptions provenant du Service d'Accueil des Urgences étaient considérées comme non justifiées (tableau XV).

Tableau XV Indications des demandes de criblage toxicologique dans les services de réanimation médicale et d'accueil des urgences. Etude rétrospective, juillet 2010 à juin 2011.

	Réanimation médicale (n=80)	SAU (n=16)	Toutes demandes confondues (n=96)
Absence d'orientation (n=29)	32,5% (26)	18,75% (3)	30,25% (29)
Coma inexpliqué	38,5 % (10)	0	34,5 % (10)
Troubles cardiaques et/ou hémodynamiques	19,2 % (5)	0	17,2 % (5)
Etat de mal épileptique	19,2 % (5)	33,3 % (1)	20,7 % (6)
Dégradation de l'état du patient	23,1 % (6)	66,6 % (2)	27,6 % (8)
IMV (n=32)	37,5 % (30)	12,5 % (2)	33,3% (32)
Symptomatologie initiale grave	43,3 % (13)	50 % (1)	43,7 % (14)
ATCD psy et/ou d'IMV et/ou de toxicomanie	53,3 % (16)	0	50 % (16)
Quantification d'un toxique connu/suspecté	3,3% (1)	0	3,1 % (1)
Incohérence symptomatologie/toxique suspecté	0	50 % (1)	3,1 % (1)
Médico-légale (n=5)	2,5% (2)	18,75% (3)	5,2% (5)
Non justifiée (n=30)	27,5% (22)	50% (8)	31,25% (30)

L'évaluation de l'utilité diagnostique et la modification de la prise en charge n'ont pas été évaluées lors de cette étude rétrospective.

2.2. Analyse prospective

2.2.1.Données cliniques

De juillet 2012 à décembre 2012, 82 demandes de criblages toxicologiques ont été envoyées au laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie du CHU de Grenoble. Soixante-trois provenaient des services de réanimation, 19 des urgences pédiatriques et du Services d'Accueil des Urgences. Dix-neuf de ces demandes ont été annulées après concertation avec le médecin prescripteur. Douze de ces demandes étaient non justifiées : 2 pour décompensation de pathologie chronique ; 4 pour recherche de stupéfiant et 6 pour absence d'orientation ou IMV suspectée, sans critères de gravité. Sept n'ont pas été réalisées du fait du délai trop important entre la demande et la réalisation de l'analyse, le patient étant sorti du service (figure 29).

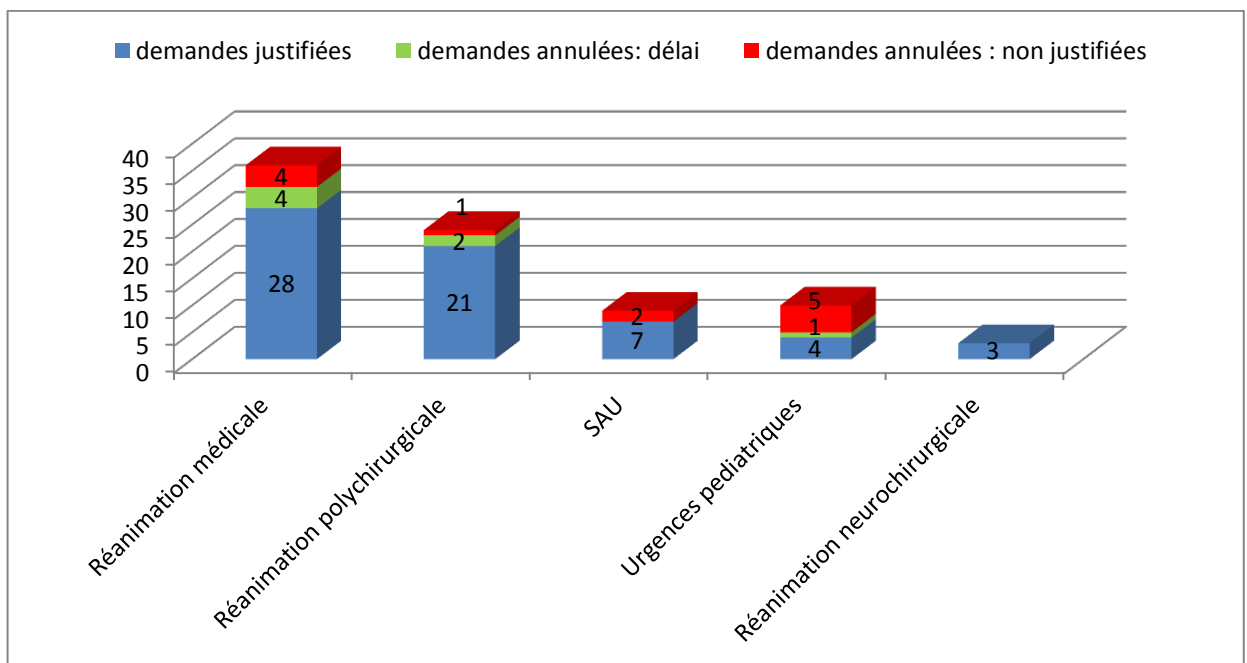


Figure 29 : Demandes de criblage toxicologique par les services de réanimation et d'urgences (Etude prospective 1er juillet 2012 au 31 décembre 2012)

SAU : Service d'accueil des urgences

Les antécédents médicaux étaient connus, au moment de la demande dans 68,2 % des cas. On retrouve dans plus de 30 % des cas des antécédents psychiatriques. Les antécédents de pathologies chroniques n'étaient notifiés que dans 14,3% des demandes. L'âge médian est de 46 ans, le sexe ratio H/F de 1,1, Plus de 50 % des patients des services de réanimation avaient un score de Glasgow inférieur ou égal à 7, à l'inverse des patients des services des urgences (75 % supérieur à 7) (tableau XVI)

Tableau XVI : Données cliniques relatives aux demandes de criblage toxicologique obtenues lors de la réception du prélèvement (Etude prospective 1^{er} juillet 2012 au 31 décembre 2013)

	Service de Réanimation (n=52)	Service des Urgences (n=11)	Total (n=63)
Sexe ratio H/F	27/25	6/5	33/30
Age médian (rang)	46 (16-86)	42 (1-76)	46 (1-86)
ATCD connus	69,2 % (36)	63 % (7)	68,2% (43)
psychiatriques	52,7 % (19)	71,4 % (5)	55,8 % (24)
IMV/TS	47,2 % (17)	14,3 % (1)	41,8 % (18)
Alcoolisme/toxicomanie	25 % (9)	28,6 % (2)	25,6 % (11)
Pathologies chroniques	22,2 % (8)	14,3 % (1)	20,1 % (9)
Score de Glasgow médian (n=57)	7 (2-15) (n=49)	11 (3-15) (n=8)	7 (2-15) (n=57)
>7	42,8 % (21)	75 % (6)	47,4% (27)
< ou = à 7	57,1 % (28)	25 % (2)	52,6% (30)

H : homme ; F : femme ; ATCD : antécédents ; IMV : intoxication médicamenteuse volontaire ; TS : tentative de suicide

2.2.2.Justification des prescriptions

Au total, 32 demandes de recherche large ont été réalisées dans un contexte d'absence d'orientation diagnostique, 26 pour IMV grave et 4 dans des indications médico-légales. (figure 30).

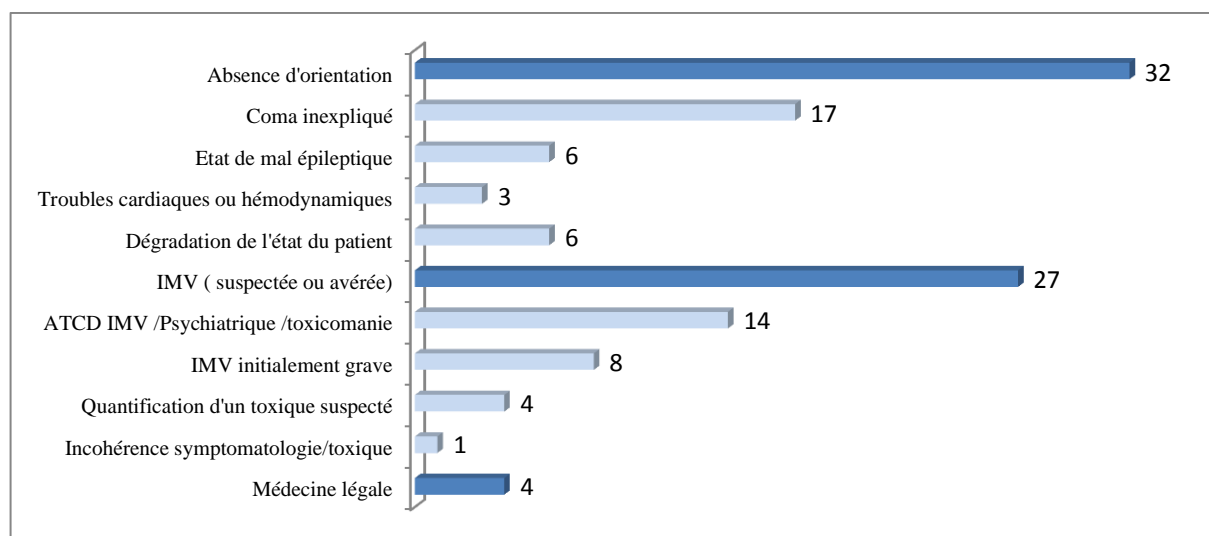


Figure 30 : Indications des demandes des criblages toxicologiques

(Etude prospective 1^{er} juillet 2012 au 31 décembre 2013)

Que ces demandes proviennent des services de réanimation et d'accueil des urgences, elles sont également réparties entre absence d'orientation et IMV grave. Les demandes pour coma inexpliqué et IMV grave avec antécédents représentent près de 50 % des prescriptions (Tableau XVII)

Tableau XVII : Indications des demandes de criblage toxicologique dans les services de réanimation médicale et d'accueil des urgences (Etude prospective 1^{er} juillet 2012 au 31 décembre 2013)

	Service de réanimation (n=52)	Urgences (n=11)	Toutes demandes confondues (n=63)
Absence d'orientation (n=32)	50 % (26)	54,5 % (6)	50,8 % (32)
Coma inexpliqué	53,8% (14)	50 % (3)	53,1 % (17)
Troubles cardiaques et/ou hémodynamiques	7,7 % (2)	16,6 % (1)	9,4 % (3)
Etat de mal	19,2 % (5)	16,6 % (1)	18,7 % (6)
Dégradation de l'état du patient	19,2 % (5)	16,6 % (1)	18,7 % (6)
IMV (n=27)	46,2 % (24)	45,5 % (3)	42,8 % (27)
Symptomatologie initiale grave	33,3 % (8)	0	30,8% (8)
ATCD psychiatriques et/ou d'IMV et/ou de toxicomanie	54,2 % (13)	33,3 % (1)	53,8% (14)
Quantification d'un toxique connu/suspecté	8,3 % (2)	33,3 % (1)	11,1 % (3)
Incohérence symptomatologie/toxique suspecté	4,2 % (1)	33,3 % (1)	7,4 % (2)
Médico-légale (n=4)	3,8 % (2)	18 % (2)	6,4% (4)

Dans 76,5 % des comas inexplicables, 84,6 % étaient accompagnés de résultats d'imagerie cérébrale normaux. Les résultats de scanners ou d'électroencéphalogramme étaient normaux pour 100 % des demandes pour états de mal épileptiques. Dans les contextes d'IMV graves, les toxiques supposés ingérés étaient connus dans 92,6 % des cas. La quantité supposée ingérée et l'heure d'ingestion n'étaient connues que dans 29,6 % des cas. Le traitement chronique était connu dans 77,7% des cas. Concernant la prise en charge initiale, 81,1 % des patients étaient sous ventilation mécanique, 18,5 % ont reçu des amines, 11,1 % un antidote.

Outre le coma profond, les signes cliniques accompagnant ces demandes étaient essentiellement cardiovasculaires et métabolique. Pour 87,5 % des patients hospitalisés en service de réanimation pour IMV grave, un électrocardiogramme (ECG) a été réalisé (tableau XVIII).

Tableau XVIII Renseignements cliniques des demandes de criblage toxicologique pour IMV grave obtenus auprès du clinicien prescripteur (Etude prospective 1^{er} juillet 2012 au 31 décembre 2013)

	Service de réanimation (n=24)	Services des urgences (n=3)	Total (n=27)
Présence d'un toxique suspecté	91,6 % (22)	100 % (3)	92,6 % (25)
Quantité supposée ingérée connue	33,3 % (8)	0	29,6 % (8)
Heure d'ingestion connue	33,3 % (8)	0	29,6 % (8)
Traitement chronique connu	83,3 % (20)	33,3 % (1)	77,7 % (21)
Scores de Glasgow médian	7 (2-14)	8 (8-15)	8 (2-15)
>7	45,8 % (11)	100 % (3)	44,4 % (12)
< ou = à 7	54,1 % (13)	0	48,1 % (13)
Prise en charge initiale			
Intubation/ventilation	91,6 % (22)	0	81,5 % (22)
Administration d'amines	20,8 % (5)	0	18,5 % (5)
Antidotes	12,5 % (3)	0	11,1 % (3)
Symptomatologie clinique			
Troubles neurologiques (hors coma)	16,6 % (4)	0	14,8 % (4)
Troubles cardiovasculaires	37,5 % (9)	0	33,3 % (9)
Troubles respiratoires	20,8 % (5)	0	18,5 % (5)
Troubles métaboliques	41,6 % (10)	0	40 % (10)
Réalisation d'un ECG	87,5 % (21)	1	88 % (22)

ECG : électrocardiogramme.

2.2.3. Résultats toxicologiques

Les recherches de criblage toxicologique ont été réalisées dans 95,2% des cas par technique CLHP-BD. Dans 12,7 % des demandes, plusieurs techniques de recherche large ont été réalisées.

Le délai de rendu de résultats brut était de 18 heures. Le délai jour ouvrable était de 8 heures (tableau XIX).

Tableau XIX Techniques de criblage toxicologique utilisées et délai de rendu de résultats (Etude prospective 1^{er} juillet 2012 au 31 décembre 2013)

	% (nombre de cas ou rang)
Technique de criblage utilisée :	
CLHP-BD	95,2% (60)
CPG-SM	7,9% (5)
CLHP-SM/SM	7,9% (5)
Plusieurs techniques	12,7% (8)
Délais de rendu du résultat (h)	
rendu brut	18 (1,3-77,3)
jours ouvrables	7 (1,3-77,3)

Trente-trois demandes de recherche large de toxiques se sont donc révélées positives. Elles ont mis en évidence 85 molécules dont 36 étaient présentes en concentration toxique. Les benzodiazépines, les médicaments antipsychotiques et les antidépresseurs non tricycliques représentaient plus de 60 % des molécules identifiées. Les molécules cardiotropes (bêta-bloquants, anti-arythmiques, inhibiteurs calciques) représente 6 % des molécules identifiées, les antidépresseurs non tricycliques 10,6 %, les antidépresseurs tricycliques 3,5 %. A noter que le baclofène a été retrouvé dans 5 criblages toxicologiques. (Figure 31).

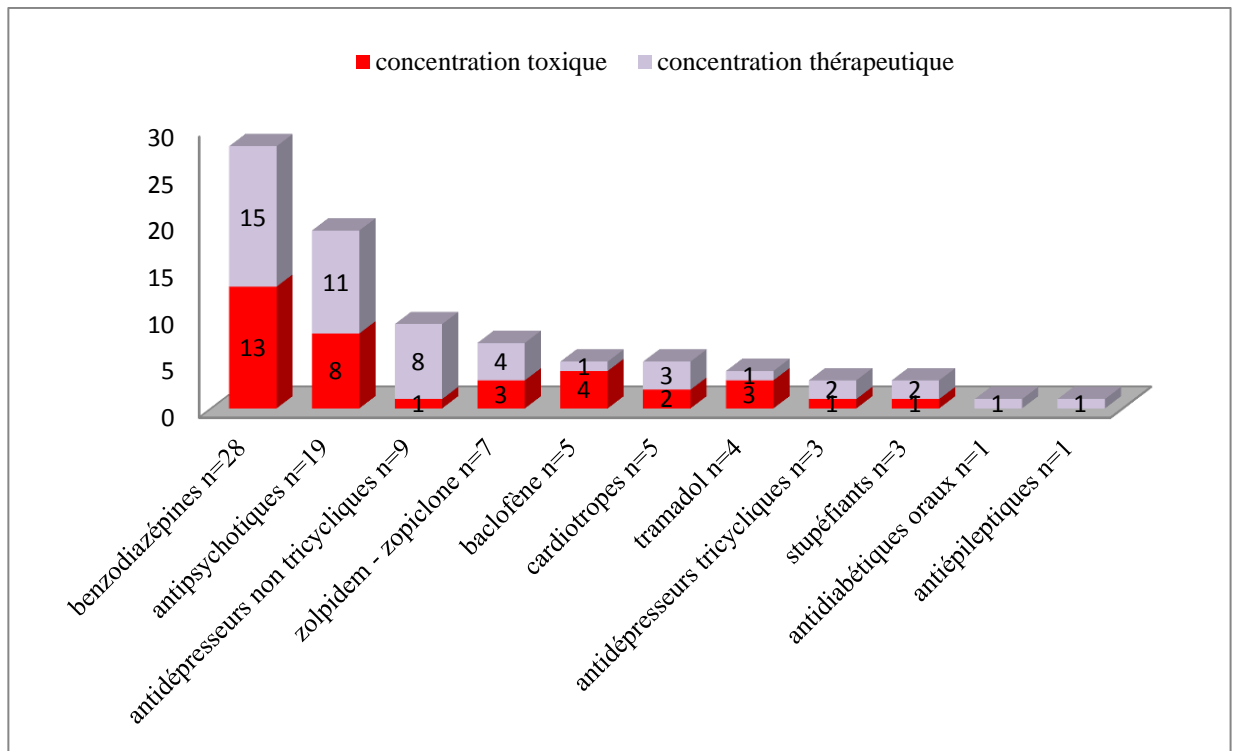


Figure 31 : Molécules retrouvées lors des demandes de criblages toxicologiques positifs.

2.2.4. Utilité du criblage toxicologique

Au cours de cette étude, seulement 3% de ces demandes se sont avérées inutiles, les résultats d'imagerie médicale confirmant le diagnostic d'accident vasculaire cérébral (AVC) avant la transmission des résultats toxicologiques (tableau XX).

Tableau XX Utilité diagnostique des demandes de criblage toxicologique.

	Diagnostic d'une étiologie toxique	Exclusion d'une étiologie toxique	Confirmation d'intoxications	Autres toxiques retrouvés	Absence d'utilité
Absence d'orientation (n=32)	22% (7)	71,8% (23)	0	/	6% (2)
IMV (n=27)	0	3,7 % (1)	81,5 % (22)	14,8 % (4)	0
Médico-légale (n=4)	0	100% (4)	0	/	0
Total	11,1 % (7)	44,4 % (28)	34,9 % (22)	6,3 % (4)	3 % (2)

Ces demandes avaient été prescrites dans un contexte d'absence d'orientation. Vingt-deux pourcent des criblages toxicologiques ont permis d'identifier une étiologie toxique dans un

contexte d'absence d'orientation (intoxication au zolpidem ; acéprométazine ; baclofène ; miansérine ; tramadol ; amlodipine, indapamide et périndopril ; méthadone). Une confirmation d'intoxication a été obtenue pour 81,5 % des demandes pour IMV graves suspectées ou avérées. Une exclusion d'une étiologie toxique a été réalisée dans un cas. Dans 14,8 % des demande dans un contexte d'IMV, des toxiques non suspectés ont été retrouvés à concentrations toxiques (loxapine, desmethyldiazépam, zolpidem, bromazépam).

Dans 11,1 % des cas, les résultats du criblage toxicologique ont entraîné une modification de la prise en charge des patients : une sortie du service de réanimation, un maintien en service de réanimation, une annulation de scanner, un arrêt des sédations, la mise en place d'une épuration extra-rénale, un suivi pharmaco-cinétique et l'annulation d'un suivi psychiatrique (tableau XXI).

Tableau XXI Modification de la prise en charge des patients suite aux résultats de screening toxicologique

	Sortie/maintien dans le service	Modification de la prise en charge thérapeutique	Ajout/annulation d'examen complémentaire
Absence d'orientation (n=32)	2	0	1
IMV (n=27)	1	2	1
Médecine légale (n=4)	0	0	0

3. Discussion

Ces deux études, rétrospective et prospective, ont permis d'analyser 178 demandes de criblages toxicologiques au sein du CHU de Grenoble au cours des années 2011 et 2012. Les demandes de criblage toxicologique concernent majoritairement des indications de coma inexpliqué, d'IMV initialement graves ou d'IMV chez des patients ayant des antécédents psychiatriques.

Les criblages toxicologiques ont toujours été étudiés dans des contextes d'intoxication médicamenteuse volontaire (8)(9)(10)(11). Notre étude rétrospective montre que ces demandes ne représentent que 50 % des prescriptions. L'originalité de cette étude était de partir des demandes de prescriptions de criblages toxicologiques reçues au laboratoire et non pas de réaliser un criblage toxicologique systématique dans les contextes d'intoxications médicamenteuses volontaires afin de réévaluer l'impact du criblage toxicologique dans la prise en charge de ces patients. Le principal objectif était de visualiser les habitudes de prescriptions des criblages toxicologiques des services de réanimation et d'urgences en regard des recommandations actuelles et d'évaluer leur utilité diagnostique et leur impact sur la prise en charge des patients aussi bien dans un contexte d'absence d'orientation que d'IMV graves.

3.1. Analyse rétrospective

De par le caractère rétrospectif de l'analyse, cette étude comporte bien évidemment des biais et des limites. Lors de cette étude, nous avons pu observer que les demandes de criblage toxicologique étaient aussi bien demandées pour absence d'orientation (30,2 % des demandes) que pour IMV (33,3%). Le fait marquant de cette étude est le nombre important de demandes

qualifiées de non justifiées (30,2% des demandes), prescrites dans des contextes d'IMV sans critère de gravité ou dans le cadre de décompensation sur pathologie chronique connue. Il aurait été intéressant de vérifier la présence des résultats des criblages toxicologiques dans le compte rendu d'hospitalisation, pour les demandes justifiées et non justifiées. Wiltbank et al. (46) montraient que le résultat des criblages toxicologiques était absent des dossiers médicaux dans 93 % des cas, mais cette étude rétrospective date de 1974.

Le fait d'avoir analysé les dossiers par un nombre limité d'examineurs peut constituer un biais sur les résultats obtenus et notamment sur les demandes non justifiées. Cependant, au sein du service de réanimation, nous avons réalisé, pour un nombre de dossier limité, une analyse par quatre réanimateurs différents. Les justifications de prescription étaient les mêmes dans plus de 50% des cas, mais les utilités diagnostiques étaient très différentes. Nous n'avons donc retenu que les indications de prescriptions. L'utilisation des résultats de criblages toxicologiques et leur impact sur la modification de la prise en charge ont été étudiés de manière prospective.

3.2. Analyse prospective

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'utilisation des résultats des criblages toxicologiques par les cliniciens des services de réanimation et d'urgence ainsi que l'impact de ces résultats sur la prise en charge du patient.

Les indications de prescription étaient sensiblement les même que lors de l'analyse rétrospective (50,8 % pour absence d'orientation, 42,8 % pour IMV grave avérée ou suspectée, 6,4 % dans un contexte médicaux-légal).

Dans 97% des demandes, les résultats se sont révélés utiles pour le clinicien. Seuls 2 criblages toxicologiques prescrits pour absence d'orientation diagnostique se sont révélés inutiles, le diagnostic d'AVC étant posé avant la transmission des résultats toxicologiques.

Ces criblages toxicologiques ont permis de diagnostiquer une étiologie toxique dans 22% des demandes pour absence d'orientation clinique. Une confirmation d'intoxication a été obtenue pour 81,5 % des demandes pour IMV graves suspectées ou avérées. Il est intéressant de noter que dans 15 % des cas, des molécules non suspectées ont été retrouvés à des concentrations toxiques. Il s'agissait de psychotropes (loxapine, desmethyldiazépan, zolpidem, bromazépan). Un cardiotrope (amiodarone) a été retrouvé mais le dosage quantitatif n'a pas été réalisé. Ces demandes avait été réalisées dans un contexte d'IMV graves et d'antécédents psychiatriques pour une recherche de prise cachée de toxique. Ceci maintient l'intérêt du criblage toxicologique chez les patients présentant une IMV grave et ayant des antécédents psychiatriques et/ou d'IMV et/ou de toxicomanie, en service de réanimation.

La concertation clinico-biologique lors de la demande de criblage toxicologique est indispensables pour une bonne orientation des analyses toxicologiques. Dans cette étude, cette concertation a permis l'annulation de 23,2 % des demandes soit 19 prescriptions. Quatre de ces demandes étaient dues à une mauvaise prescription émanant des services des urgences pédiatriques, 6 pour absence d'orientation ou IMV suspectée sans critères de gravité et 2 pour décompensation de pathologie chronique connue. De plus, une orientation de l'analyse toxicologique a été effectuée dans 14,3% des cas. Ceci confirme l'importance du dialogue clinico-biologique Il doit être maintenu pour toute demande de criblage toxicologique afin de permettre une utilisation raisonné du criblage toxicologique au sein de notre établissement.

Une modification de la prise en charge thérapeutique a été notifiée dans 11,1% des cas, ce qui est légèrement différent de ce que l'on retrouve dans la littérature (0 à 5 %) (8)(9)(10). La plupart des études sont réalisées dans des contextes de suspicions d'IMV pour des patients hospitalisés aux services des urgences. Dans notre étude, seuls 17,5 % des demandes proviennent

de ces services. Fabbri et al. montrent, de façon rétrospective, que le criblage toxicologique peut diminuer l'orientation des patients vers un service de soins intensifs. De façon prospective, cela nous amènerait à réaliser un criblage toxicologique pour la plupart des patients entrant aux urgences pour suspicion d'IMV, ce qui est contradictoire en regards des recommandations actuelles(5)(6)(7).

Enfin, une des limites du criblage toxicologique est le délai de rendu de résultat. En effet, les ces analyses ne sont à l'heure actuelle, réalisées que durant les heures ouvrables du laboratoire de toxicologie. Les demandes faites en garde, ne seront réalisées qu'à partir de 8 heures le jour ouvrable suivant. Le temps moyen de rendu de résultat est de 7 heures à partir de la prise en charge technique du prélèvement (1,3 heures - 77 heures). On peut se poser la question de l'intérêt d'un criblage toxicologique 24 heures sur 24.

THESE SOUTENUE PAR : M. Gautier Szymanski

TITRE : Validation d'une méthode de Multi-Target-Screening par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem et étude de l'utilisation des résultats des criblages toxicologiques dans les services de réanimation et d'urgences du CHU de Grenoble.

CONCLUSION

Le criblage toxicologique est devenu une analyse incontournable des laboratoires de toxicologie hospitalière, aussi bien dans le cadre de la prise en charge des intoxications médicamenteuses graves que dans des situations cliniques où l'anamnèse reste inconnue et l'orientation diagnostique indéfinie. La praticabilité, la sensibilité et la spécificité de ces techniques restent très variables entre elles. La validation de méthode des criblages toxicologiques n'est pour le moment pas définie. Elle reste difficile à réaliser pour tous les composés identifiés (souvent supérieur à 300 molécules).

Nous avons testé 146 molécules en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Cent dix-sept ont pu être détectées et leur limite d'identification déterminée. La validation analytique de cette technique, selon les recommandations du Comité Français d'Accréditation et de la Société française de Toxicologie Analytique a été réalisée sur 32 composés. Cette méthode permet une recherche qualitative mais pas d'approximation semi-quantitative. La comparaison de méthode avec le criblage toxicologique par chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diodes confirme qu'il n'existe pas de système standardisé et que les différentes techniques sont complémentaires les unes des autres.

Dans le cadre d'une étude prospective, nous avons évalué l'utilisation des résultats des criblages toxicologiques dans les services de réanimation et d'urgences du CHU de Grenoble.

Cette étude montre qu'un dialogue clinico-biologique systématique pour les demandes de criblage toxicologique dans ces services a permis de rationaliser les prescriptions (annulation de 23,2 % des demandes). Ces recherches larges de toxiques sont essentiellement utiles pour des diagnostics d'exclusion ou de confirmation d'intoxication. Elles ont permis de diagnostiquer une étiologie toxique dans 22 % des demandes pour absence d'orientation. Des toxiques autres que ceux suspectés initialement ont été retrouvés dans 14,8 % des demandes pour intoxication médicamenteuse volontaire. Seuls 3,2 % des demandes se sont révélés inutiles lors de la transmission des résultats. Les résultats de ces recherches larges de toxiques ont eu une répercussion sur la prise en charge des patients dans 11,1 % des cas.

Dans un contexte d'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme ISO-15189, le toxicologue analyste se doit d'avoir un regard critique sur ces nouvelles méthodes. Le dialogue clinico-biologique est indispensable au biologiste médical pour décider de la stratégie des analyses de toxicologie à mettre en place. Il est la base d'une analyse toxicologique rapide, utile et efficiente.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le 11/3/2013

LE DOYEN



Pr. Christophe Ribuot

LE PRESIDENT DE LA THESE

A handwritten signature in black ink, which appears to read "V. Danel".

Pr. Vincent Danel

Références bibliographiques

1. Capolaghi B, Moulisma M, Houdret N, Baud FJ. Stratégies analytiques en toxicologie d'urgence. *Ann Toxicol Anal.* 2000;12(4):274-281.
2. Chousterman B, Payen D, Mégarbane B, Laprévotte O. Éléments de chromatographie et de spectrométrie de masse à l'usage des cliniciens. *Réanimation.* oct 2010;19(6):593-596.
3. Viette V, Fathi M, Rudaz S, Hochstrasser D, Veuthey J-L. Current role of liquid chromatography coupled to mass spectrometry in clinical toxicology screening methods. *Clin Chem Lab Med.* janv 2011;49(7).
4. Peters FT. Recent advances of liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Clin Biochem.* janv 2011;44(1):54-65.
5. Mégarbane B, Donetti L, Blanc T, Chéron G, Jacobs F. Intoxications graves par médicaments et substances illicites en réanimation. *Réanimation.* oct 2006;15(5):332-342.
6. Nisse P. Le screening toxicologique aux urgences. *Congrès Urgences.* 2010;133-45.
7. Bartoli M, Berny C, Capolaghi B, Danel V, Delahaye A, Desch G, et al. Recommandations pour la prescription, la réalisation et l'interprétation des examens de biologie médicale dans le cadre des intoxications graves. *Immuno-Anal Biol Spécialisée.* mars 2013.
8. Tenenbein M. Do you really need that emergency drug screen? *Clin Toxicol.* avr 2009;47(4):286-291.
9. Kellermann AL, Fihn SD, LoGerfo JP, Copass MK. Impact of drug screening in suspected overdose. *Ann Emerg Med.* nov 1987;16(11):1206-1216.
10. Mahoney JD, Gross PL, Stern TA, Browne BJ, Pollack MH, Reder V, et al. Quantitative serum toxic screening in the management of suspected drug overdose. *Am J Emerg Med.* 1990;8(1):16-22.
11. Fabbri A, Marchesini G, Morselli-Labate AM, Ruggeri S, Fallani M, Melandri R, et al. Comprehensive drug screening in decision making of patients attending the emergency department for suspected drug overdose. *Emerg Med J.* 2003;20(1):25-8.
12. SH-GTA-04.pdf [Internet]. Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
13. Adnet F, Atout S, Galinski M, Lapostolle F. Évolution des intoxications médicamenteuses volontaires en France. *Réanimation.* déc 2005;14(8):721-726.
14. Mohammad M, Vermerie N, Pateron D, Bernot B. Evaluation d'un protocole visant à diminuer la recherche des toxiques dans la prise en charge des intoxications médicamenteuses volontaires vues aux urgences: Evaluation of a protocol designed to optimize toxicological tests after voluntary self-poisoning. *J Eur Urgences.* 2005;18(1):15-9.

15. Tracqui A, Kintz P, Mangin P. Systematic toxicological analysis using HPLC/DAD. *J Forensic Sci.* mars 1995;40(2):254-262.
16. Szymanski G, Bartoli M, Allibe-Signorini N. Baclofène : proposition d'une technique d'identification et de dosage rapide. 20ème Congrès SFTA Chambéry Fr. sept 2012;
17. Turcant A, Premel-Cabic A, Cailleux A, Allain P. Toxicological screening of drugs by microbore high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection and ultraviolet spectral library searches. *Clin Chem.* 1991;37(7):1210-5.
18. Allibe-Signorini N, Berard S, Vincent F, Bessard G, Barret L, Eysseric H. Intérêt d'un logiciel de déconvolution (AMDIS) et d'une détection SIM/SCAN pour le screening toxicologique par CPG-SM. *Ann Toxicol Anal.* 31 janv 2009;20(2):57-65.
19. Pflieger K, Maurer HH, weber A. Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites. Agilent Technologies, Rev.D.04.00; 2002.
20. National Institute of Standards and Technology, NIST. Agilent Technologies; Rev.D.05.00;
21. Maurer HH. Identification and differentiation of barbiturates, other sedative-hypnotics and their metabolites in urine integrated in a general screening procedure using computerized gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr.* 14 sept 1990;530(2):307-326.
22. Peters FT, Jung J, Kraemer T, Maurer HH. Fast, simple, and validated gas chromatographic-mass spectrometric assay for quantification of drugs relevant to diagnosis of brain death in human blood plasma samples. *Ther Drug Monit.* juin 2005;27(3):334-344.
23. Maurer HH. Screening procedures for simultaneous detection of several drug classes used for high throughput toxicological analyses and doping control. A review. *Comb Chem High Throughput Screen.* déc 2000;3(6):467-480.
24. Maurer HH, Peters FT. Toward high-throughput drug screening using mass spectrometry. *Ther Drug Monit.* déc 2005;27(6):686-688.
25. Gross JH. *Mass Spectrometry: A Textbook.* Springer; 2011.
26. IUPAC Disponible sur:
http://amitpatel745.files.wordpress.com/2010/10/iupac_ms_terms_second_draft1.pdf
27. Dresen S, Ferreirós N, Gnann H, Zimmermann R, Weinmann W. Detection and identification of 700 drugs by multi-target screening with a 3200 Q TRAP® LC-MS/MS system and library searching. *Anal Bioanal Chem.* 3 févr 2010;396(7):2425-2434.
28. Mueller CA, Weinmann W, Dresen S, Schreiber A, Gergov M. Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a QTrap liquid chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library searching. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM.* 2005;19(10):1332-1338.

29. Dresen S, Gergov M, Politi L, Halter C, Weinmann W. ESI-MS/MS library of 1,253 compounds for application in forensic and clinical toxicology. *Anal Bioanal Chem.* déc 2009;395(8):2521-2526.
30. Mylonas R, Mauron Y, Masselot A, Binz P-A, Budin N, Fathi M, et al. X-Rank: A Robust Algorithm for Small Molecule Identification Using Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 15 sept 2009;81(18):7604-7610.
31. LHERMITTE M, MAZZEGA S, MOULSMA M, PÉPIN G, PERRIN M, PLESSE J, et al. Aide à la validation des méthodes en Toxicologie et Suivi Thérapeutique Pharmacologique Help for validation of analytical procedures in Toxicology and Therapeutic Drug Monitoring. *Ann Toxicol Anal.* 2005
32. Liu H-C, Liu RH, Ho H-O, Lin D-L. Development of an information-rich LC-MS/MS database for the analysis of drugs in postmortem specimens. *Anal Chem.* 1 nov 2009;81(21):9002-9011.
33. Dulaurent S, Moesch C, Marquet P, Gaulier J-M, Lachâtre G. Screening of pesticides in blood with liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* mars 2010;396(6):2235-2249.
34. Lee HK, Ho CS, Iu YPH, Lai PSJ, Shek CC, Lo Y-C, et al. Development of a broad toxicological screening technique for urine using ultra-performance liquid chromatography and time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 1 sept 2009;649(1):80-90.
35. Poletini A, Gottardo R, Pascali JP, Tagliaro F. Implementation and performance evaluation of a database of chemical formulas for the screening of pharmaco/toxicologically relevant compounds in biological samples using electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* 15 avr 2008;80(8):3050-3057.
36. Liotta E, Gottardo R, Bertaso A, Poletini A. Screening for pharmaco-toxicologically relevant compounds in biosamples using high-resolution mass spectrometry: a « metabolomic » approach to the discrimination between isomers. *J Mass Spectrom JMS.* mars 2010;45(3):261-271.
37. Gergov M, Ojanperä I, Vuori E. Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography–ionspray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring. *J Chromatogr B.* 25 sept 2003;795(1):41-53.
38. Viette V, Guillarme D, Mylonas R, Mauron Y, Fathi M, Rudaz S, et al. A multi-target screening analysis in human plasma using fast liquid chromatography-hybrid tandem mass spectrometry (Part II). *Clin Biochem.* janv 2011;44(1):45-53.
39. Reference blood level list of therapeutic and toxic substances. Disponible sur: http://www.tiaft.org/toxic_values
40. Maurer HH. Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. *Clin Biochem.* avr 2005;38(4):310-318.

41. Quay L, Maignan M, Lumé M, Candille C, Paquier C, Saviuc P. Epidémiologie des intoxications médicamenteuses volontaires accueillies dans un service d'urgences. Congrès Urgences .
42. Baud FJ, Mouhoub Y, Carmona D, Mégarbane B, Deye N. Intoxications médicamenteuses par les antiarythmiques. Sang Thromb Vaiss. 2007;19(1):51-4.
43. Liu H-C, Liu RH, Lin D-L, Ho H-O. Rapid screening and confirmation of drugs and toxic compounds in biological specimens using liquid chromatography/ion trap tandem mass spectrometry and automated library search. Rapid Commun Mass Spectrom. 15 janv 2010;24(1):75-84.
44. Bonfiglio, King, Olah, Merkle. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. Rapid Commun Mass Spectrom RCM. juin 1999;13(12):1175-1185.
45. Jansen R, Lachatre G, Marquet P. LC-MS/MS systematic toxicological analysis: Comparison of MS/MS spectra obtained with different instruments and settings. Clin Biochem. avr 2005;38(4):362-372.
46. Wiltbank TB, Sine HE, Brody B. Are emergency toxicology measurements really used ? Clinical chemistry. 1974;20(2):116_120.

Annexe

Laboratoire fournisseur des produits de références utilisés pour l'évaluation du criblage toxicologique par CLHP-SM/SM.

- **Aztra Zeneca** (métoprolol, propranolol, viloxazine)
- **Cerilliant** (4-méthylthioamphétamine, 6-monoacétylmorphine, benzoylecgonine, cocaéthylène, cocaïne, codéine, codéthyline, dextrométorphan, dextropropoxyphène, dihydrocodéine, diphényldramine, diltiazem, EDDP, ecgonine méthylester, éphédrine, ethyl amphétamine, ethylmorphine, fentanyl, GHB, loratadine, LSD, MBDB, MDA, MDMA, mescaline, méthadone, méthamphétamine, morphine, norpropoxyphène, oxazépam, oxo-LSD, oxycodone, pholcodine, pseudo éphédrine, psilocybine, THC, THC-COOH, THC-OH, témazépam, vérapamil)
- **Cooper** (Scopolamine)
- **Eisai S.A.** (amoxapine, loxapine)
- **Erem Pharma** (Alimémazine, cibenzoline)
- **Finogra S.A.** (Esmolol)
- **Labo Jansen** (haloperidol, pimozide, risperidone)
- **Laboratoire Chauvin** (cartéolol) ; Lipamed (atropine, kétamine)
- **Lundbeck S.A.** (citalopram, flupenthixol, zuclopenthixol)
- **Meda Pharma** (flécaïnide) ; Menarini France (Acépromazine, acéprométazine) ; Merck (fluoxétine, metformine)
- **National measurement institute** (mephedrone)
- **Nepam SARL** (doxépine)
- **Novartis** (nicardipine, pindolol)
- **Nyeth Le derle** (Venlafaxine)
- **Organon** (miansérine, mirtazapine)

- **Pfizer** (amlodipine, sertraline)
- **Phendiag** (nébivolol)
- **PierreFabre** (lercanidipine, milnacipran) ;
- **Sandoz** (clomipramine, imipramine, maprotyline, paroxétine)
- **Sanofi** (amisulpride, chlorpromazine, cyamémazine, fluphénazine, levomepromazine, nadolol, pipothiazine, propériciazine, sultopride, tétrazépam, tipride) ; Servier (tertalolol)
- **Sigma-Aldrich** (amiodarone, amitriptyline, aténolol, bétaxolol, bisoprolol, carvédilol, labétalol, sotalol)
- **Solvay pharma** (fluvoxamine)
- **Teofarma** (dosulépine).

Les autres produits de référence non mentionnés ci-dessus ont été fournis par la pharmacie centrale du CHU de Grenoble.



Serment des Apothicaires



Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

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

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

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Validation d'une méthode de Multi-Target-Screening par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem et étude de l'utilisation des résultats des criblages toxicologiques dans les services de réanimation et d'urgences du CHU de Grenoble

Thèse soutenue par Mr. Gautier Szymanski

Le 24 septembre 2013, Faculté de Pharmacie de Grenoble

Résumé :

Le criblage toxicologique est une analyse incontournable des laboratoires de toxicologie hospitalière, aussi bien dans le cadre de la prise en charge des intoxications médicamenteuses graves que dans des situations cliniques où l'anamnèse reste inconnue et l'orientation diagnostique indéfinie.

Nous avons dans un premier travail validé une méthode de criblage toxicologique par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CLHP-SM/SM). La détermination des limites d'identification a été réalisée pour 117 composés. La variabilité des temps de rétention et des spectres de masse a été évaluée sur un pool de 32 composés. Tous les coefficients de variation analysés étaient inférieurs à 20 %. Ce criblage toxicologique a été validé d'un point de vue qualitatif mais une approche semi-quantitative n'a pu être validée. Le laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie du CHU de Grenoble est aujourd'hui doté d'une troisième méthode de criblage toxicologique, complémentaire de deux autres : CLHP couplée à un détecteur à barrette de diodes (CLHP-BD) et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM).

Nous avons ensuite évalué de manière prospective sur une période de 6 mois, l'utilisation des résultats des criblages toxicologiques dans les services de réanimation et d'accueil des urgences du CHU de Grenoble. Quatre-vingt-deux prescriptions ont ainsi été analysées. Le dialogue clinico-biologique a permis de rationaliser les demandes (23 % des prescriptions annulées). Quatre-vingt-dix-sept pourcent des demandes incluses se sont avérées utiles. Les résultats des criblages toxicologiques ont eu une répercussion sur la prise en charge des patients dans 11,1 % des cas.

Le dialogue clinico-biologique est indispensable au biologiste médical pour décider de la stratégie des analyses de toxicologie à mettre en place. Ce dialogue est la base d'une analyse toxicologique rapide, utile et efficiente.

Mots clés : Criblage toxicologique, CLHP-SM/SM, dialogue clinico-biologique