



HAL
open science

Révision et validation d'une méthode de screening toxicologique semi-quantitative en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Julien Bourgain

► **To cite this version:**

Julien Bourgain. Révision et validation d'une méthode de screening toxicologique semi-quantitative en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Sciences pharmaceutiques. 2022. dumas-04192518

HAL Id: dumas-04192518

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04192518v1>

Submitted on 31 Aug 2023

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.

UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE
UFR SANTE – Département PHARMACIE

Année 2022

N°

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 08 septembre 2022

par

Bourgain Julien

Né le 22/04/1994 à Saint-Martin-Boulogne

**Révision et validation d'une méthode de screening toxicologique
semi-quantitative en chromatographie liquide couplée à la
spectrométrie de masse en tandem**

Président du jury :

Pr. FAVENNEC Loïc, PU-PH

Directeur de Thèse :

Dr. IMBERT Laurent, PH

Membres du Jury :

Dr. WILS Julien, MCU-PH

Dr. LAMOUREUX Fabien, PH

ANNEE UNIVERSITAIRE 2021 - 2022

U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Benoît VEBER**

ASSESSEURS : **Professeur Loïc FAVENNEC**

Professeur Agnès LIARD

Professeur Guillaume SAVOYE

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

M. Frédéric ANSELME	HCN Cardiologie
Mme Gisèle APTER	Havre Pédopsychiatrie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN Chirurgie plastique
M. Jean-Marc BASTE	HCN Chirurgie Thoracique
M. Fabrice BAUER	HCN Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN Biochimie et biologie moléculaire
M. Ygal BENHAMOU	HCN Médecine interne
M. Jacques BENICHOU	HCN Bio statistiques et informatique médicale
M. Olivier BOYER	UFR Immunologie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN Chirurgie Vasculaire
Mme Sophie CANDON	HCN Immunologie
M. François CARON	HCN Maladies infectieuses et tropicales
M. Philippe CHASSAGNE	HCN Médecine interne (gériatrie)
Mr Florian CLATOT	CB Cancérologie – Radiothérapie
M. Moïse COEFFIER	HCN Nutrition
M. Vincent COMPERE	HCN Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
M. Jean-Nicolas CORNU	HCN Urologie

M. Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
M. Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
M. Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
M. Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
M. Stéphane DERREY	HCN	Neurochirurgie
M. Frédéric DI FIORE	CHB	Cancérologie
M. Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
M. Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
M. Bernard DUBRAY	CHB	Radiothérapie
M. Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
M. Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
M. Eric DURAND	HCN	Cardiologie
M. Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
M. Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
M. Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
M. Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mme Julie GUEUDRY	HCN	Ophtalmologie
M. Olivier GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
M. Claude HOUDAYER	HCN	Génétique
M. Fabrice JARDIN	CHB	Hématologie
M. Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
M. Pascal JOLY	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra LAMIA	Havre	Pneumologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
M. Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
M. Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
M. Thierry LEQUERRE	HCN	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
M. Hervé LEVESQUE	HCN	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
M. Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
M. Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie

Mme Isabelle MARIE	HCN Médecine interne
M. Jean-Paul MARIE	HCN Oto-rhino-laryngologie
M. Loïc MARPEAU	HCN Gynécologie - Obstétrique
M. Stéphane MARRET	HCN Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN Epidémiologie
M. Pierre MICHEL	HCN Hépto-gastro-entérologie
M. Benoît MISSET (<i>détachement</i>)	HCN Réanimation Médicale
M. Marc MURAINÉ	HCN Ophtalmologie
M. Christian PFISTER	HCN Urologie
M. Jean-Christophe PLANTIER	HCN Bactériologie - Virologie
M. Didier PLISSONNIER	HCN Chirurgie vasculaire
M. Gaëtan PREVOST	HCN Endocrinologie
M. Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN Réanimation médicale - Médecine d'urgence
M. Vincent RICHARD	UFR Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN Biologie du développement et de la reproduction
M. Horace ROMAN (<i>détachement</i>)	HCN Gynécologie - Obstétrique
M. Jean-Christophe SABOURIN	HCN Anatomie – Pathologie
M. Mathieu SALAUN	HCN Pneumologie
M. Guillaume SAVOYE	HCN Hépto-gastrologie
Mme Céline SAVOYE–COLLET	HCN Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN Pédiatrie
M. Lilian SCHWARZ	HCN Chirurgie Viscérale et Digestive
M. Michel SCOTTE	HCN Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN Thérapeutique
M. Luc THIBERVILLE	HCN Pneumologie
M. Gilles TOURNEL	HCN Médecine Légale
M. Olivier TROST	HCN Anatomie -Chirurgie Maxillo-Faciale
M. Jean-Jacques TUECH	HCN Chirurgie digestive
M. Benoît VEBER	HCN Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
M. Pierre VERA	CHB Biophysique et traitement de l'image
M. Eric VERIN	Les Herbiers Médecine Physique et de Réadaptation
M. Eric VERSPYCK	HCN Gynécologie obstétrique
M. Olivier VITTECOQ	HC Rhumatologie
M. David WALLON	HCN Neurologie
Mme Marie-Laure WELTER	HCN Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Najate ACHAMRAH	HCN Nutrition
Mme Elodie ALESSANDRI-GRADT	HCN Virologie
Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN Bactériologie – Virologie
M. Emmanuel BESNIER	HCN Anesthésiologie - Réanimation
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN Biochimie
M. Gérard BUCHONNET	HCN Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN Neurophysiologie
Mr Damien COSTA	HCN Parasitologie
Me Pierre DECAZES	CB Médecine Nucléaire
M. Vianney GILARD	HCN Neurochirurgie
M. Serge JACQUOT	UFR Immunologie
M. Joël LADNER	HCN Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR Biologie cellulaire
M. Florent MARGUET	HCN Histologie
Mme Chloé MELCHIOR	HCN Gastroentérologie
M. Sébastien MIRANDA	HCN Chirurgie Vasculaire
M. Thomas MOUREZ (<i>détachement</i>)	HCN Virologie
M. Gaël NICOLAS	UFR Génétique
Mme Muriel QUILLARD	HCN Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia ROLLIN	HCN Médecine du Travail
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN Génétique
M. Abdellah TEBANI	HCN Biochimie et Biologie Moléculaire
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN Anatomie
M. Julien WILS	HCN Pharmacologie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

M. Thierry WABLE	UFR Communication
Mme Mélanie AUVRAY-HAMEL	UFR Anglais

II - PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

M. Jérémy BELLIEN (PU-PH)	Pharmacologie
M. Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
M. Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
M. Abdelhakim EL OMRI	Pharmacognosie
M. François ESTOUR	Chimie Organique
M. Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
M. Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite)	Toxicologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
M. Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
M. Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme Margueritta AL ZALLOUHA	Toxicologie
Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
M. Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
M. Thomas CASTANHEIRO MATIAS	Chimie Organique
M. Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Camille CHARBONNIER (LE CLEZIO)	Statistiques
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Dominique DUTERTE- BOUCHER	Pharmacologie
M. Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Nejla EL GHARBI-HAMZA	Chimie analytique
M. Chervin HASSEL	Biochimie et Biologie Moléculaire
Mme Maryline LECOINTRE	Physiologie

Mme Hong LU	Biologie
Mme Marine MALLETER	Toxicologie
M. Jérémie MARTINET (MCU-PH)	Immunologie
M. Romy RAZAKANDRAINIBÉ	Parasitologie
Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT	Chimie analytique
M. Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mme Caroline BERTOUX	Pharmacie
M. Damien SALAUZE	Pharmacie industrielle

PAU-PH

M. Mikaël DAOUPHARS	Pharmacie
M. Pierre BOHN	Radiopharmacie

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
----------------------------	---------

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES

Eric BARAT	Pharmacie
M. Guillaume FEUGRAY	Biochimie Générale
M. Henri GONDÉ	Pharmacie
M. Paul BILLOIR	Hématologie
M. Romain LEGUILLON	Pharmacie
M. Thomas DUFLOT	Pharmacologie
Mme Alice MOISAN	Virologie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mme Chaïma **EZZINE**

Pharmacologie

M. Abdelmounaim **MOUHAJIR**

Informatique Bio-Informatique

M. Olivier **PERRUCHON**

Pharmacognosie

M. Maxime **GRAND**

Bactériologie

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
M. Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
M. Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
M. Abdelhakim EL OMRI	Pharmacognosie
M. François ESTOUR	Chimie organique
M. Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
M. Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
M. Rémi VARIN	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
M. Philippe VERITE	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR MEDECINE GENERALE

M. Jean-Loup **HERMIL** (PU-MG) UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCE MEDECINE GENERALE

M. Matthieu **SCHUERS** (MCU-MG) UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

M. Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

M. Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mme Laëtitia **BOURDON** UFR Médecine Générale

Mme Elsa **FAGOT-GRIFFIN** UFR Médecine Générale

M. Emmanuel **HAZARD** UFR Médecine Générale

Mme Lucile **PELLERIN** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

M. Paul **MULDER** (phar)

Sciences du Médicament

Mme Su **RUAN** (med)

Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

M. Sahil **ADRIOUCH** (med)

Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)

Mr Jonathan **BRETON** (med)

Nutrition

Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE** (med)

Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)

Mme Carine **CLEREN** (med)

Neurosciences (Néovase)

M. Sylvain **FRAINEAU** (med)

Physiologie (Inserm U 1096)

Mme Pascaline **GAILDRAT** (med)

Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)

M. Nicolas **GUEROUT** (med)

Chirurgie Expérimentale

Mme Rachel **LETELLIER** (med)

Physiologie

M. Antoine **OUVRARD-PASCAUD** (med)

Physiologie (Unité Inserm 1076)

M. Frédéric **PASQUET**

Sciences du langage, orthophonie

Mme Anne-Sophie **PEZZINO**

Orthophonie

Mme Christine **RONDANINO** (med)

Physiologie de la reproduction

M. Youssan Var **TAN**

Immunologie

Mme Isabelle **TOURNIER** (med)

Biochimie (UMR 1079)

DIRECTEUR ADMINISTRATIF : M. Jean-Sébastien VALET

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation SJ – Saint Julien Rouen

Par délibération en date du 3 mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

Table des matières

I.	Introduction.....	1
A.	Dosages toxicologiques : Historique et évolution.....	2
1.	Colorimétrie.....	2
2.	Techniques immunologiques	4
a)	Enzyme multiplied immunoassay technic (EMIT).....	5
b)	Cloned Enzyme Donor ImmunoAssay (CEDIA)	7
c)	Fluorescence polarization immunoassay (FPIA).....	8
d)	Interaction cinétique de microparticules en solution (KIMS)	9
e)	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	11
3.	La chromatographie	13
a)	Chromatographie sur couche mince (CCM)	13
b)	Chromatographie gazeuse (CPG).....	14
c)	Méthode de détection.....	15
B.	Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)	16
1.	Chromatographie liquide.....	16
a)	Chromatographie d'adsorption	17
b)	Chromatographie d'échange d'ions	18
c)	Chromatographie d'exclusion	18
d)	Chromatographie de partage	20

2.	Spectrométrie de masse (MS)	25
a)	Source d'ionisation	25
(1)	Ionisation par impact électronique	26
(2)	Ionisation chimique	26
(3)	Ionisation par électro-nébulisation (ESI)	27
(4)	Ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)	28
(5)	Photo-ionisation à pression atmosphérique	30
b)	Analyseur	31
(1)	Analyseur-filtre quadripolaire	32
(2)	Analyseur à temps de vol (TOF)	37
(3)	Analyseur à trappe orbitale (Orbitrap)	38
C.	Pourquoi faire un screening toxicologique et pour quel laboratoire ?	41
II.	Méthode actuellement utilisée au laboratoire	43
A.	Pré-analytique	43
B.	Analytique	44
1.	Préparation des échantillons	44
2.	Configuration de la chromatographie	45
3.	Configuration du spectromètre de masse	46
C.	Post-analytique	48
III.	Validation de la nouvelle méthode	51
A.	Changements	51
B.	Expérimentations	53
1.	Principe de manipulation	53

2.	Difficultés expérimentales.....	56
C.	Démarches qualité.....	59
1.	Phase pré-analytique.....	59
2.	Phase analytique	60
a)	Points-clés de la validation.....	60
b)	Expérimentations pratiques	63
c)	Premiers résultats.....	65
d)	Discussions	68
e)	Manipulations complémentaires	69
f)	Derniers résultats et conclusion.....	71
3.	Phase post-analytique	73
IV.	Conclusion et perspective d'avenir	74
V.	Annexes	76
VI.	Sources	99

Figures

Figure 1 – Illustration du principe de colorimétrie.....	2
Figure 2 – Illustration d'un dosage par spectrophotométrie.....	4
Figure 3 – Principe de la technique EMIT (4).....	6
Figure 4 – Principe de la technique CEDIA (6).....	7
Figure 5 - Principe de la technique FPIA (10).....	8
Figure 6 - Principe de la technique KIMS.....	9
Figure 7 – Principe turbidimétrie et néphélémétrie (12).....	10
Figure 8 - Illustration des variantes de la technique ELISA (12).....	11
Figure 9 - Principe de la chromatographie en couche mince (14).....	13
Figure 10 - Schéma d'une chromatographie en phase gazeuse (16).....	14
Figure 11 – Principe de la chromatographie d'adsorption (18).....	17
Figure 12 - Principe de la chromatographie d'exclusion (21).....	19
Figure 13 - Pouvoir d'élution (23).....	20
Figure 14 - Illustration d'une pompe (24).....	21
Figure 15 - Illustration d'un injecteur avec une boucle (25). a) Remplissage. b) Injection dans la colonne.....	22
Figure 16 - Photo de colonnes chromatographiques (26).....	23
Figure 17 - Schéma simplifié du principe d'HPLC (27).....	23
Figure 18 - Ionisation par impact électronique (28).....	26
Figure 19 - Principe de l'ESI en mode positif (28).....	27
Figure 20 - Principe de l'APCI (28).....	28
Figure 21 - Réactions intermédiaires impliquées dans l'ionisation des molécules en APCI (29).....	29
Figure 22 - Principe de l'APPI (31).....	30
Figure 23 - Réactions menant à la formation d'ions en APPI (mode positif) (29).....	31

Figure 24 - Principe d'un triple quadripôle linéaire (28)	32
Figure 25 - Principe SM-SM avec 3 quadripôles linéaires	34
Figure 26 - Exemple d'un spectre de fragmentation (Lidocaïne) (28).....	36
Figure 27 - Principe d'un spectromètre à temps de vol (32).....	37
Figure 28 - Electrodes du spectromètre de masse à trappe orbitale (33)	38
Figure 29 - Gradient d'élution de la phase mobile	46
Figure 30 - Exemple d'Interprétation : Etalon interne	48
Figure 31 - Exemple d'Interprétation : Résultat négatif.....	49
Figure 32 - Exemple d'Interprétation : Résultat positif.....	49
Figure 33 - Exemple d'Interprétation : Faux positif par contamination.....	50
Figure 34 - Exemple d'Interprétation : Interférence à un temps de rétention inapproprié	50

Tableaux

Tableau 1 - Test colorimétriques : Exemples	3
Tableau 2 - Variantes de la technique ELISA (12)	12
Tableau 3 - Modes d'utilisation d'un triple quadripôle (28).....	35
Tableau 4 - Liste des molécules supprimées du screening	51
Tableau 5 - Liste des molécules ajoutées au screening.....	52
Tableau 6 - Préparation des solutions mères F0	55
Tableau 7 - Résultats expérimentaux de la répétabilité et de la reproductibilité (174 molécules testées).....	66
Tableau 8 - Résumé du pourcentage de molécules validé en répétabilité en fonction du CV cible.....	71
Tableau 9 - Résultats de l'équivalence de matrices	72

Annexes

Annexe 1 - Solutions mères pour dopants	76
Annexe 2 - Liste des transitions en mode positif AVANT révision de la méthode	81
Annexe 3 - Liste des transitions en mode négatif AVANT révision de la méthode.....	87
Annexe 4 - Liste des transitions en mode positif APRES révision de la méthode	88
Annexe 5 - Liste des transitions du screening toxicologique en mode négatif APRES révision de la méthode	95
Annexe 6 - Résultats de la validation qualité à 200ng/mL (160ng/mL pour l'équivalence matrice)	96
Annexe 7 - Résultats de la validation qualité à 100ng/mL (80ng/mL pour l'équivalence matrice)	97
Annexe 8 - Résultats de la validation qualité à 10 ng/mL	98

Liste des abréviations

APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique

APPI : Photo-ionisation à pression atmosphérique

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CEDIA : Cloned Enzyme Donor ImmunoAssay

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

COFRAC : COmité FRançais d'ACcréditation

Da : Dalton

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EMIT : Enzyme Multiplied Immunoassay Technic

ESI : Ionisation par électro-nébulisation

FPIA : Fluorescence Polarization ImmunoAssay

G6P : Glucose-6-Phosphate

G6PD : Glucose-6-Phosphate DésHydrogénase

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

HPLC-MS : Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse

HPLC-MS/MS : Chromatographie liquide haute performance couplé à la spectrométrie de masse en tandem

KIMS : Interaction cinétique de microparticules en solution

m/z : rapport masse sur charge

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight

MeOH : Méthanol

MRM : Multiple Reaction Monitoring

NAD : Nicotine Adénine Dinucléotide

NADH : Hydrure de Nicotinamide Adénine Dinucléotide

RAS : Rien à signaler

RIA : Radio-Immunologic Assay

SFBC : Société Française de Biologie Clinique

SFTA : Société Française de Toxicologie Analytique

SRM : Selected Reaction Monitoring

ST : Sang Total

TOF : Spectromètre de masse à temps de vol

UV : Ultraviolet

I. Introduction

Le laboratoire de pharmacologie-toxicologie du CHU de Rouen dose au quotidien une grande variété de médicaments ou drogues dans diverses matrices. Parmi les méthodes utilisées, le screening toxicologique permet de rechercher des centaines de médicaments ou stupéfiants en une analyse.

Cependant, la mise sur le marché régulière de nouveaux médicaments et la circulation de nouveaux produits stupéfiants nécessite une actualisation périodique de cette méthode d'analyse. Par ailleurs, celle-ci constitue un défi en ce qui concerne la validation de méthode en vue d'une accréditation par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC).

Le présent travail décrit dans une première partie un historique de l'évolution des techniques utilisées pour répondre aux problématiques d'ordre toxicologique. Puis une seconde partie développe la méthode de screening toxicologique initialement en place au laboratoire. Enfin, une troisième partie précise les modifications apportées à cette méthode ainsi que les critères choisis et la méthodologie adoptée pour en réaliser sa validation.

A. Dosages toxicologiques : Historique et évolution

Le screening toxicologique est une méthode d'analyse qualitative ou semi-quantitative permettant d'identifier un ou plusieurs toxiques et médicaments dans des matrices différentes telles que : le sang total, le plasma, les urines, etc.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de solution idéale pour tout détecter de manière exhaustive, rapide et peu coûteuse dans un échantillon.

Différentes techniques ont été développées au cours du temps avec leurs forces et faiblesses respectives.

1. Colorimétrie

L'une des plus vieilles méthodes connues d'analyse, remontant au XIXe siècle, est la colorimétrie. Elle permet via une réaction chimique de produire une couleur détectable.

(Figure 1)

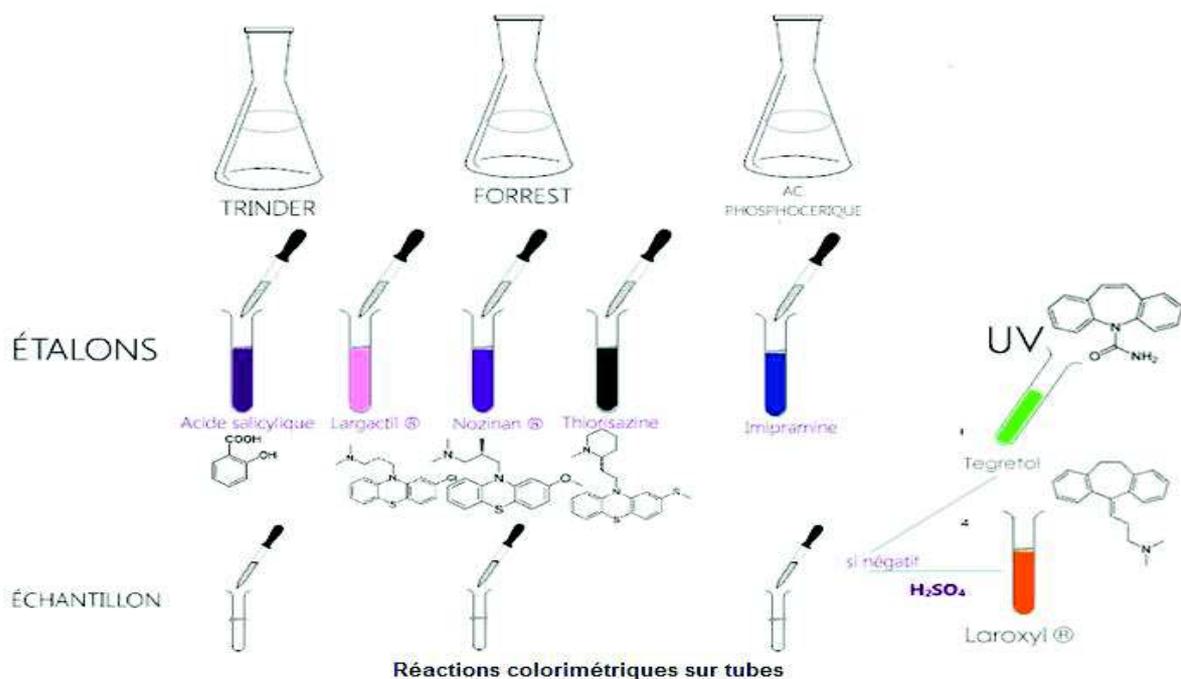


Figure 1 – Illustration du principe de colorimétrie

Voici quelques exemples de tests concernant des familles de médicaments ou de toxiques de manière non exhaustive (Tableau 1).

Substance/ Groupe fonctionnel	Test
Alcools	Dichromate de potassium
Alcaloïdes et les bases azotées	Réactifs de Dragendorff
Antidépresseurs	Test de Marquis
Cannabis	Réactif de Duquenois
Cocaïne	Le test de Scott
Cyanure	Picrate de sodium
Phénothiazines	Réactif de Forrest
Salicylates	Réactif de Trinder

Tableau 1 - Test colorimétriques : Exemples

Un spectrophotomètre mesure une densité optique, par conséquent l'absorbance augmente avec l'intensité de coloration d'une solution.

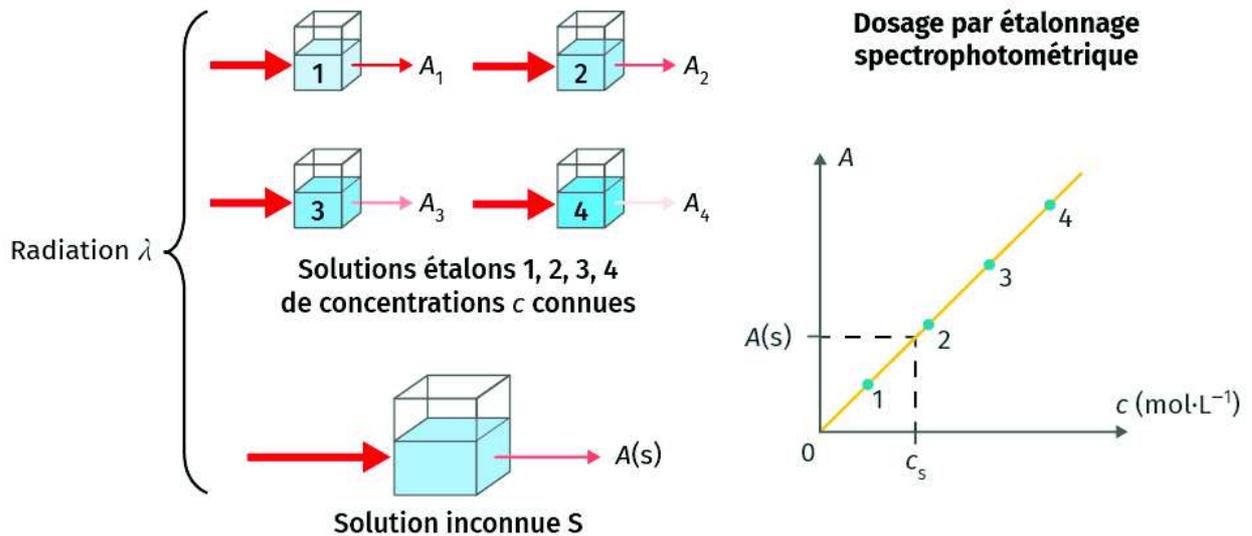
La concentration de la molécule recherchée est retrouvée en utilisant la loi de Beer-Lambert-Bouguer. Les travaux de Jean-Henri Lambert en 1760 traduisent de manière mathématique le travail de Pierre Bouguer sur la colorimétrie (1). Se basant sur leurs travaux, August Beer proposera en 1852 la relation de proportionnalité entre la concentration et l'absorbance (2) :

$$A = \epsilon.l.c$$

Avec :

- ϵ : Le coefficient d'atténuation moléculaire spécifique à la substance
- l : La longueur du trajet parcouru par la lumière dans le milieu
- c : la concentration de l'entité chimique

L'utilisation d'une gamme d'étalonnage, et de dilutions plus ou moins importantes de l'échantillon, est nécessaire pour conserver la proportionnalité entre la concentration et l'absorbance et obtenir un résultat fiable. (Figure 2)



<https://www.afterclasse.fr/fiche/856/composition-chimique-des-solutions>

Figure 2 – Illustration d'un dosage par spectrophotométrie

L'avantage de cette méthode aujourd'hui est la rapidité et le faible coût, mais elle manque de sensibilité et peut être sujette aux interférences dans le cas d'échantillons complexes.

2. Techniques immunologiques

Les méthodes immunologiques se basent sur la réaction d'un antigène (toxique ou classe médicamenteuse) avec un anticorps spécifique. Ces deux éléments forment un complexe dont l'activité est mesurée par différents moyens : radiation, fluorescence, enzymatique...

Ces méthodes ont été et sont toujours très utilisées dans le dosage des médicaments, pour l'étude de leurs cinétiques, ainsi que pour des études de bioéquivalences.

Ce sont des techniques très sensibles avec des limites de détection faibles, notamment grâce à l'émergence des anticorps monoclonaux.

Différentes techniques immunologiques ont été développées avec le temps, il existe deux grandes familles : celles en phase homogène sans séparation et celles en phase hétérogène.

Les méthodes homogènes ne nécessitent pas de séparation entre les fractions liées et libres.

a) Enzyme multiplied immunoassay technic (EMIT)

L'Enzyme multiplied immunoassay technic (EMIT) est une technique immunologique en phase homogène, développée en 1972 pour le dosage de la morphine (3).

L'EMIT repose sur l'utilisation d'une enzyme, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), en présence de glucose-6-phosphate (G6P) et de nicotine adénine dinucléotide (NAD). Son activité provoque la réduction du NAD en NADH.

Une compétition s'installe avec l'addition de l'anticorps anti-médicament ou antitoxique entre les haptènes cibles étant soit couplés à la G6PD, soit libres dans le milieu. Plus il y a d'haptènes présents dans l'échantillon, plus la quantité d'haptènes libres couplés aux anticorps sera élevée, ayant pour conséquence une augmentation de la quantité de G6PDH libre (non couplé à un anticorps) et ayant conservé son activité.

Pour résumé, l'activité enzymatique est alors accrue en présence d'une concentration importante de médicament ou toxique, induisant une production plus importante de NADH, et inversement.

Une mesure par spectrophotométrie à 340nm permet, grâce à la loi de Beer-Lambert, de mesurer directement la concentration en NADH, elle-même formé par la réduction du NAD grâce à l'activité enzymatique de la G6PD, afin de déterminer de manière indirecte la concentration en médicament ou toxique. (Figure 3).

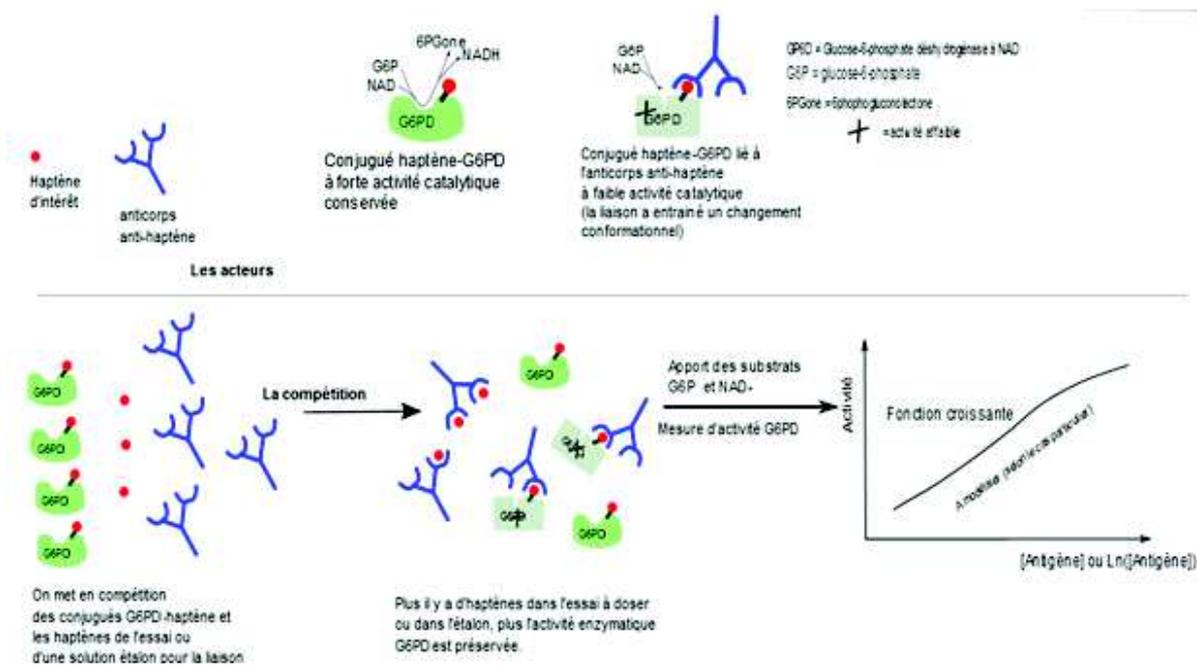


Figure 3 – Principe de la technique EMIT (4)

De manière concrète, le laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie au CHU de Rouen propose le dosage plasmatique de l'alcool éthylique, du paracétamol, et de la lidocaïne à l'aide de ce type de méthode.

b) *Cloned Enzyme Donor ImmunoAssay (CEDIA)*

Le Cloned Enzyme Donor ImmunoAssay (CEDIA) est une technique en phase homogène développée en 1986 (5). Elle peut être utilisée pour la détection de stupéfiants et divers toxiques. Ce test utilise l'enzyme bactérienne β -galactosidase scindée en deux fragments inactifs par génie génétique, avec un fragment accepteur d'enzyme (EA) et un petit fragment donneur d'enzyme (ED). Le fragment ED est conjugué avec l'haptène d'intérêt. Une compétition s'installe avec les anticorps présents entre l'haptène du médicament ou toxique présent dans l'échantillon et celui couplé à l'ED. Plus la quantité de médicament présent sera élevé, moins les anticorps se fixeront sur le complexe ED-haptène. L'ED libre sans anticorps s'associe spontanément avec l'EA en une enzyme active qui transforme un substrat en un produit, ce dernier est mesuré par spectrophotométrie (Figure 4) (6).

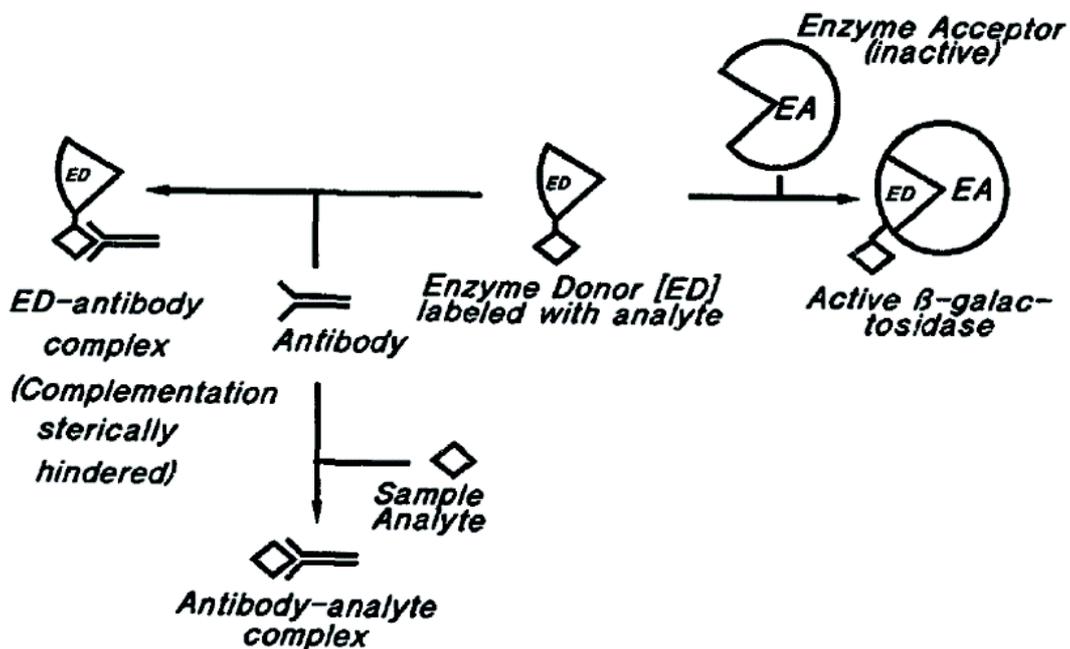


Figure 4 – Principe de la technique CEDIA (6)

Par exemple, le laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie du CHU de Rouen propose le dépistage des benzodiazépines dans le plasma et les urines à l'aide de ce type de méthode.

c) *Fluorescence polarization immunoassay (FPIA)*

La Fluorescence polarization immunoassay (FPIA) a été développée dans les années 1960 (7,8). Les premiers travaux en 1925 et 1926 par Francis Perrin furent la base de la théorie de quantification par fluorescence (9).

C'est une méthode de dosage en phase homogène, utilisant un antigène marqué à la fluorescéine. Un fluorimètre émet à la longueur d'onde adaptée, une lumière incidente pour exciter la fluorescéine. La détection se fait par un filtre polarisant, les molécules non liées émettent la fluorescence sur un plan différent de la lumière incidente alors que le complexe, plus stable, émet la lumière sur le même plan qui est détectable. L'explication de cette différence est liée à la différence de vitesse de rotation de l'antigène couplé au fluorochrome seul qui est plus rapide que celle du complexe antigène-anticorps-fluorochrome (Figure 5). Une rotation rapide induit une faible fluorescence par dispersion du signal et inversement.

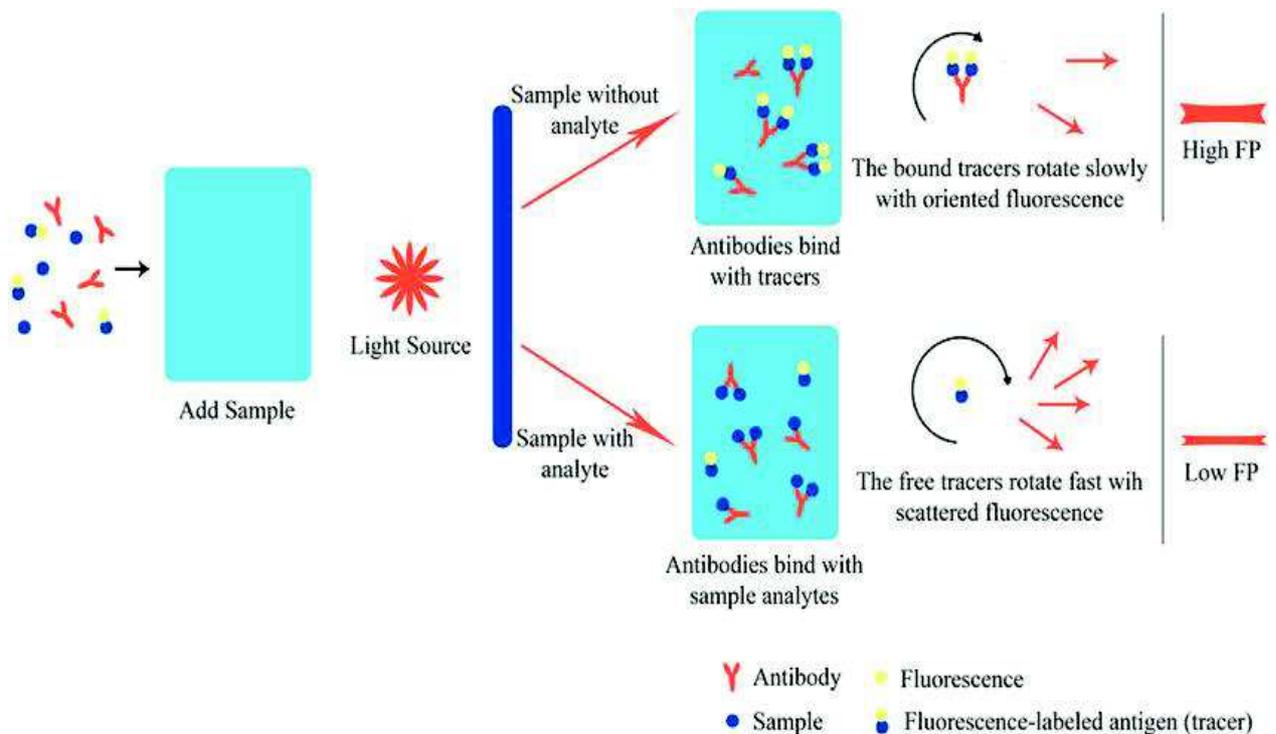


Figure 5 - Principe de la technique FPIA (10)

La compétition entre l'antigène marqué à la fluorescéine et l'antigène libre contenu dans un échantillon, entraîne ainsi une diminution de la fluorescence. Cela nécessite l'analyse d'un blanc-matrice pour détecter la fluorescence de fond.

Ce système a été notamment utilisé pour analyser des médicaments dans les urines (11) en 1985, et est la base du système Abbott ADx.

d) Interaction cinétique de microparticules en solution (KIMS)

L'interaction cinétique de microparticules en solution (KIMS) est un immunodosage en phase homogène d'agglutination sur microparticules. Un haptène biotinylé fixé sur des billes recouvertes de latex sert d'agent de couplage à l'anticorps monoclonal spécifique de l'analyse.

(Figure 6)

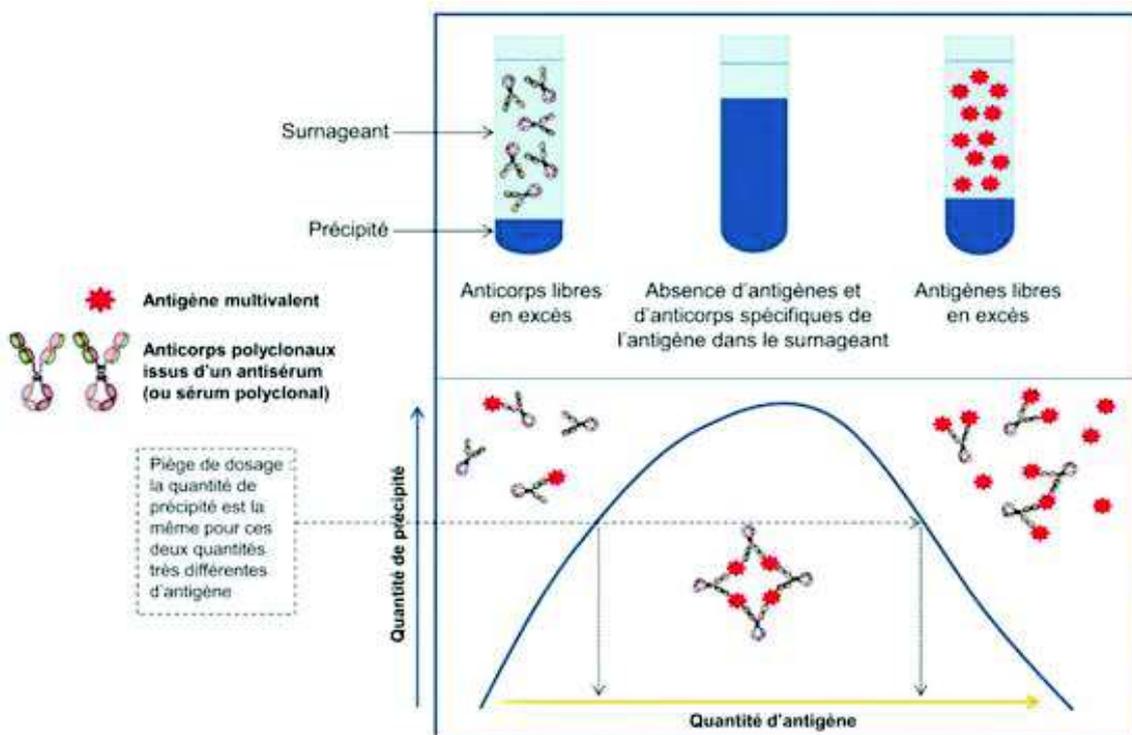
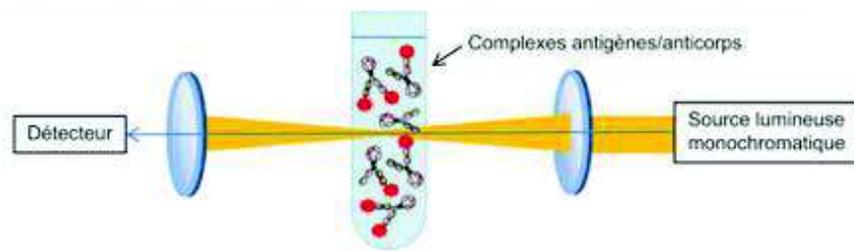


Figure 6 - Principe de la technique KIMS

La détection peut reposer sur deux principes : la turbidimétrie évalue la diminution d'intensité de la lumière transmise dans une solution contenant des complexes immuns, tandis que la néphélémétrie évalue, via un angle optique précis, la lumière dispersée par les complexes immuns. (Figure 7)

La turbidimétrie est plutôt utilisée dans le dosage des médicaments, la diminution d'intensité du signal lumineux transmis est alors proportionnelle à la concentration en médicament contenue dans l'échantillon.

Turbidimétrie : la mesure de lumière transmise produit un signal décroissant avec la concentration d'antigènes



Néphélémétrie : la mesure de la dispersion de la lumière produit un signal croissant avec la concentration d'antigènes

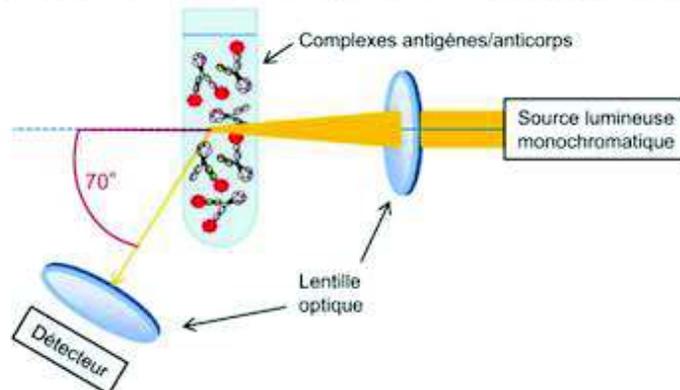


Figure 7 – Principe turbidimétrie et néphélémétrie (12)

Par exemple, le laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie du CHU de Rouen propose le dosage des aminosides, de la carbamazépine, de la digoxine, ou encore le dépistage des différentes drogues (amphétamines, cocaïne, opiacés, cannabinoïdes) à l'aide de ce type de méthode.

Concernant les dosages en phases hétérogènes, la séparation de l'antigène libre et lié à l'anticorps est nécessaire avant la mesure du signal, par impossibilité de distinguer le signal émis par le marqueur ou le complexe comprenant le marqueur.

e) *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

La technique de dosage immuno-enzymatique, ou ELISA, a été inventée par Eva Engvall et Peter Perlman de l'université de Stockholm en Suède en 1971 (13).

Son principe repose sur la fixation d'un anticorps spécifique sur un support fixe, sur lequel est déposé un échantillon contenant l'antigène recherché.

Elle peut être qualitative ou quantitative si une courbe d'étalonnage est utilisée. Il existe différentes variantes d'ELISA : direct, indirect, sandwich, compétitif. (Figure 8)

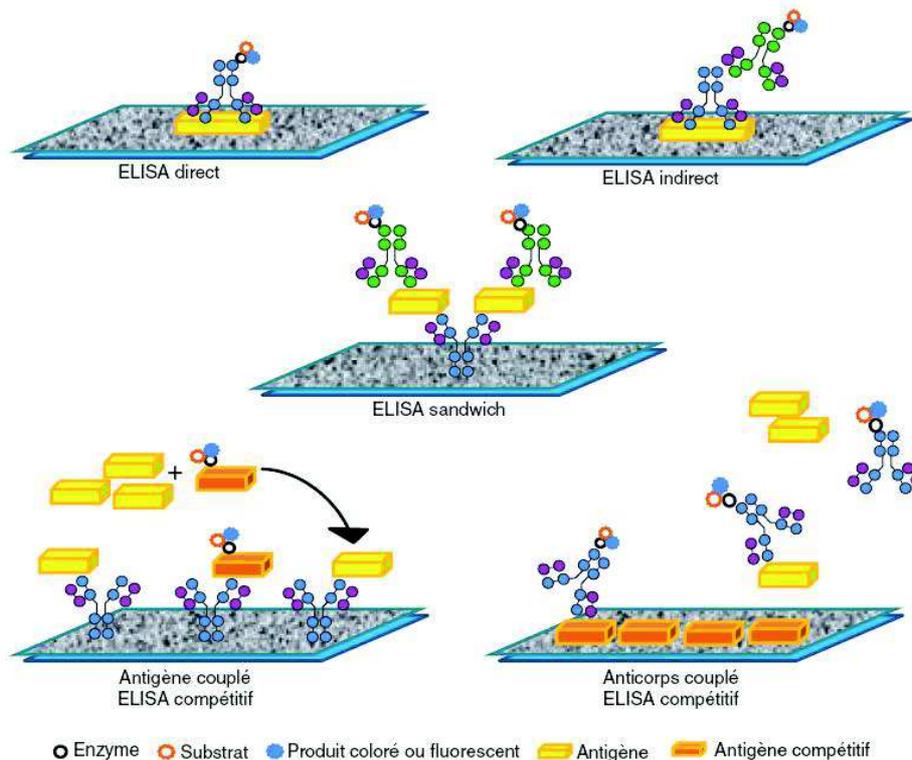


Figure 8 - Illustration des variantes de la technique ELISA (12)

Ces techniques de dosages sont globalement rapides, automatisables et faisables 24H/24 et 7J/7, mais avec une sensibilité variable et des réactions croisées possibles.

Analyte recherché	Type de technique ELISA	Analyte adsorbé	Premier réactif soluble	Deuxième réactif soluble	Réactif soluble de révélation
Antigène	Direct	Antigène	Anticorps de détection marqué	/	Substrat/ chromogène
Anticorps		Anticorps	Antigène marqué	/	Substrat/ chromogène
Anticorps	Indirect	Antigène	Anticorps primaire	Anticorps secondaire marqué	Substrat/ chromogène
Antigène	Sandwich	Anticorps de capture	Antigène	Anticorps de détection marqué	Substrat/ chromogène
Anticorps	Compétitif	Antigène	Anticorps	Anticorps marqué	Substrat/ chromogène
Antigène		Anticorps	Antigène	Antigène marqué	Substrat/ chromogène

Tableau 2 - Variantes de la technique ELISA (12)

L'ELISA a progressivement supplanté la RIA (Radio ImmunoAssay). L'utilisation de radio-isotopes tels que l'iode-125 (^{125}I) ou le tritium (^3H) couplés à un anticorps spécifique permet des dosages quantitatifs via une détection radiométrique. Néanmoins, les contraintes et les coûts de la RIA expliquent son abandon au profit de méthodes analytiques plus rentables.

Les méthodes analytiques décrites jusqu'à présent sont limitées aux matrices sanguines et urinaires. La nécessité d'une orientation diagnostique est également indispensable au choix de l'analyse, d'où un intérêt non négligeable de ces techniques immunologiques et automatisables, permettant d'apporter des premières réponses rapides. Toutefois, elles s'avèrent insuffisantes dans le cadre d'une intoxication d'étiologie inconnue.

D'autres méthodes analytiques peuvent répondre à cette question, parmi lesquelles la chromatographie couplée à une détection par spectrométrie de masse est un exemple concret développé dans les parties suivantes.

3. La chromatographie

La chromatographie est une technique analytique permettant de séparer les molécules en fonction de leurs affinités entre une phase liquide et une phase stationnaire.

a) Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) consiste à déposer l'échantillon sur une plaque recouverte d'une phase stationnaire, souvent en silice. Les molécules contenues dans l'échantillon sont séparées à l'aide d'un solvant éluant, migrant par capillarité.

La lecture de la plaque est faite après séchage, directement à l'œil nu, ou à l'aide d'une lumière UV. Des révélateurs complémentaires comme la fluorescéine peuvent être utilisés. La présence d'un composé d'intérêt est vérifiée par la distance de migration relative, déterminée en mesurant les distances de migration du composé et du solvant. (Figure 9)

C'est une méthode peu coûteuse mais peu sensible, très longue et peu compatible avec l'urgence. Elle est de moins en moins utilisée, et supplantée par des méthodes plus performantes telles que la chromatographie gazeuse ou liquide.

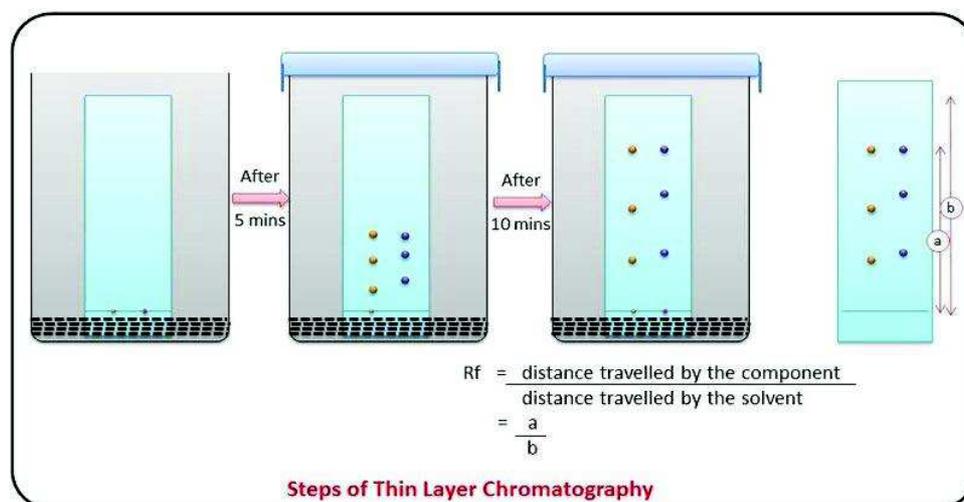


Figure 9 - Principe de la chromatographie en couche mince (14)

b) Chromatographie gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) permet une séparation plus sélective des molécules.

La CPG a été développée dans les années 1950 avec les travaux d'A.J.P Martin et R.L.M Syngé en Angleterre, ainsi que Alain Berton en France. Dans les années 1980, les recherches ont permis de développer l'analyse de toutes les familles de molécules grâce à l'évolution des injecteurs et des colonnes. (15)

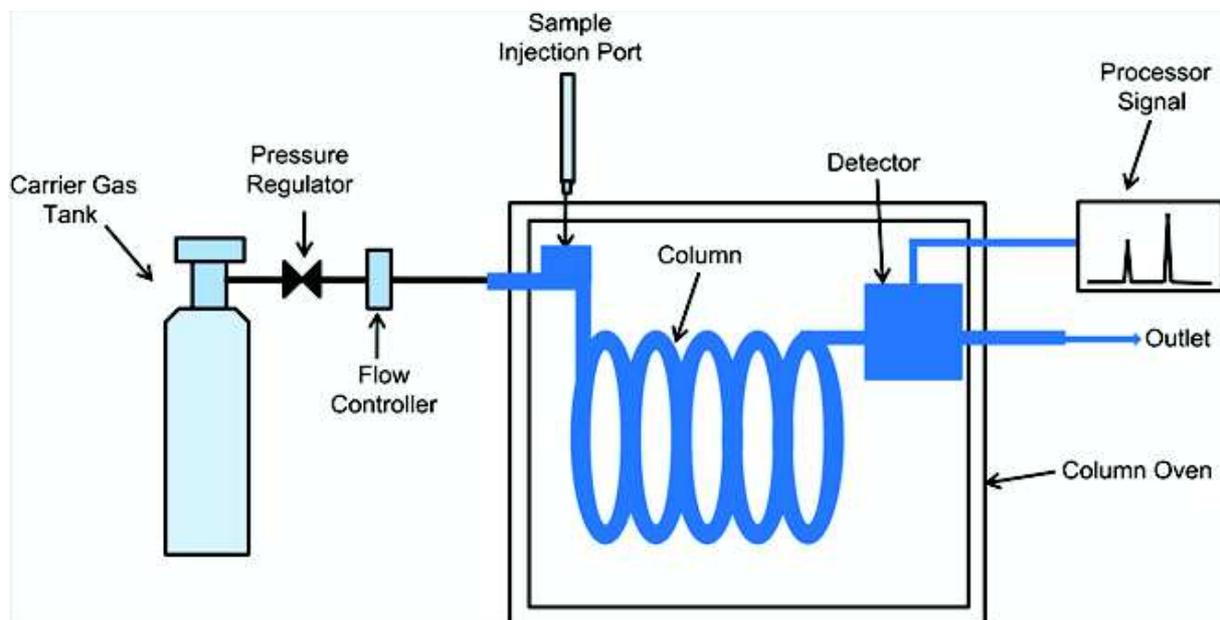


Figure 10 - Schéma d'une chromatographie en phase gazeuse (16)

Le principe de la CPG est de séparer des composés volatils ou volatilissables par vaporisation dans un four avec un gaz vecteur comme l'azote, l'argon, l'hélium ou l'hydrogène. Le mélange gazeux est introduit via le système d'injection dans la colonne, qui permet la séparation des composés en fonction de leurs affinités avec la colonne.

Ces composés sont élués par conséquent à des temps différents, et sont détectés par un détecteur, relié à un système d'acquisition. (Figure 10)

c) Méthode de détection

Les principaux détecteurs de chromatographie gazeuse non destructifs sont à thermoconductions, à capture d'électrons ou à photo-ionisation.

D'autres types de détecteurs, destructifs, transforment le composé à détecter pour en déduire sa nature, on citera par exemple les détecteurs à ionisation de flamme, la photométrie à flamme, les détecteurs à émission atomique, ou la spectrométrie de masse.

Ces techniques permettent la détection et la quantification de nombreuses molécules à des concentrations faibles.

Cependant, les délais sont souvent incompatibles avec la prise en charge en urgence des patients intoxiqués. De plus, les molécules trouvées sont uniquement celles qui recherchées dans la méthode en question, même si la spectrométrie de masse ouvre la possibilité de screening non ciblé.

La spectrométrie de masse est une méthode de détection destructrice utilisable aussi bien en chromatographie gazeuse que liquide : c'est sur cette dernière méthode de détection, en particulier couplée à la chromatographie liquide (HPLC/MS-MS), qui va être détaillée par la suite, étant au cœur du screening toxicologique.

B. Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

1. Chromatographie liquide

La chromatographie liquide repose sur des principes similaires à ceux de la chromatographie en phase gazeuse.

La séparation des composés d'un échantillon résulte d'un équilibre d'affinité de chaque composé entre la phase mobile et la phase stationnaire. Plus l'affinité sera importante pour la phase stationnaire, plus le temps de rétention de la molécule sera important.

Cette technique permet une analyse aussi bien qualitative, que semi-quantitative ou quantitative.

Historiquement, en 1901, Tswett, chimiste russe, a inventé la chromatographie pendant des recherches sur des pigments végétaux. Il utilisait une colonne avec du carbonate de calcium et une phase mobile à base d'éthanol. Le terme de chromatographie est apparu pour la première fois en 1906. Suite aux événements historiques du début du XX^e siècle en Russie, son travail tomba dans l'oubli.

Ce n'est que dans les années 1950, où la chromatographie a refait surface avec la CPG. Puis en 1968, la première chromatographie liquide a été développée par Molina et Poe (17).

Il existe différents types de chromatographies liquides, développées dans les parties suivantes.

a) *Chromatographie d'adsorption*

La chromatographie d'adsorption liquide-solide utilise la formation d'une liaison faible entre l'adsorbant et la molécule adsorbée par des liaisons type dipôle-ion, dipôle-dipôle ou liaison de Van der Waals. Ces interactions doivent être réversibles.

Les solutés sont retenus sur la phase stationnaire en fonction de la force de rétention, de leurs affinités, et de la force d'entraînement de la phase mobile (Figure 11)

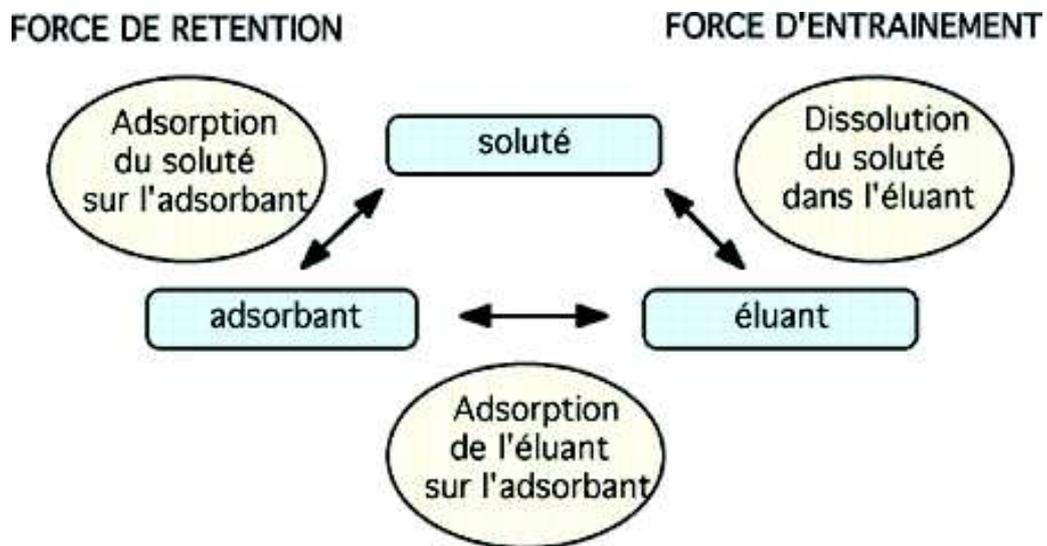


Figure 11 – Principe de la chromatographie d'adsorption (18)

Elle est utilisée pour la séparation des molécules de masses molaire entre 100 et 1000 g/mol et de polarité moyenne, parmi lesquelles sont retrouvés certains lipides ou médicaments.

b) Chromatographie d'échange d'ions

La chromatographie échangeuse d'ion sépare les molécules selon leurs charges ioniques. Le temps de rétention est déterminé en fonction de la charge de l'analyte et de la nature de la phase stationnaire. Si leurs charges sont opposées, la rétention est plus importante.

Cette méthode est plutôt appliquée à des analyses environnementales, à l'industrie des semi-conducteurs, aux biotechnologies, etc. Le principe de la chromatographie d'échange d'ions est toutefois régulièrement mis en œuvre lors d'extractions en phase solide pour la préparation d'échantillons dans le domaine de la toxicologie (19,20).

c) Chromatographie d'exclusion

A contrario des autres méthodes chromatographiques, la chromatographie d'exclusion ne fonctionne pas sur un principe d'affinité, mais sur une séparation purement physique en fonction de la masse moléculaire de l'analyte. Il s'agit d'une forme de tamisage moléculaire.

L'apparition du Sephadex en 1959 a permis le développement de cette méthode. Il s'agit d'un gel de dextrane sous forme de billes poreuses, hydrophiles et variant de taille en fonction de la présence d'eau.

Les grosses molécules sont éluées en premier de la colonne alors que les plus petites, retenues dans les porosités des billes, sont éluées en dernier. (Figure 12)

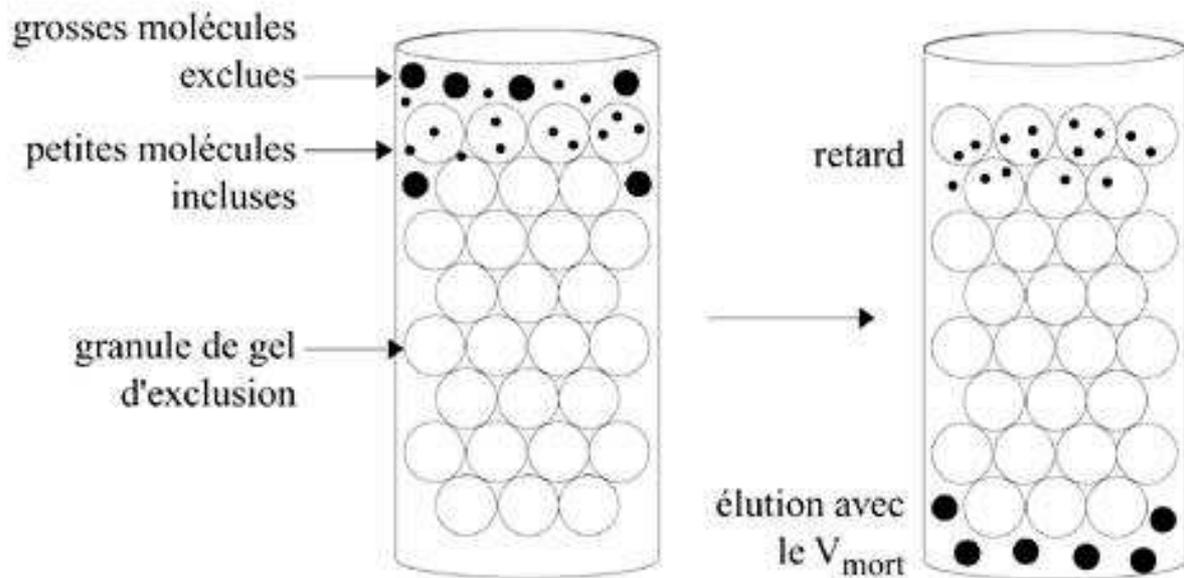


Figure 12 - Principe de la chromatographie d'exclusion (21)

Cette méthode est principalement utilisée pour l'analyse des polymères, mais aussi pour étudier l'agrégation, la conjugaison ou la conformation des protéines.

D'autres variantes de chromatographies existent telles que la chromatographie d'affinité ou la chromatographie chirale mais celles-ci sont peu utilisées dans le domaine de la toxicologie et ne seront pas détaillées dans ce travail.

d) *Chromatographie de partage*

La méthode de screening toxicologique du laboratoire de pharmacologie-toxicologie du CHU de Rouen comporte une séparation par chromatographie liquide haute performance (HPLC), mettant en jeu un partage en phase inverse.

Développée en 1952 par Martin et Synge (22), la chromatographie de partage peut être en phase liquide-liquide ou liquide-solide. L'une des phases doit être polaire et l'autre apolaire.

Actuellement, la plupart des phases stationnaires sont solides, composées de silice en bille, pouvant être greffés. La phase stationnaire comporte des greffons type amine ou nitriles pour la polarité de phase normale, et elle comporte des chaînes alkyles pour la polarité de phases inverse.

Dans le cadre d'une chromatographie de partage en phase inversée, les solvants apolaires ont un pouvoir d'éluion élevé, et à contrario les solvants polaires ont un pouvoir d'éluion faible.

Cette notion est clairement explicitée dans la Figure 13 ci-dessous.

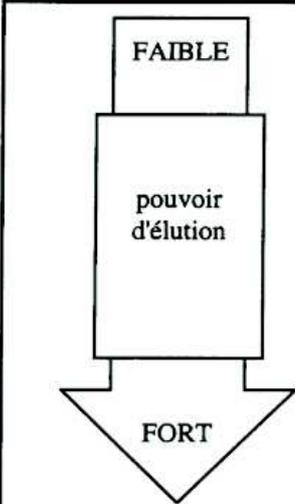
phase polaire normale	solvants classes par polarité croissante	phase à polarité inversée
	hexane toluène trichlorométhane dichlorométhane éther acétate d'éthyle acétonitrile méthanol eau	

Figure 13 - Pouvoir d'éluion (23)

La phase mobile doit être choisie selon plusieurs critères. Tout d'abord, l'affinité avec les molécules à séparer et la nature de la phase stationnaire sélectionnée.

Ensuite, l'élution peut être effectuée de différentes manières. Soit par élution isocratique, c'est-à-dire que la composition de la phase mobile n'évolue pas au cours du temps. Soit par gradient, où des variations au cours du temps de la phase mobile peuvent permettre d'améliorer la résolution des composés dont les temps de rétention sont proches. Différents paramètres peuvent être modifiés comme le débit de phase mobile, la température et surtout la composition de la phase mobile.

Il existe deux types de pompes chromatographiques, soit à pression constante, soit à débit constant. En fonction du nombre de solvants nécessaires, une ou plusieurs pompes peuvent être utilisées avec un ou plusieurs canaux. (Figure 14)

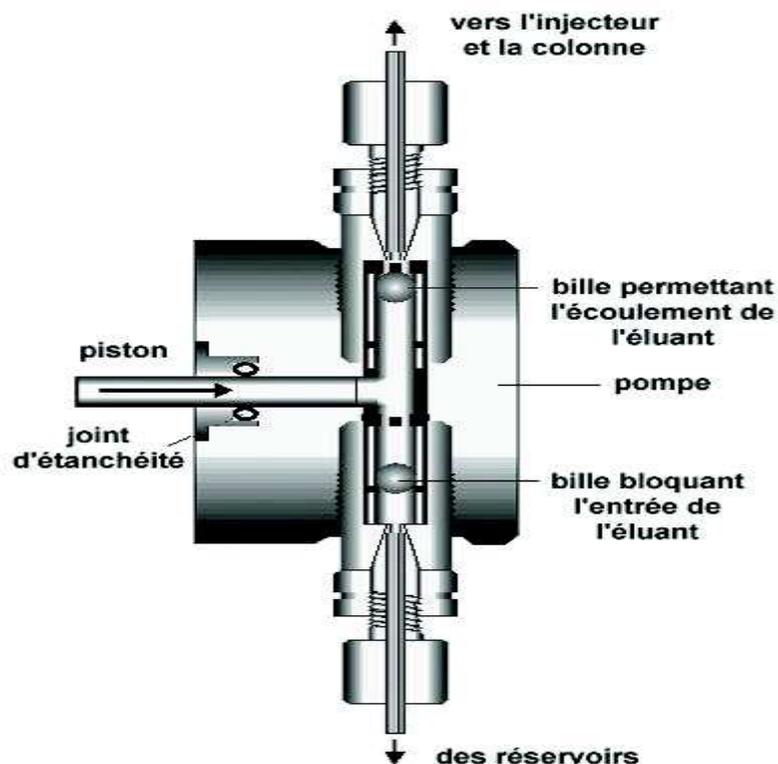


Figure 14 - Illustration d'une pompe (24)

L'injecteur sert à introduire un volume précis du prélèvement en un temps minime afin d'éviter toute perturbation. Une vanne haute pression, souvent à boucle d'injection, fonctionne en deux temps (Figure 15). Tout d'abord, en position de chargement, une seringue injecte le volume dans la boucle, puis en position injection, un levier inverse le sens de circulation dans la boucle permettant d'injecter l'échantillon dans la phase mobile.

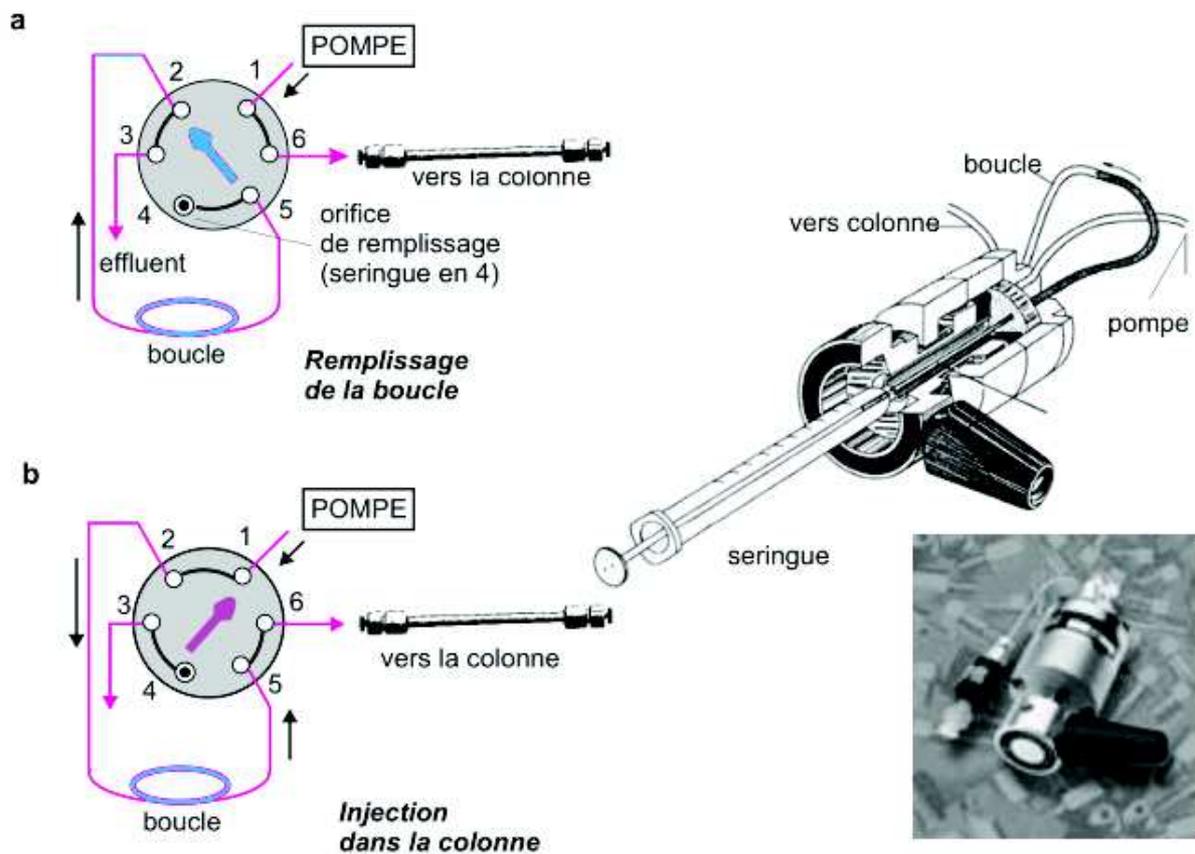


Figure 15 - Illustration d'un injecteur avec une boucle (25). a) Remplissage. b) Injection dans la colonne

La finalité de l'HPLC est de pouvoir séparer les différents composés recherchés en fonction de leurs affinités avec la phase stationnaire de la colonne.

Dans le cas présent, les médicaments ou toxiques recherchés ont ainsi des temps de rétention différents, visibles sous forme de pics chromatographiques grâce à un détecteur, via traitement informatique.

Différents types de détecteurs peuvent être couplés à l'HPLC : détecteur d'absorption UV-Visible (reprenant le principe de la colorimétrie), de fluorescence, électrochimique, spectrométrie de masse, cette dernière bénéficiant de très bonnes performances en termes de spécificité et de sensibilité. Dans le cadre de ce travail, la spectrométrie de masse est la méthode de détection retenue.

2. Spectrométrie de masse (MS)

Un détecteur doit idéalement présenter une proportionnalité entre le signal et la concentration d'un analyte, être sensible, spécifique et robuste.

Dans le cadre d'une activité pharmacologie et de toxicologie, un spectromètre de masse répond généralement à ses critères et permet de réaliser de la détection qualitative, quantitative, ainsi que de l'identification structurale.

Le spectromètre est composé de 4 parties principales :

- Un système d'introduction de l'échantillon, sous différentes phases (gazeuses, liquides ou solides).
- Une source d'ionisation pour vaporiser et ioniser, positivement ou négativement, les molécules à identifier.
- Un analyseur qui sépare les ions en fonction de leurs rapports masse sur charge (m/z).
- Un détecteur transmet le signal sous forme électrique pour un retraitement informatisé de l'analyse.

a) Source d'ionisation

Différents types d'ions peuvent être générés dans la source : l'ion moléculaire où la molécule gagne ou perd un électron, l'ion pseudo-moléculaire où la molécule gagne ou perd un atome chargé, ou encore l'ion résultat de la perte d'un fragment neutre.

Différentes méthodes d'ionisation existent et leur sélection dépend des propriétés physico-chimiques des éléments recherchés.

(1) Ionisation par impact électronique

L'impact électronique est la technique d'ionisation la plus ancienne. La source est un filament chauffé qui émet des électrons entrant en collision avec des molécules M, sous forme gazeuse, dans le but d'arracher un électron et de former des ions moléculaires M^+ (Figure 18). De ce fait, elle est couplée à des systèmes séparatifs de type chromatographie en phase gazeuse.

C'est une méthode à forte énergie conduisant à la fragmentation en source de la molécule. Elle est adaptée à des masses moléculaires inférieures à 1000 Da, volatiles et stables à hautes températures.

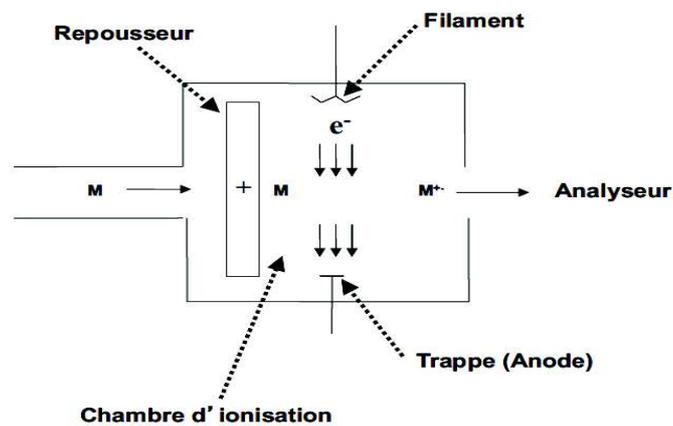


Figure 18 - Ionisation par impact électronique (28)

(2) Ionisation chimique

Ce type de source est également utilisé en chromatographie en phase gazeuse. Le principe est proche de l'ionisation par impact électronique, mais le mécanisme d'ionisation est indirect : un gaz entre en réaction avec un faisceau d'électron, formant ainsi un plasma. Les molécules M réagissent avec les ions positifs du plasma induisant des réactions douces. En effet, il n'y a pas de phénomène de fragmentation en source : la formation d'ions pseudo-moléculaires permet alors de déterminer la masse moléculaire de l'analyte. Cette méthode est adaptée aux faibles masses moléculaires inférieures à 1000 Da, volatiles et stables à température élevée, tout comme l'ionisation par impact électronique.

Les sources suivantes sont à pression atmosphérique et adaptées au couplage à la chromatographie liquide.

(3) Ionisation par électro-nébulisation (ESI)

L'électro-nébulisation consiste à pulvériser la phase mobile, à ioniser les molécules présentes dans celle-ci et à l'évaporer, à pression atmosphérique. Pour cela le liquide traverse un capillaire soumis à un potentiel de plusieurs milliers de volts entre le nébuliseur et une électrode.

En mode d'ionisation positive, le capillaire joue le rôle d'anode et inversement, de cathode en mode d'ionisation négative.

Dans le cadre du mode positif, les ions se séparent dans le capillaire, et une répulsion coulombienne des charges positives forme le cône de Taylor. Un fin filament liquide se forme jusqu'à produire de petites gouttelettes. (Figure 19)

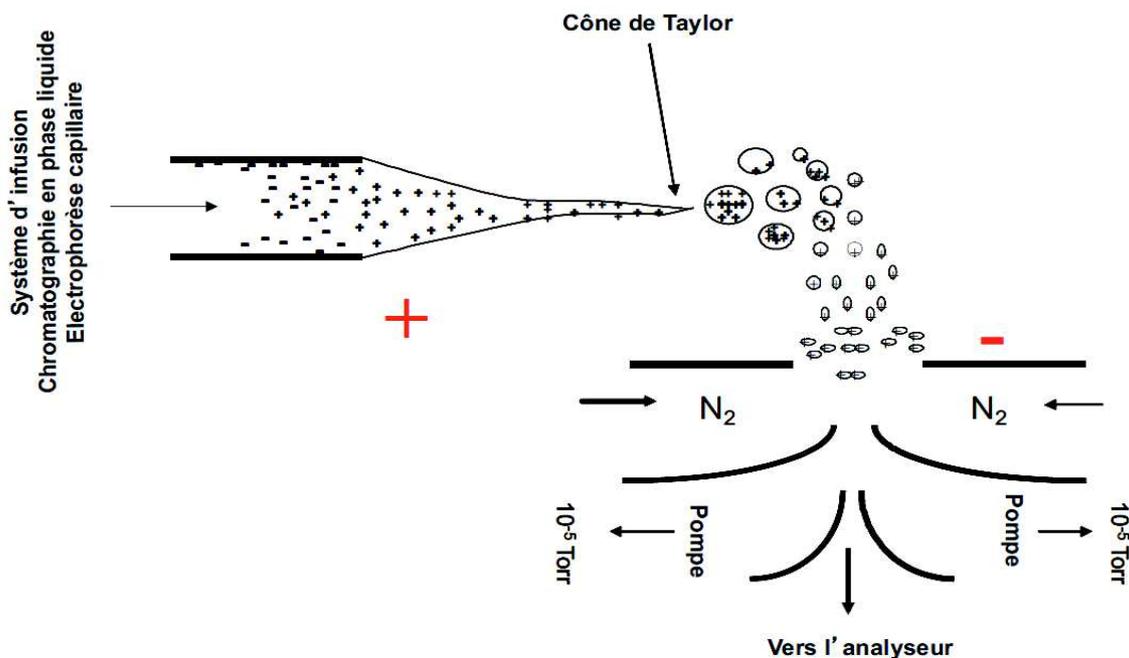


Figure 19 - Principe de l'ESI en mode positif (28)

Le solvant est ensuite évaporé avec un gaz neutre. Après, l'ion formé entre dans le spectromètre de masse.

L'ESI est intéressant pour analyser des molécules polaires de haut poids moléculaire, dans des matrices biologiques (29).

(4) Ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)

L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) est une méthode d'ionisation moins douce que l'ESI, elle peut induire une fragmentation en source des analytes. La formation des ions se fait en phase gazeuse contrairement à l'ESI où elle a lieu en milieu liquide.

Les analytes sont amenés à une électrode à décharge couronne (ou corona) qui sera la source d'ionisation, ils sont en phase gazeuse ou en plasma. (Figure 20)

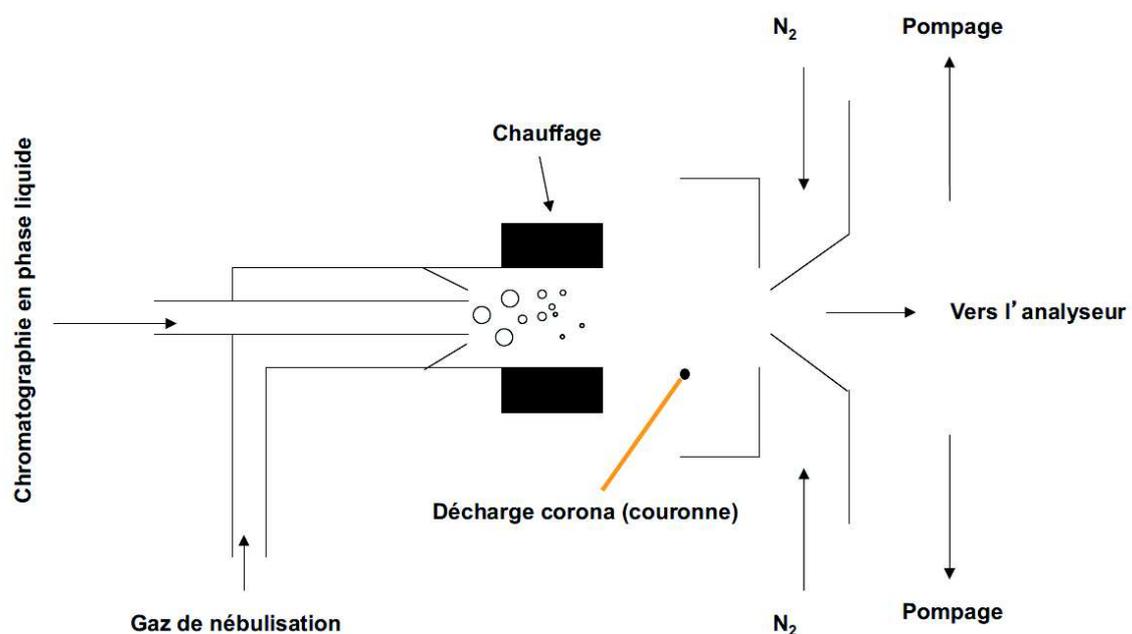


Figure 20 - Principe de l'APCI (28)

L'azote utilisé pour nébuliser la solution, forme des cations N_2^+ , puis réagit avec des molécules d'eau pour former des ions H_3O^+ ou des radicaux HO^\bullet .

L'ionisation en mode positif nécessite des ions réactifs acides tels que H_3O^+ , $CH_3OH_2^+$, NH_4^+ ... formant la molécule d'intérêt M^+ , alors qu'en mode négatif des ions réactifs basiques tels que OH^- , CH_3O^- , Cl^- ... permettent la formation de la molécule d'intérêt $(M-H)^-$. (Figure 21)

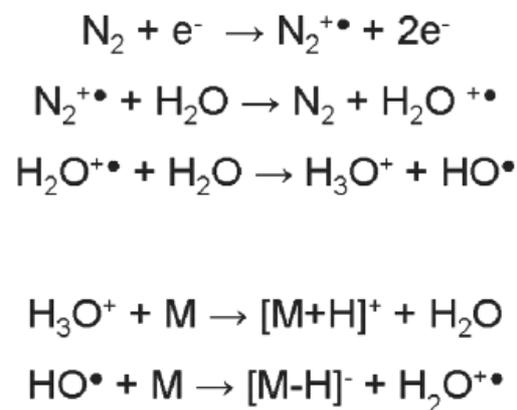


Figure 21 - Réactions intermédiaires impliquées dans l'ionisation des molécules en APCI (29)

Enfin, la forme ionisée est dirigée vers l'analyseur en lui-même. L'intérêt de l'APCI est l'ionisation des molécules ayant de faibles masses moléculaires et moins polaires qu'en ESI.

C'est pour cette raison que des constructeurs développent des sources mixtes (ESI/APCI) ou facilement interchangeables pour bénéficier de leurs complémentarités.

(5) Photo-ionisation à pression atmosphérique

La photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI) a été développée dans les années 1980 (30). Il s'agit d'une des méthodes les plus récentes dans la famille des sources d'ionisation à pression atmosphérique (ESI/APCI).

Le principe est proche de celui de l'APCI, un nébuliseur chauffe la phase mobile pour l'évaporer.

Les molécules sont ionisées par une lampe UV délivrant des photons sous vide. Cette interaction d'énergie $h\nu$ avec la molécule conduit à son excitation. Le solvant n'induit pas de bruit de fond, la quantité d'énergie $h\nu$ étant trop faible pour conduire à son excitation. (Figure 22)

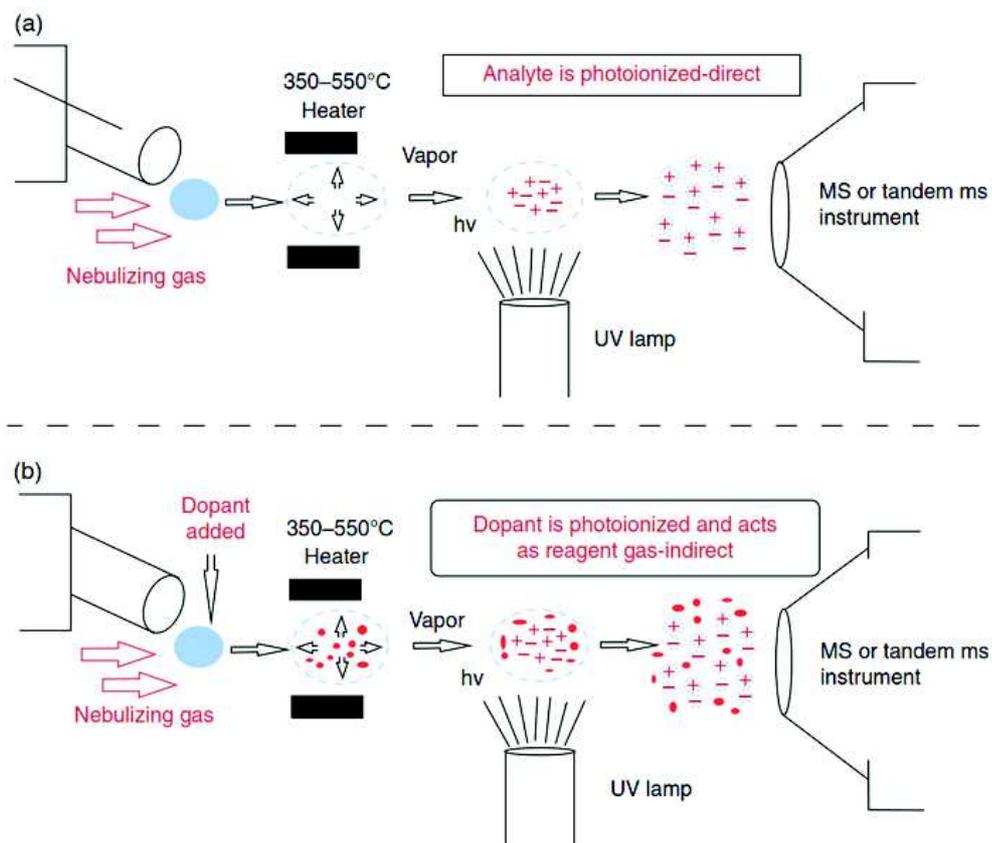


Figure 22 - Principe de l'APPI (31)

L'ionisation peut s'effectuer en mode positif ou négatif selon différentes réactions chimiques. Un dopant peut aussi être utilisé pour augmenter la sensibilité, il doit avoir une énergie d'excitation plus faible que l'analyte en lui-même et sert d'intermédiaire. Les mécanismes se basent sur des réactions d'oxydo-réduction, ou sur une déprotonation du dopant. (Figure 23)

Photoionisation directe :



Utilisation d'un dopant :



Ou

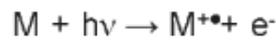


Figure 23 - Réactions menant à la formation d'ions en APPI (mode positif) (29)

L'APPI est plus efficace que l'ESI ou l'APCI pour les molécules peu polaires et difficilement détectables par ces deux méthodes.

b) Analyseur

L'analyseur sépare les ions selon leur rapport m/z en utilisant des champs électriques et/ou magnétiques. La détection in fine, est assurée par un dispositif de multiplication d'électrons situé en aval. Une description technique des principales méthodes spectrométriques utilisés actuellement en laboratoire de biologie médicale est nécessaire.

(1) Analyseur-filtre quadripolaire

L'analyseur-filtre quadripolaire utilise un champ électrique oscillant. L'objectif est de stabiliser les ions entre des électrodes dans un modèle à trois dimensions : un champ électrique formé par un filtre quadripolaire permet aux ions d'intérêts d'avoir une trajectoire stable jusqu'au détecteur, tout en expulsant les ions non souhaités.

Les quadripôles linéaires sont formés de 4 électrodes en barre, que l'ion doit traverser. Pour cela, la trajectoire doit être stable, sinon l'ion sera déchargé et filtré : par conséquent non détecté à la fin. (Figure 24)

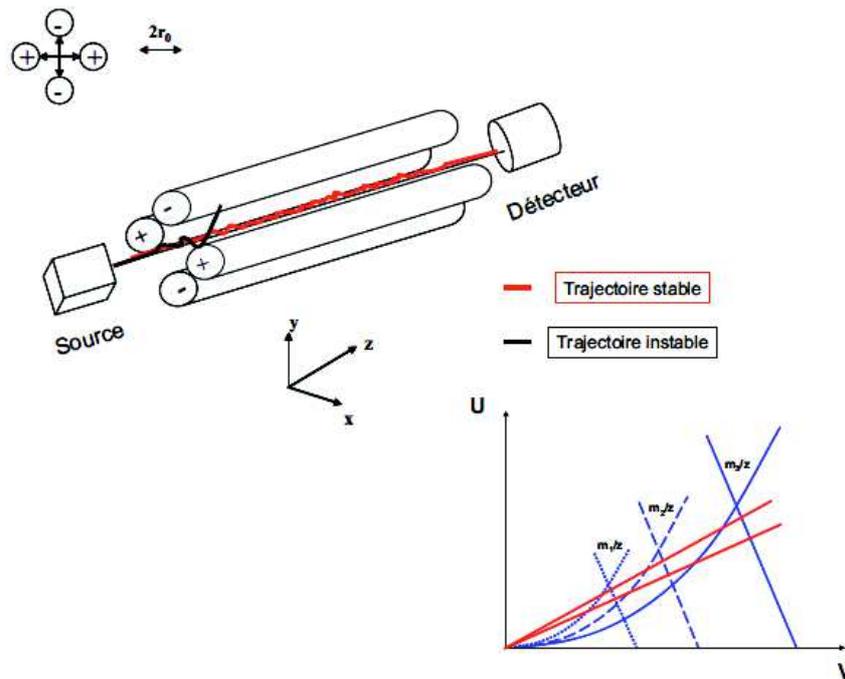


Figure 24 - Principe d'un triple quadripôle linéaire (28)

L'ion est stabilisé dans le quadripôle grâce à un champ électrique alternatif, par une application deux à deux des potentiels $+(U - V\cos\omega t)$ et $-(U - V\cos\omega t)$ avec U la tension continue (en volt), V et ω l'amplitude de la tension alternative (en volt).

Si l'ion entre en contact avec une barre du quadripôle, il est alors déchargé et ne sera pas détecté : c'est une sorte de filtration. La zone de stabilité pour traverser le quadripôle est visible sur le graphique présent sur la Figure 24.

Les trappes d'ions quadripolaires sont constituées de trois électrodes, une annulaire et deux « chapeaux ». Les ions sont piégés dans une trajectoire oscillante en forme de huit en trois dimensions. Ce piège est formé à l'aide d'un champ électrique alternatif ϕ_0 calculé de la même manière que pour un quadripôle. L'utilisation d'un gaz neutre tel que l'hélium est nécessaire pour un confinement efficace. Le spectre est obtenu de manière différente, grâce à l'expulsion des ions en fonction de leurs rapports m/z .

Dans le cas des quadripôles linéaires, l'addition d'un ou plusieurs quadripôles supplémentaires permet de constituer un spectromètre de masse en « tandem » (SM-SM).

Les quadripôles ont chacun un but précis et peuvent être utilisés de la manière suivante :

(Figure 25)

- Le premier quadripôle (Q1) sélectionne l'ion père d'intérêt.
- Le deuxième quadripôle (Q2) est une chambre de collision. Un gaz de collision y est introduit à haute pression pour engendrer une fragmentation de l'ion père en ions fils.
- Le troisième quadripôle (Q3) sélectionne les ions fils d'intérêt issus de la fragmentation dans Q2.

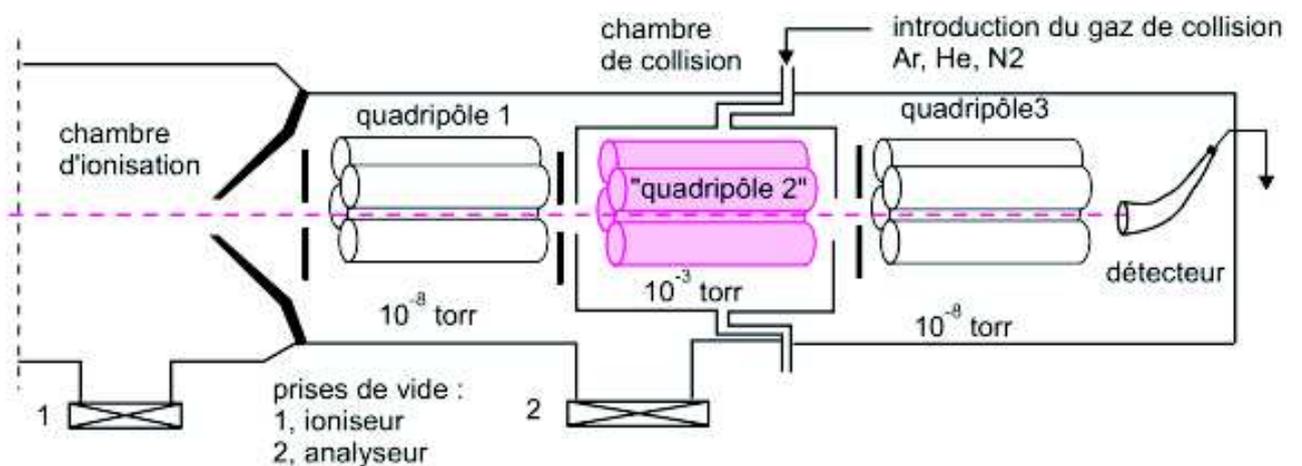


Figure 25 - Principe SM-SM avec 3 quadripôles linéaires (28)

Ces quadripôles peuvent être utilisés en mode statique comme expliqué précédemment, mais aussi en mode balayage (ou scan). Ce dernier mode a la différence de laisser passer une gamme d'ions m/z prédéfinie au lieu d'un ion m/z sélectionné, et ne sollicite pas forcément les trois quadripôles.

Quatre types de procédures résultent de la combinaison des modes :

		Q ₃	
		Mode statique	Mode scan
Q ₁	Mode statique	(1) « Selected reaction monitoring »	(2) Spectre de masse des ions fragments
	Mode scan	(3) Spectre de masse des ions précurseurs	(4) Perte de fragment neutre

Tableau 3 - Modes d'utilisation d'un triple quadripôle (28)

- Le multiple reaction monitoring (MRM) ou selected reaction monitoring (SRM) :
Q1 et Q3 sont statiques, un seul ion d'intérêt de rapport m/z est sélectionné à chaque fois dans Q1 et Q3. Cela permet une diminution du bruit de fond, une augmentation de la sensibilité, ainsi qu'une amélioration de la limite de quantification. Cette méthode est idéale pour la quantification. L'addition d'une méthode séparative telle que la chromatographie liquide limite le risque de faux positif.
- Le « spectre de masse des ions fils » : Q1 est en mode statique et Q3 est en mode scan. Ce mode est utilisé pour la détermination de la structure de petites molécules organiques ou biologiques.
- Le « spectre de masse des ions précurseurs » : Q1 est en mode scan et Q3 en mode statique. Tous les ions pères présentant un ion fils commun ne sont pas filtrés par Q1. L'intérêt est d'identifier la structure des métabolites d'une molécule (présentant un ion fragment en commun).
- La « perte de fragment neutre » : Q1 et Q3 sont en mode scan en maintenant un différentiel constant m/z . L'intérêt est le même que précédemment : étudier les structures et identifier des molécules apparentées.

A la fin, quel que soit le mode sélectionné, le détecteur multiplie les ions et transforme le tout en signal électrique nécessaire pour le retraitement informatique.

Le spectre de masse formé et détecté, est représenté sous la forme d'un graphique avec en abscisse le rapport m/z et en ordonnée le pourcentage d'intensité en fonction du pic le plus intense. (Figure 26)

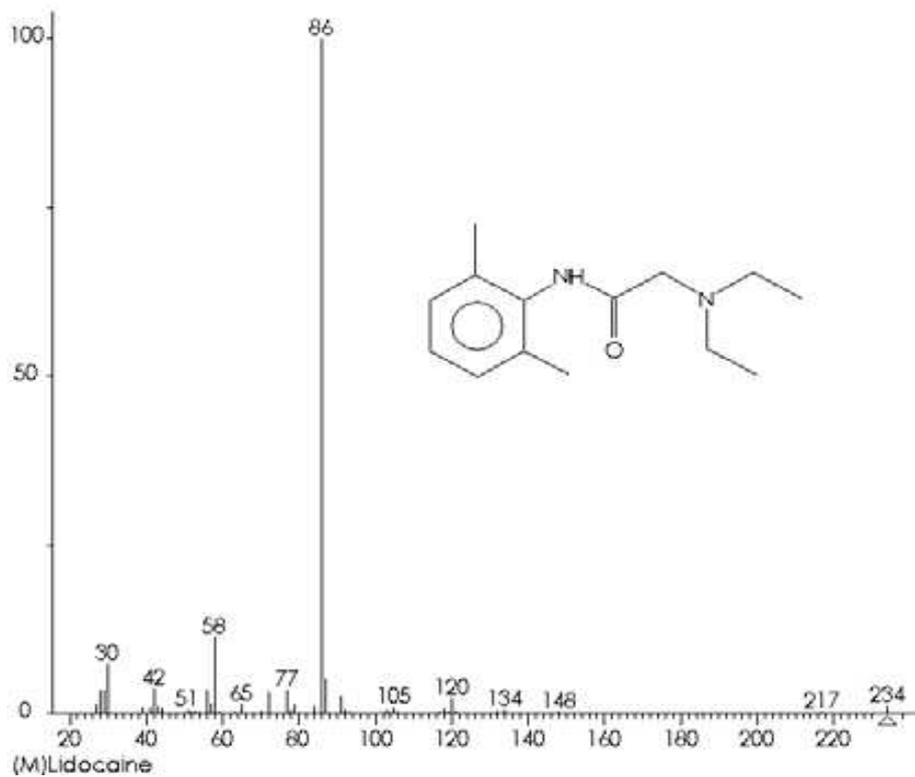


Figure 26 - Exemple d'un spectre de fragmentation (Lidocaïne) (28)

(2) Analyseur à temps de vol (TOF)

Développé dans les années 1950, la spectrométrie de masse à temps de vol (TOF) permet la détermination d'une masse à partir du temps qu'un ion met à parcourir une distance donnée.

Tout d'abord, les ions sont sélectionnés par un analyseur électrostatique qui courbe la trajectoire des ions ayant un rapport énergie par charge E/q . Par la suite, l'ion est post-accélééré et entre dans la section de temps de vol en traversant une très fine feuille de carbone. Cela provoque l'émission d'électrons secondaires à une vitesse supérieure qui sont détectés par des micro-canaux. (32)

L'impulsion donne le signal « START » et le détecteur le signal « STOP ». La connaissance du temps et de la distance permet le calcul de la vitesse de l'ion : $v=d/t$.

A partir de cette information, la masse peut être calculée par la formule suivante : $\frac{M}{q} = 2 \frac{E \tau^2}{q \cdot d^2}$

La performance et la résolution en masse est un point crucial en spectrométrie, un des points faibles de cette méthode est l'incertitude sur le temps de départ et le temps d'arrivée qui conditionnent le résultat en lui-même.

La Figure 27 schématise le principe d'un spectromètre à temps de vol :

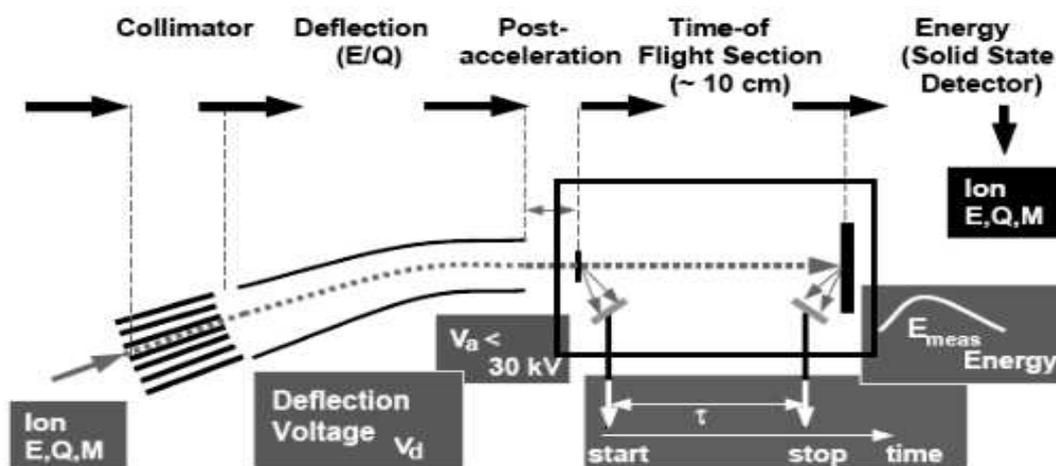


Figure 27 - Principe d'un spectromètre à temps de vol (32)

La quête d'une amélioration des performances engendre des fusions de différentes techniques. Par exemple, le couplage ESI-Q-TOF permet d'analyser après séparation par chromatographie liquide la masse d'un composé : les analytes sont nébulisés par l'ESI puis sont introduites dans le quadripôle et l'analyseur à temps de vol. L'idée est de combiner les avantages des différents analyseurs tout en limitant leurs inconvénients.

(3) Analyseur à trappe orbitale (Orbitrap)

Le spectromètre de masse à trappe orbitale associe un injecteur, une trappe à ion linéaire qui stocke les ions de la source, et l'analyseur couplé en ligne.

La trappe ionique est constituée de 2 électrodes, une interne en forme de fuseau et une externe en forme de baril qui recouvre la première. (Figure 28)

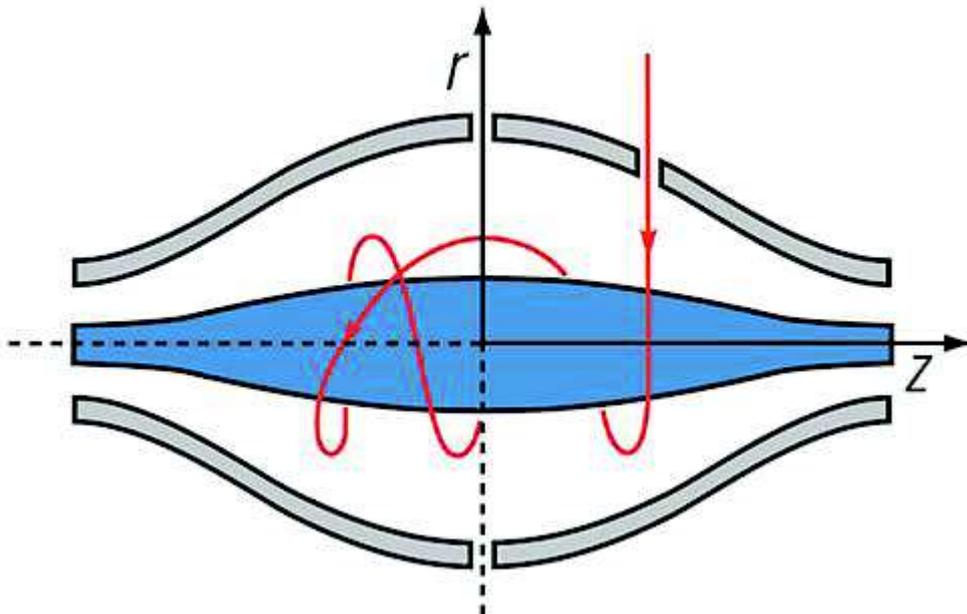


Figure 28 - Electrodes du spectromètre de masse à trappe orbitale (33)

Une somme de fréquences est détectée, permettant via le calcul de transformée de Fourier, de tracer un spectre de masse.

L'injection est contrainte par un faible diamètre de faisceau d'injection et un temps d'injection très court. Une grande différence avec les quadripôles est que le spectromètre de masse à trappe orbitale doit recevoir un apport ionique discontinu : il est nécessaire d'avoir une trappe ionique pour résoudre ce problème.

Les électrodes fournissent une distribution du champ électrique déterminable par la formule suivante :

$$U(r, z) = \frac{k}{2}(z^2 - \frac{r^2}{2}) + \frac{k}{2}(R_m)^2 \ln(\frac{r}{R_m}) + C$$

Avec :

- r et z : les coordonnées cylindriques
- C : une constante
- k : la courbure du champ
- R_m : le rayon caractéristique.

L'orbite stable décrite par l'ion est exprimée par la formule suivante :

$$qV = \frac{1}{2}mv^2(\frac{R}{r})$$

Avec :

- V : la différence de potentiel entre les électrodes
- R : le rayon de l'électrode extérieure
- r : le rayon de l'électrode centrale.

La détection en elle-même repose sur le calcul de l'oscillation radiale par l'équation suivante :

$$\omega = \sqrt{\frac{e}{m} \frac{k}{z}}$$

Avec :

- k : la force de rappel axial
- e : la charge élémentaire ($1,602 \times 10^{-19}$ coulomb).

La fréquence d'oscillation ω est inversement proportionnelle au rapport m/z . Plus précisément, cette oscillation crée un champ électrique qui est détecté, puis transformé en utilisant la formule de Fourier, afin d'obtenir le rapport m/z .

C'est une technique très performante, aussi bien en limite de détection qu'en résolution ou justesse. Elle est utile pour l'analyse de petites molécules avec des applications en protéomique, métabolomique, mais aussi en pharmacologie-toxicologie.

C. Pourquoi faire un screening toxicologique et pour quel laboratoire ?

Le screening toxicologique consiste à détecter et identifier des médicaments, stupéfiants et autres toxiques, dans le sang ou les urines principalement, mais également dans diverses matrices biologiques telles que la bile, le contenu gastrique, l'humeur vitrée, du liquide d'épanchement, etc.

Les techniques immunologiques ont été et sont encore utilisées pour un dépistage rapide de certaines intoxications, qu'elles soient médicamenteuses ou par des stupéfiants. Cependant, elles constituent une approche de recherche de toxique très ciblée.

Depuis 25 ans, l'évolution des méthodes a profondément changé l'approche du screening toxicologique. L'essor des méthodes de séparation par chromatographie liquide ou gazeuse, aussi bien que des méthodes de détection avec des barrettes de diodes UV-Visible ou de la spectrométrie de masse, ont permis un bond en avant dans le criblage toxicologique et nécessite une redéfinition de celui-ci.

D'après la Société Française de Biologie Clinique (SFBC) et la Société Française de Toxicologie Analytique (SFTA) (34), le screening toxicologique se définit comme une technique analytique ou une combinaison de techniques analytiques permettant la détection et l'identification d'au moins 200 composés distincts dans un échantillon biologique.

La méthode se doit d'être validée, soit de manière qualitative, soit de manière semi-quantitative, en suivant la norme ISO 15189.

N'importe quel laboratoire équipé d'un système chromatographique et d'une méthode de détection adaptée peut développer et utiliser un screening toxicologique. Cependant, cette méthode analytique doit répondre à une demande spécifique : une éventuelle intoxication médicamenteuse volontaire ou non, une inobservance, exclusion d'une cause toxique suite à des troubles de la conscience, etc. avec une certaine notion d'urgence.

Pour cela l'estimation de la concentration par rapport à une zone thérapeutique et un seuil toxique, pour chaque médicament ou stupéfiant, est nécessaire. Au-delà de répondre qualitativement sur la présence ou non d'une molécule, il est bien plus intéressant de faire une estimation de sa concentration pour l'interpréter et donner une information plus pertinente pour la prise en charge du patient.

Le laboratoire de pharmacologie-toxicologie du CHU de Rouen met en œuvre un tel screening toxicologique pour répondre aux sollicitations des services des urgences, de réanimations, ou d'autres services cliniques. Elle est régulièrement utilisée également dans le cadre de l'activité médico-légale du laboratoire.

Le présent travail consiste à décrire l'évolution et la validation d'une méthode de screening toxicologique semi-quantitative, afin d'en connaître les forces et les faiblesses, tout en répondant aux exigences d'accréditation du laboratoire.

II. Méthode actuellement utilisée au laboratoire

A. Pré-analytique

Le screening toxicologique s'effectue à partir de prélèvements sanguins (sang total ou plasma) réalisés sur tubes hépariné et fluoré, ainsi que sur des prélèvements urinaires dans la plupart des cas.

L'acheminement des prélèvements doit se faire dans un délai de 6 heures maximum au laboratoire. Une sérothèque est alors réalisée afin de conserver les prélèvements à -20°C avant leur potentielle analyse. Ces prélèvements sont conservés pendant 30 jours si aucune analyse n'est demandée.

Le screening se fait par demande directe en concertation clinico-biologique, notamment pour obtenir les renseignements nécessaires à la bonne orientation de la ou des analyses à prévoir : informations cliniques et évolution ? Tentative d'autolyse ? Traitement en cours ? Stupéfiants suspectés ? etc.

L'analyse est alors réalisée les jours ouvrables avec un rendu de résultat en moyenne de 24 à 48h afin de répondre au mieux à l'urgence de la demande et du contexte clinique.

B. Analytique

L'analyse actuellement utilisée au laboratoire du CHU de Rouen permet de dépister 244 molécules par HPLC avec détection par spectrométrie de masse en tandem dont 229 en mode positif et 15 en mode négatif.

La séparation chromatographique se fait par élution avec un gradient de phases mobiles à l'aide d'une colonne (Macherey-Nagel - Nucléodur Sphinx 3µm) et d'une détection par MRM sur un spectromètre de masse SCIEX® 4500QTRAP.

1. Préparation des échantillons

Au total, la méthode se repose sur l'injection de 5 échantillons :

- Un blanc correspondant à la matrice testée
- Un dopant à 10 ng/mL
- Un dopant à 100 ng/mL
- L'échantillon pur
- L'échantillon dilué au 1/10^e

D'un point de vue pratique, le dopant à 100ng/mL résulte d'un mélange de plusieurs solutions mères préparées à des concentrations de 10 µg/mL. Le dopant à 10 ng/mL étant une dilution au 1/10^e de celui à 100 ng/mL.

Le tableau en annexe résume le mélange des différents dopants. (Annexe 1)

La préparation de chaque matrice à analyser est effectuée à partir d'un mélange de 100µL d'échantillon et de 200µL de solution d'étalon interne : soit diazépam-D5 pour le sérum, le plasma et les urines ou le diazépam-D5 à 80% MeOH / 20% ZnSO₄ pour le sang total.

Ce mélange est vortexé, puis centrifugé pendant 5 minutes à 16000g afin d'éliminer les impuretés et de préserver les colonnes chromatographiques. Le surnageant est placé dans des vials pour injection sur le système analytique.

Dans l'idéal deux méthodes d'acquisition sont nécessaires pour un dépistage complet par échantillon, l'une en mode d'ionisation positif et l'autre en mode d'ionisation négatif. En pratique, l'échantillon est passé systématiquement en mode positif et potentiellement en mode négatif en fonction du contexte clinique.

2. Configuration de la chromatographie

La séparation est réalisée sur une chromatographie liquide en phase inversée avec une colonne (Macherey-Nagel - Nucleodur Sphinx RP 3µm).

Les paramètres chromatographiques sont indépendants du mode d'ionisation utilisé. Le volume injecté est de 20 µL. La température du four de la colonne est à 40°C et celui de l'injecteur à 8°C.

Le gradient d'élution appliquée ici est du méthanol (A) avec 0,2% d'acide formique (Figure 29), et (B) du formate d'ammonium à 2 mM avec 0,2% d'acide formique.

La phase mobile est programmée de la manière suivante avec une alternance progressive entre phase hydrophobe et hydrophile formant ainsi un gradient d'éluion (Figure 29) :

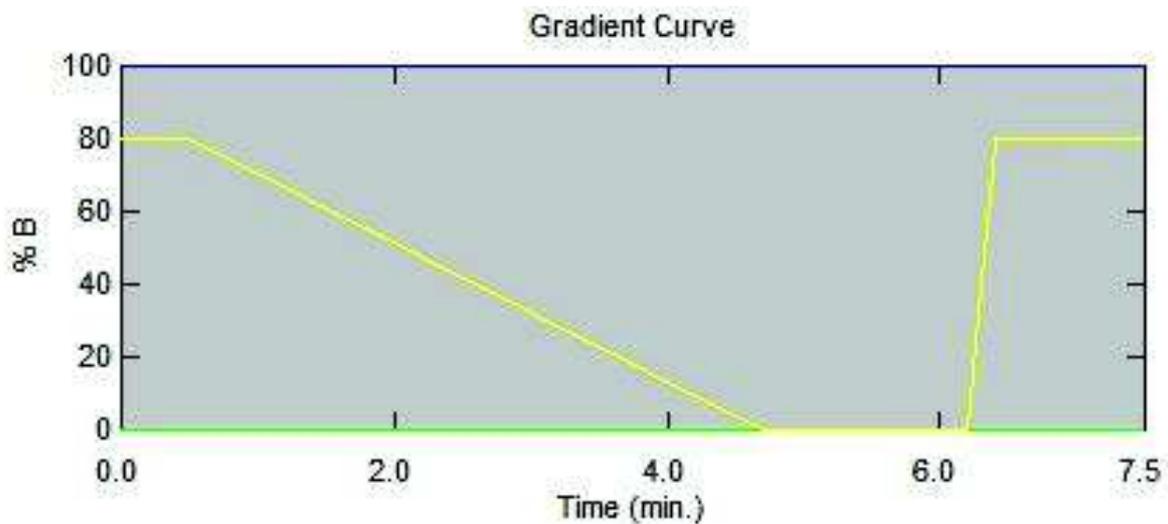


Figure 29 - Gradient d'éluion de la phase mobile

Les composants les plus hydrophiles vont sortir en premier de la colonne avec un temps de rétention faible, et inversement pour les composés hydrophobes.

3. Configuration du spectromètre de masse

Le spectromètre de masse utilisé est un SCIEX® 4500 QTRAP utilisé en détection MRM, Q1 et Q3 sont donc en mode statique.

L'identification des molécules repose sur la fragmentation de celles-ci et la détection spécifique des ions pères et fils : les données sont disponibles dans l'Annexe 2 et l'Annexe 3.

Les données utilisées pour la détection sont soit basées sur la littérature scientifique utilisant les mêmes types de spectromètres de masse (ESI et spectromètre de la même marque) étant donné que les données sont peu reproductibles entre les différents constructeurs de spectromètre de masse, soit utilisées suite à l'optimisation de molécules dosées par ailleurs dans le laboratoire, soit constituées sur l'expérience d'un cas clinique concret : les données d'un ancien screening sont réutilisées pour développer la nouvelle méthode.

Le paramétrage du spectromètre de masse dépend du mode d'ionisation et de la molécule recherchée. Quatre paramètres doivent être déterminés pour chaque molécule :

- Le DP correspondant au potentiel de déclusterisation (declustering potential) en V.
- L'EP au potentiel à l'entrée (entrance potential) en V.
- Le CE à l'énergie de collision (collision energy) en eV.
- Le CXP au potentiel de sortie de la cellule de collision (cell exit potential) en eV.

De manière globale, le DP est fixé à 60 V, l'EP à 10 V, le CE à 35 eV et le CXP à 15 eV en valeur absolue (positif ou négatif).

Une acquisition en scheduled MRM permet d'enregistrer le signal de chaque molécule seulement autour de son temps de rétention, cela permet d'optimiser la sensibilité du spectromètre en limitant le nombre de molécules à détecter en même temps au cours de la séparation.

De plus, si le pic chromatographique est suffisamment intense, le spectromètre enregistrera le spectre de fragmentation complet des ions fils (Q1 en mode statique et Q3 en mode scan) pour améliorer la spécificité de détection et l'interprétation du résultat.

C. Post-analytique

L'interprétation se fait via le logiciel Analyst® : l'observation simultanée des pics chromatographiques des cinq échantillons permet la détection et une estimation de la concentration afin d'aiguiller le clinicien sur l'absence ou la présence de composés dans le prélèvement biologique, ainsi que sur le niveau de concentration.

L'étalon interne permet, de s'assurer de la stabilité des temps de rétention ainsi que de l'intensité du signal (Figure 30).

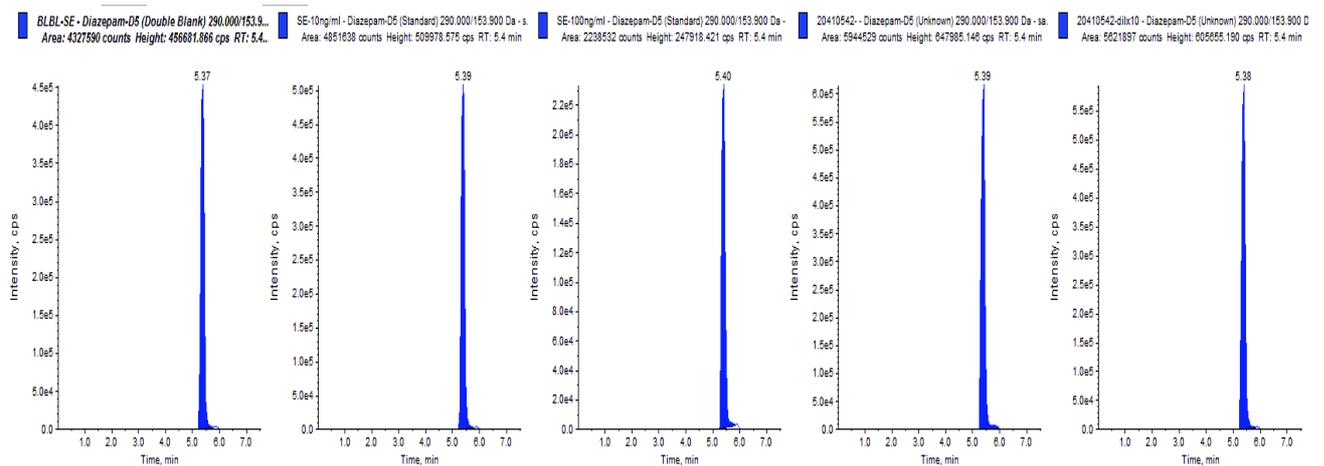


Figure 30 - Exemple d'Interprétation : Etalon interne

Le retraitement de l'analyse passe ensuite par l'observation et l'interprétation des chromatogrammes des molécules une à une afin d'en déterminer la présence (Figure 32) ou l'absence (Figure 31).

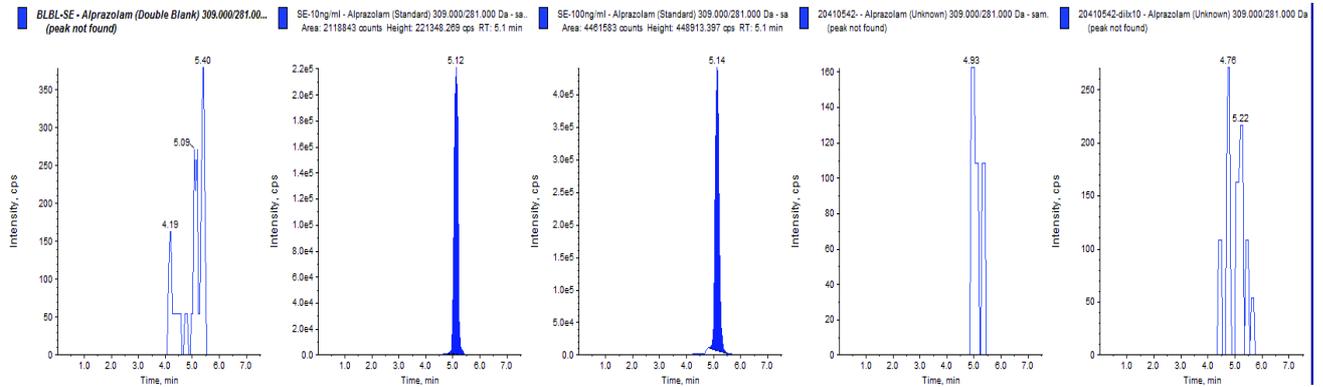


Figure 31 - Exemple d'Interprétation : Résultat négatif

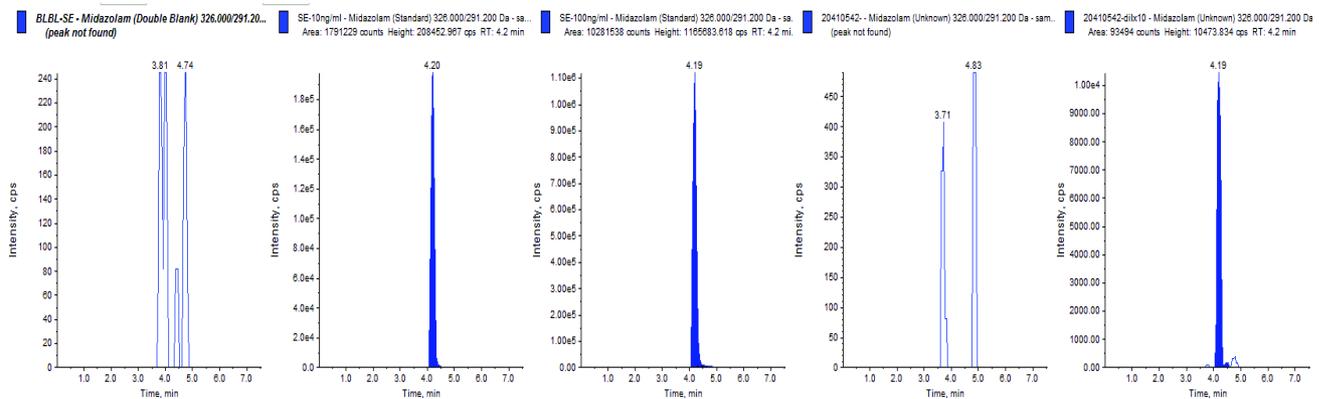


Figure 32 - Exemple d'Interprétation : Résultat positif

Des pièges sont à éviter comme la contamination du blanc qui rendrait un faux positif (Figure 33), un temps de rétention différent qui correspondrait à une interférence par une autre molécule (Figure 34), ou encore des molécules présentant une structure ou une masse moléculaire proche (par exemple Tramadol et Venlafaxine).

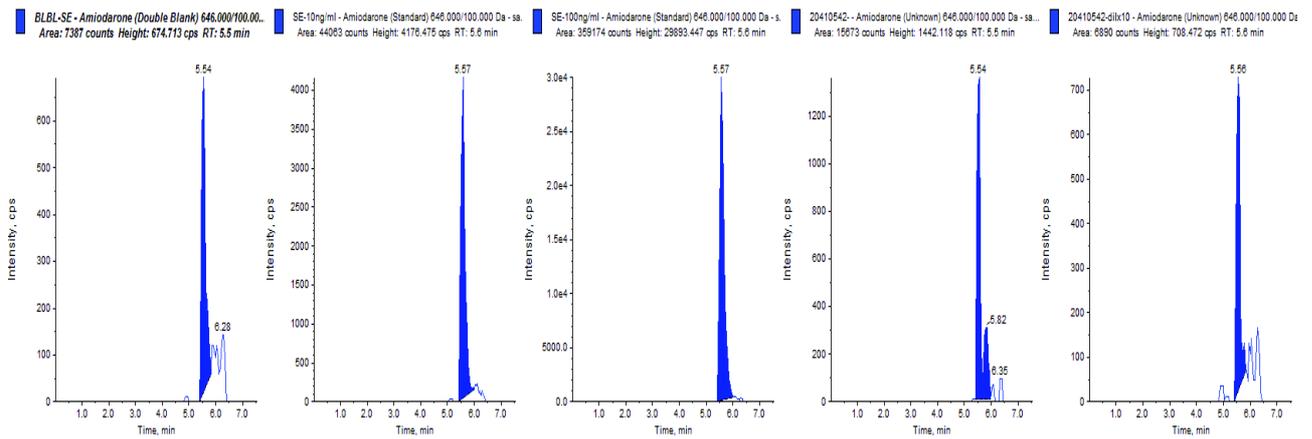


Figure 33 - Exemple d'Interprétation : Faux positif par contamination

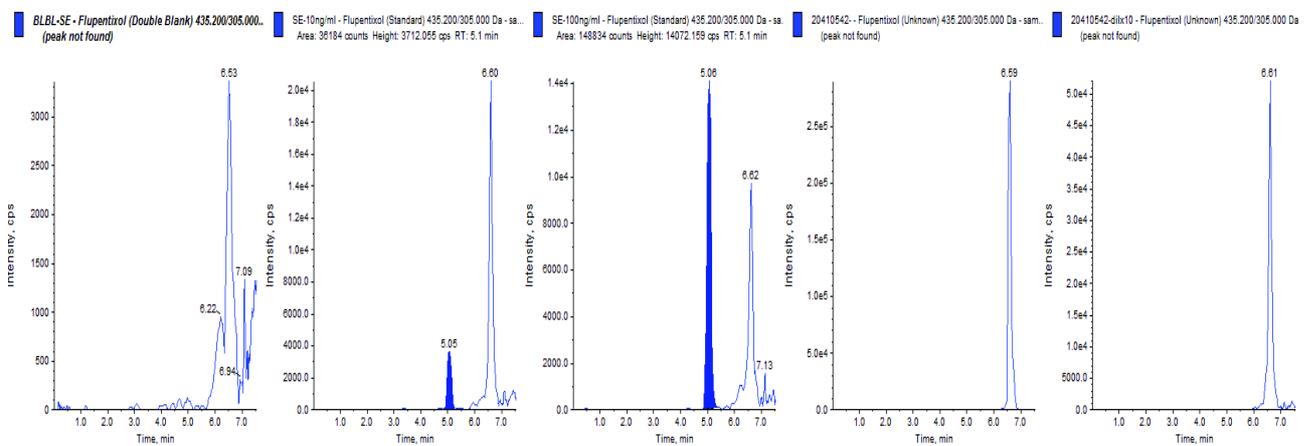


Figure 34 - Exemple d'Interprétation : Interférence à un temps de rétention inapproprié

En cas de doute, le spectre de fragmentation des ions fils peut être analysé, si l'intensité du signal est suffisante, afin de déterminer via une comparaison avec une bibliothèque de spectres ou par une recherche bibliographique, si le pic visible correspond ou non à la molécule recherchée.

III. Validation de la nouvelle méthode

A. Changements

Une réflexion a été menée afin de sélectionner dans un premier temps les molécules à supprimer de la méthode existante, et de choisir dans un second temps celles à ajouter. Les choix ont été faits à partir des molécules peu pertinentes car plus commercialisées, déjà dosées fréquemment par ailleurs au laboratoire (type anti-infectieux), ou non détectables selon la séparation chromatographique utilisée.

La liste suivante détaille les molécules supprimées de la méthode existante :

Aceprometazine	Daptomycine	Meropenem
Aciclovir	Ecgoninemethylester	Morphine-3&6-bêta-glucuronide
Baclofène	Ertapenem	Phénylbutazone
Carbutamide	Ethacrynic acid	Piperacilline
Céfépime	Fluconazole	Posaconazole
Cefotaxime	Fluphenazine	Rifampicine
Cefoxitine	Gabapentine	Thebacon
Ceftazidime	Ganciclovir	Thébaïne
Ceftriaxone	Griséofulvine	Théophylline
Ciprofloxacine	Imipenème	Voriconazole
Clarithromycine	Itraconazole	Cloxacilline
Clopamide	Itraconazole (Hydroxy-)	Levofloxacine

Tableau 4 - Liste des molécules supprimées du screening

Le choix des nouvelles molécules a été décidé principalement à partir de cas rencontrés au cours desquels certaines molécules absentes de la méthode faisaient défaut. Il a été fait sur des critères d'usage, notamment pour les cardiotropes (35), sur les nouveautés médicamenteuses disponibles au grand public, sur l'évolution des mésusages, etc.

Voici la liste des molécules sélectionnées pour le nouveau screening toxicologique :

Acénocoumarol	Méthylphénidate	Rispéridone 9-OH (Palipéridone)
Apixaban	Métoclopramide	Rivaroxaban
Candésartan	Nalbuphine	Rivastigmine
Captopril	Nalmefène	Saxagliptine
Cotinine	Nicotine	Sitagliptine
Dabigatran	Ondansétron	Spironolactone
Enalapril	Prégabaline	Urapidil
Entacapone	Périndopril	Vigabatrine
Fluindione	Propofol	Vildagliptine
Granisétron	Racécadotril	Zonisamide
Lacosamide	Ramipril	

Tableau 5 - Liste des molécules ajoutées au screening

La difficulté dans l'ajout des molécules est de trouver les transitions adéquates au spectromètre de masse QTRAP 4500 utilisé. Pour cela, une recherche bibliographique a consisté à rechercher les ions pères et fils (Q1 et Q3) de chaque molécule, avec des automates au moins équivalents de la même marque.

Par souci d'amélioration complémentaire, et en accord avec les recommandations de la Société Française de Toxicologie Analytique (SFTA) (34), il a été décidé d'utiliser trois étalons internes au lieu d'un seul, ayant des propriétés physico-chimiques différentes, et ayant des temps de rétention répartis sur la totalité du chromatogramme.

Les étalons internes retenus sont le Diazepam-D5 ; la morphine-D3 ; le THC-D3.

B. Expérimentations

1. Principe de manipulation

La première expérimentation a consisté à vérifier la bonne détection des nouvelles molécules à ajouter dans la méthode du screening toxicologique. Pour cela, la préparation d'étalons était nécessaire. La condition principale pour sa conception a été de ne pas mélanger plus d'une dizaine de molécules pour limiter le plus possible les interactions : l'objectif était au début de savoir si les molécules étaient détectables et avoir une notion de l'intensité du signal.

Dans un premier temps ces étalons ont été préparés dans du méthanol à partir de médicaments solubilisés, obtenus auprès de la pharmacie de l'hôpital. Ces médicaments avaient des formes galéniques différentes : comprimés, gélules ou solutions injectables. Ils ont été dissous ou solubilisés dans un volume de 5mL de méthanol pour la majorité (36) créant ainsi une solution mère F0 ayant des concentrations spécifiques de l'analyte dépendant de la dose contenue dans la forme galénique (Tableau 6).

Puis les solutions mères ont été diluées afin d'obtenir une concentration uniformisée de 100 µg/mL dans une solution F0'.

Quatre étalon F1 à 1 µg/mL ont été ensuite confectionnés à partir des solutions F0'. Puis pour terminer, une dilution de F1, pour obtenir les étalons F2 et F3, respectivement à 100 ng/mL et 10 ng/mL, a permis d'aboutir à des solutions proches des conditions utilisées de l'ancienne méthode.

Ces premiers tests, avec les étalons F2, ont été effectués en mode positif, sauf pour le propofol et l'hydrochlorothiazide testés en ionisation positive et négative. Les premiers résultats étaient concluants avec une détection du pic chromatographique ainsi que du temps de rétention des différentes molécules. L'information quant à l'intensité du signal, même si elle n'était pas la plus importante à ce stade, était à prendre avec précaution compte tenu de la préparation à partir de formes galéniques où la dissolution était partielle comme par exemple avec la nicotine.

Molécule	Forme galénique	Dose (mg)	Volume dissolution (mL)	Concentration solution mère F0 (mg/mL)
Etalon 1				
Nalmefène	Comprimé	18	4,5	4
Prégabaline	Gélule	100	5	20
Fluidione	Comprimé	20	5	4
Apixaban	Comprimé	5	3,75	1
Dabigatran	Comprimé	75	5	20
Spironolactone	Comprimé	25	5	5
Ramipril	Comprimé	5	5	1
Enalapril	Comprimé	5	5	1
Irbesartan	Comprimé	75	3,75	20
Rivaroxaban	Comprimé	10	5	2
Vigabatrine	Comprimé	500	5	100
Etalon 2				
Acénocoumarol	Comprimé	1	5	0,2
Périndopril	Comprimé	2	5	0,4
Captopril	Comprimé	25	5	5
Candésartan	Comprimé	4	5	0,8
Saxagliptine	Comprimé	5	5	1
Sitagliptine	Comprimé	100	5	20
Vildagliptine	Comprimé	50	5	10
Zonisamide	Comprimé	100	5	20
Méthylphénidate	Comprimé	10	5	2
Racécadotril	Gélule	100	5	20
Etalon 3				
Rispéridone 9-OH	Solution	100	20	5
Lacosamide	Solution	N/A		10
Ondansétron	Solution	N/A		2
Granisétron	Solution	N/A		1
Métoclopramide	Solution	N/A		5
Urapidil	Solution	N/A		5
Propofol	Solution	N/A		10
Etalon 4				
Entacapone	Comprimé	200	5	40
Rivastigmine	Comprimé	1,5	3	0,5
Nalbuphine	Solution	N/A		10
Hydrochlorothiazide	Comprimé	25	5	5
Lisinopril	Comprimé	5	5	1
Nicotine	Pastille	1,5	3	0,5
Prégabaline	Gélule	100	5	20
Vigabatrine	Comprimé	500	5	100
Propofol	Solution	N/A		10

Tableau 6 - Préparation des solutions mères F0

2. Difficultés expérimentales

Les antiépileptiques tels que la prégabline et la vigabatrine n'ont pas été détectées quel que soit le milieu de dilution (eau ou méthanol) ou leurs concentrations (tests jusqu'à 25000 ng/mL, pour des concentrations thérapeutiques entre 2000 et 10000 ng/mL) (37). Ces molécules ne sont pas retenues sur la phase stationnaire de la cartouche d'extraction en ligne ou de la colonne chromatographique, par conséquent il a été décidé de ne pas retenir ces molécules dans la nouvelle méthode.

Le propofol et l'hydrochlorothiazide n'ont pas été détectés en mode positif ou négatif lors des premiers tests. D'autres tests complémentaires avec différentes transitions de la littérature et à plusieurs concentrations ont été faits (10, 100 et 1000 ng/mL), mais n'ont pas permis d'obtenir de résultats concluants. Par conséquent, l'hydrochlorothiazide n'a pas été retenu pour la nouvelle méthode. Le propofol a été conservé en mode négatif mais a été complété par son métabolite le propofol glucuronide. In vivo, le propofol est rapidement métabolisé en propofol glucuronide (38), et il a été décidé d'ajouter des transitions issues de la littérature car aucune solution étalon de ce métabolite était disponible au laboratoire.

Le racécadotril était difficilement détectable, de plus, il s'agit d'une prodrogue rapidement métabolisée. Par conséquent, il n'a pas été retenu pour la suite du développement de méthode.

Enfin, le lisinopril n'était pas détectable à 100 ng/mL. La cause n'a pas été clairement identifiée (Difficilement ionisable en mode positif ? Molécule non retenue sur la phase stationnaire ? Problème de solubilité ?), par conséquent cette molécule a été retirée de la méthode, en attendant une éventuelle réévaluation à partir d'une solution étalon.

Toutes les autres molécules présentes dans l'étalon ont présenté de bons résultats, voire même des signaux trop intenses à 100 ng/mL par rapport à leurs concentrations thérapeutiques. C'est le cas notamment de l'irbesartan et de la sitagliptine, qui ont toutefois vu leur intensité diminuer lors des tests effectués sur une méthode regroupant l'ensemble des molécules du screening, et rend possible la distinction entre des concentrations d'ordre thérapeutique et supra thérapeutique.

De nouveaux tests ont été fait par la suite, dans les conditions de préparation d'échantillon du screening toxicologique, afin de travailler en matrice. Pour cela, le mode opératoire de la préparation des échantillons a été utilisé avec les étalons F2 dans une matrice de sang total avec un étalon interne qui est le diazépam-D5.

L'intérêt était de déterminer, quel impact avait la matrice sur l'intensité ou le temps de rétention des différentes molécules, et de déterminer un temps de rétention relatif par rapport à l'étalon interne.

Les seules différences notables de temps de rétention ont été observées pour la fluindione à 5,1 min dans du sang total par rapport à 4,6 dans du méthanol ou encore le candésartan à 1,6 min au lieu de 6,1 min (spectre de fragmentation vérifié pour s'assurer de l'identification, le pic à 6,1 min étant initialement considéré comme une interférence. Pour s'assurer de l'interprétation, une étude de la propriété physico-chimique du candésartan peut aider, son logP est égal à 4,1 (39), molécule amphiphile, ne justifiant pas un temps de rétention à 6,1 min équivalent à celui du THC aussi à 6,1 min pour lequel le logP est égal à 7,0 (36). Il est vrai cependant que l'on pourrait s'attendre à un temps de rétention plus intermédiaire.

Une fois toutes ces corrections faites, la nouvelle méthode a été mise en place. L'ancienne et la nouvelle méthode ont été comparées afin de déterminer s'il existait une perte de sensibilité liée au changement de la liste des molécules détectées, et notamment à la légère augmentation du nombre de ces molécules (229 molécules pour l'ancienne méthode et 247 molécules pour la nouvelle en mode positif).

Le dernier changement majeur a été d'augmenter le nombre de points de gamme afin d'obtenir un résultat plus fiable quantitativement. L'objectif serait alors de passer une gamme une fois par semaine pour l'ensemble de la semaine, si sa stabilité est vérifiée. Cette gamme serait composée de cinq points : 10 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 ng/mL.

C. Démarches qualité

Pour répondre aux normes de qualité dans le cadre de l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189, la Société Française de Biologie Clinique (SFBC) et la Société Française de Toxicologie Analytique (SFTA) ont défini les exigences minimales pour réaliser un screening toxicologique (34).

La définition même du screening est basée sur l'utilisation d'une ou plusieurs techniques analytiques combinées permettant la détection et l'identification d'au moins 200 composés distincts sur un échantillon biologique. Néanmoins pour des raisons de coûts ou de disponibilité, toutes les molécules ne peuvent faire l'objet de la validation de méthode : un compromis est nécessaire.

L'analyse est à accréditer en portée B selon la norme NF EN ISO 15189, avec une validation à partir de poudres pures dans l'idéal ou à partir de pesées ou de solutions injectables comme décrit dans le chapitre précédent.

Le principe est de valider une liste représentative de molécules et de compléter progressivement à l'ensemble de la bibliothèque au cours du temps.

1. Phase pré-analytique

La validation est axée sur la matrice de sang total, celle-ci étant la plus utilisée au quotidien dans le laboratoire, néanmoins toutes matrices biologiques doivent pouvoir être analysées, des protocoles de type « équivalence de matrices » comme décrit par la SFTA (34), permet de réduire la quantité de manipulations pour valider la méthode. Son application sera détaillée par la suite.

2. Phase analytique

a) *Points-clés de la validation*

Il existe deux types de validation pour cette méthode, soit en dosage qualitatif, soit en dosage semi-quantitatif. Les recommandations de la SFTA (34) ont été utilisées pour valider la méthode du screening en semi-quantitatif, qui exige plus de paramètres à déterminer et vérifier.

Ces paramètres sont les suivants :

- La répétabilité est définie par l'étroitesse d'accord entre des résultats successifs obtenus avec la même méthode sur un échantillon identique dans les mêmes conditions.

Sa vérification est faite sur au moins cinq passages successif d'un même échantillon, caractérisée par un coefficient de variation. La méthode étant semi-quantitative, on considère une limite de 30%, cependant cette notion est à relativiser en fonction de la concentration considérée (impact différent entre une valeur à 100 ng/mL et une valeur à 10 ng/mL).

Les critères retenus sont les suivants :

- Optimal si < 15% : Conditions d'une analyse quantitative
- Bon si entre 15 et 30% : Conditions d'une analyse semi-quantitative
- Limite entre 30 et 40%
- Elevé si > 40%

- La reproductibilité (ou fidélité intermédiaire) est recommandée dans le cadre d'une recherche semi-quantitative. Elle consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages, etc.

La valeur acceptable du CV est calculée selon la formule suivante : $(\%) = (F_c \times \text{intervalle de référence} \times 100) / \text{moyenne de l'intervalle}$

Cette formule nécessite d'être utilisée dans un premier temps avec l'intervalle de référence correspondant à la concentration thérapeutique du médicament considéré. Puis dans un second temps, avec la concentration toxique.

Pour reprendre un exemple explicité par la SFTA : Un composé A avec des zones thérapeutiques entre 40 et 80 ng/mL et une zone toxique à partir de 200 ng/mL (34) :

- Calcul du biais de justesse minimal par rapport à la zone thérapeutique :

$$(\%) = (0,375 \times (80 - 40) \times 100) / (60) = 25 \%$$

- Calcul du biais de justesse minimal par rapport à la concentration toxique :

$$(\%) = (0,375 \times (200 - 80) \times 100) / (140) = 32 \%$$

Le facteur F_c selon le biais de justesse minimal, souhaitable et optimal, a respectivement une valeur de 0,375 ; 0,25 et 0,125.

Cette formule n'est pas applicable dans le cas de composés ou toxiques non médicamenteux ou dans le cas de médicaments pour lesquels aucun intervalle thérapeutique n'est disponible dans la littérature scientifique. Dans ce cas, les seuils retenus peuvent être les mêmes que pour la répétabilité. Dans un souci d'homogénéité, cette solution a été utilisée pour l'ensemble des molécules validées au cours de ce travail. Pour valider la fidélité intermédiaire,

le coefficient de variation est calculé à partir de l'AUC des pics chromatographiques des molécules recherchées des différents échantillons testés sur trois jours différents avec au moins deux jours d'écart.

- La limite de quantification (LQ) est la plus petite valeur mesurée pour une technique analytique.

Cette détermination doit concerner à minima 50 molécules distinctes d'au moins 5 familles de médicaments différents. L'utilisation d'une procédure déjà accréditée de dosage quantitatif peut être utilisée (34). Pour des résultats fiables, la LQ doit être déterminée sur trois jours non consécutifs : la valeur retenue doit être détectée lors des trois tests. Concrètement, des étalons à 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ng/mL ont été analysés sur trois jours non consécutifs.

- La contamination inter-échantillon est déterminée en utilisant un blanc matrice suivi de trois échantillons contenant des composés présents au moins à 20 fois la LQ, suivi d'un nouveau blanc matrice. Le but est de vérifier l'absence de signal détectable dans le dernier blanc afin de s'assurer de l'absence de contamination entre les échantillons.
- L'équivalence de matrice a pour objectif de tester différentes matrices en plus du sang total afin de déterminer si elles sont équivalentes pour la méthode.

Le principal intérêt de prouver que le plasma, les urines et le sang total sont équivalents est de réunir et condenser les séries analytiques. Concrètement, une gamme ou des CIQ faits en sang total pourraient servir pour l'ensemble des matrices utilisées.

En l'absence de recommandation claire sur la détermination de l'équivalence de matrice, un premier protocole a été développé à partir d'échantillons dosés sur 3 jours et d'un calcul de coefficient de variation à partir de l'AUC. Néanmoins, par la suite, une autre approche a été élaborée (III.C.2.d)).

Les contrôles internes de qualité (CIQ) font aujourd'hui partie intégrante de toutes les analyses de biologie médicale. Concernant le screening toxicologique, les recommandations sont de réaliser des CIQ tous les jours si le laboratoire fait des screening quotidiennement. Ils doivent être composé d'un minimum de 10 molécules de 5 familles thérapeutiques et/ou drogues différentes, ayant des temps de rétention répartis sur l'ensemble de la séparation chromatographique, ayant un rapport m/z distribué entre 50 et 700, avec si possible une vérification des modes d'ionisation positif et négatif. De manière concrète, trois niveaux de CIQ bas (10ng/mL), moyen (80ng/mL) et haut (160ng/mL) sont retenus.

b) Expérimentations pratiques

L'expérimentation pour la validation a eu lieu sur 5 jours. Même si l'ensemble des molécules présentes dans les dopants ont été testées, pour des raisons de lisibilité, seuls les résultats d'un échantillon d'environ 10% de l'ensemble des molécules du screening sont présentés en détail dans ce travail.

Le choix de cet échantillon est basé sur les analytes les plus rencontrés au cours des analyses d'échantillons de patients, sur des nouveaux et anciens analytes, ou sur ceux posant le plus de problèmes : par exemple, le zopiclone qui est une molécule se dégradant rapidement ou la venlafaxine et le tramadol présentant des interférences entre eux.

Les manipulations se sont déroulées de la manière suivante :

- Premier jour : la répétabilité a été testée par injection de 6 échantillons à des concentrations théoriques de 10 ; 100 et 200 ng/mL sur une matrice de sang total. La contamination inter-échantillon a également été testée. Enfin, la limite de quantification a été testée par injection d'échantillons de sang total à 1 ; 2,5 et 5 ng/mL.
- Deuxième jour : l'injection de lots différents de blancs matrices de sang total, de sérum et d'urine ont été injectés pour déterminer l'effet matrice.
- Troisième jour : l'injection de deux dopants à 10 ; 100 et 200 ng/mL pour chaque matrice (sang total, sérum et urine) a permis de tester la reproductibilité, mais aussi d'évaluer l'équivalence entre les matrices comme conseillé par la SFTA (34). La limite de quantification a été testée à nouveau de la même manière que le premier jour.
- Quatrième jour : pause dans les manipulations afin de respecter les délais entre les tests comme conseillé dans les recommandations de la SFTA (34).
- Cinquième jour, la reproductibilité et la limite de détection sont déterminées de la même manière que précédemment, sur une matrice de sang total.

c) Premiers résultats

Les Annexe 6, Annexe 7, Annexe 8 exposent les résultats obtenus sur un échantillon de 20 molécules. La validation porte sur un total de 174 molécules pour 249 recherches dans la méthode.

L'échantillon a été sélectionné de manière à représenter une large gamme de familles de médicaments ou stupéfiants, plus ou moins facilement détectables.

La répétabilité, la reproductibilité, les équivalences de matrices sont déterminées par le calcul d'un coefficient de variation des différentes AUC obtenues pour chaque molécule.

La fixation des seuils d'acceptation est globale (voir III C. 2. a), et est à confronter à la concentration de l'analyte mesuré ainsi qu'à sa marge thérapeutique et son seuil toxique. En effet, l'impact d'une variation autour de 30 ou 40% pour une concentration à 10 ng/mL est plus faible que pour une concentration à 200 ng/mL où elle serait potentiellement inacceptable pour une substance toxique à cette dernière concentration. Le plus important est que l'interprétation et le rendu de résultat soient les mêmes, le prescripteur n'ayant pas notion de la valeur retrouvée, seulement de la présence et de la zone thérapeutique du médicament (concentrations normales, infra thérapeutiques ou supra thérapeutiques).

Concentration	200ng/mL	100ng/mL	10ng/mL
Répétabilité : % de molécules testées en fonction du CV et de la concentration			
CV < 30 % (en %)	100	99,4	95,2
CV < 15 % (en %)	90,2	87,3	54,8
CV > 30 % (en %)	0	0,6	4,8
Reproductibilité : % de molécules testées en fonction du CV et de la concentration			
CV < 30 % (en %)	90,8	89,0	69,5
CV < 15 % (en %)	64,7	47,1	0,6
CV > 30 % (en %)	9,2	11,0	30,5

Tableau 7 - Résultats expérimentaux de la répétabilité et de la reproductibilité (174 molécules testées)

Le Tableau 7 présente les résultats de la répétabilité et de la reproductibilité pour l'ensemble des analytes testés. La répétabilité donne d'excellents résultats quelle que soit la concentration. La reproductibilité quant à elle, est très bonne concernant des concentrations de 200 ng/mL et de 100 ng/mL, mais assez faible pour une concentration de 10 ng/mL. L'une des explications est que l'intensité du signal est bien plus faible et plus facilement variable à cette concentration.

Un autre point remarquable est que les molécules difficilement répétables ou reproductibles appartiennent à la famille des stupéfiants opiacés, comme la codéine, le norfentanyl, la morphine ou la 6MAM, à la famille des cardiotropes et en particulier les β -bloquants, comme le propranolol, l'aténolol, le sotalol ou le pindolol, mais aussi quelques médicaments comme le lévétiracétam, l'olanzapine ou la pseudoéphédrine.

La limite de quantification se situe généralement entre 1 et 10 ng/mL (92,8% des molécules). Elle a été déterminée par lecture des pics chromatographiques des tests effectués sur 3 jours distincts, avec un rapport signal / bruit > 10. Concernant les tests effectués au J5 après la maintenance, certaines molécules ont gagné en sensibilité. Par exemple, le rémifentanyl est passé d'une LQ de 100 ng/mL à une LQ de 10 ng/mL, le lévétiracétam d'une LQ de 200 ng/mL à une LQ de 5 ng/mL ; ou encore la vildagliptine d'une LQ de 100 ng/mL à une LQ de 10 ng/mL. Au vu des concentrations thérapeutiques de ces composés (37), il ne s'agit pas d'un problème critique. Néanmoins, ces résultats peuvent être un indice sur le besoin d'une maintenance de l'appareil, de plus, utiliser des CIQ régulièrement permettra d'analyser plus clairement cette évolution.

La contamination inter-échantillon a été déterminée à partir de blancs-matrice passés entre chaque échantillon de 200 ng/mL. Les résultats n'ont pas montré de contaminations significatives par rapport à un signal équivalent à $1/10^e$ du signal à 10ng/mL (échantillons passés le même jour).

L'effet matrice, testé sur 3 lots différents de sang total, 4 de sérum, et 2 d'urines non supplémentés, n'a pas mis en évidence de signaux significatifs ou interférents.

L'équivalence de matrices a été testée par un protocole visant à déterminer un CV des analytes sur différentes matrices et différents jours, avec un calcul proche de celui de la reproductibilité. Le sang total a été comparé avec le sérum et les urines. Après interprétation des résultats et avec le nombre limité d'échantillons testés, une nouvelle procédure a été décidée et sera décrite par la suite pour des résultats plus justes et représentatifs.

d) Discussions

Les premiers résultats sur la validation de la méthode portent sur un total de 174 molécules pour 249 recherches dans la méthode. Bien que répondant aux recommandations de la SFTA de valider au moins 50 molécules et de compléter au fur et à mesure (34), il est intéressant de tester et récolter plus d'informations en particulier sur les molécules non testées.

Un autre point important à noter est qu'une maintenance importante sur le système analytique a été effectuée au milieu des expérimentations, augmentant la sensibilité globale du screening au dernier jour de test. Recommencer tous les tests aurait permis d'avoir de meilleurs résultats, cependant il est plus pertinent de valider la méthode dans des conditions proches du quotidien quitte à avoir des résultats moins satisfaisants tout en les complétant.

Concernant l'équivalence de matrice, le premier protocole mis en œuvre est critiquable par le faible nombre d'échantillons analysés sur les différentes matrices : six en sang total, deux en sérum et deux urines. L'estimation d'un CV regroupant l'ensemble des matrices pour tester l'équivalence de matrice pour chaque molécule est alors peu pertinent et non adapté.

Afin d'obtenir des données plus fiables, la quantification de CIQ en sérum et urines à 10, 80 et 160 ng/mL à partir d'une gamme de sang total à 10, 50, 100, 150 et 200 ng/mL a été choisie. L'écart entre la valeur mesurée des échantillons de CIQ de sérum et d'urine par rapport à la

cible théorique est exprimé en pourcentage. Les seuils d'interprétation retenus seront les mêmes que pour la répétabilité (soit 15% autour de la cible).

La contamination inter-échantillon, négative selon les premiers tests effectués, a été complétée par le passage de blancs matrice après des séries de gamme de concentration croissante.

e) Manipulations complémentaires

Afin de pallier aux limites des premières manipulations, des tests complémentaires ont été élaborés.

L'objectif était de compléter les données de validation, dans le domaine du possible, à partir de comprimés ou solution de la pharmacie hospitalière pour les molécules dont le laboratoire n'avait pas les substances de référence. Ainsi, de 174 molécules testées, ces résultats permettront d'obtenir 222 molécules testées.

Un autre objectif était d'améliorer la sensibilité de la méthode, l'accumulation de molécules et donc de transitions à détecter par spectrométrie de masse engendre une augmentation du temps de cycle total, ce qui a un impact sur le pic chromatographique en diminuant le nombre de points le définissant. Le nombre d'analytes a été revu à la baisse, avec un total de 236 analytes retenus comparativement à 246 initialement (239 et 249 avec les étalons internes). L'obtention des temps de rétention des molécules manquantes aidera également sur ce point, grâce au scheduled MRM.

Les préparations effectuées pour ces manipulations ont été les suivantes :

- Une gamme de sang total à 10, 50, 100, 150 et 200 ng/mL préparée en cinq exemplaires, à l'exception de quelques molécules comme le paracétamol, la lidocaïne ou la metformine dont les concentrations sont à 1, 5, 10, 15 et 20 µg/mL conformément aux concentrations thérapeutiques usuelles (37). Les objectifs sont d'ajouter les informations manquantes dans les premiers tests, de confirmer et compléter la répétabilité, de déterminer la contamination inter-échantillon par le passage des blancs après les gammes qui sont de concentrations bien supérieures à la LQ.
- Des CIQ à 10, 80 et 160 ng/mL (et 1, 8 et 16 µg/mL pour les quelques exceptions) en sang total, en sérum et en urine : chaque matrice et chaque concentration préparées en triplicata. L'objectif est de tester l'équivalence entre les matrices en comparant la précision du résultat vis-à-vis d'une gamme complète de sang total.
- Des échantillons en sang total à 1, 2,5 et 5 ng/mL afin de compléter les données concernant la LQ.

f) *Derniers résultats et conclusion*

La répétabilité a été complétée pour 222 molécules sur 236 au total et à des concentrations complémentaires (Tableau 8). La reproductibilité n'a pas été mise à jour, vu que ces manipulations complémentaires se sont déroulées sur une seule journée.

Concentration	200 ng/mL	150 ng/mL	100 ng/mL	50 ng/mL	10 ng/mL
Répétabilité : % de molécules testées en fonction du CV et de la concentration					
CV < 30 % (en %)	97,8	95,9	95,4	85,0	89,3
CV < 15 % (en %)	85,6	72,0	78,5	6,10	47,8
CV > 30 % (en %)	2,2	4,1	4,6	8,9	10,7

Tableau 8 - Résultats du pourcentage de molécules validé en répétabilité en fonction du CV cible

Les résultats obtenus concordent avec les précédents, sauf à la concentration de 50 ng/mL avec un CV entre 15 et 30% pour la majorité des molécules testées : une erreur de manipulation en est probablement à l'origine.

La contamination inter-échantillon déterminée par le passage des blancs n'a montré aucun pic significatif comparativement au signal des LQ de chaque analyte, sauf pour le paracétamol, le fentanyl et la chloroquine.

La limite de quantification est similaire à celles des premières manipulations (92,8% avec une $LQ \leq 10$ ng/mL, comprenant 222 analytes sur 239 au total). Certaines molécules ont même une LQ inférieure comparativement aux valeurs retenues initialement, comme pour le méprobamate, l'amlodipine, la spironolactone, le lévétiracétam, etc. D'autres comme la metformine, le paracétamol, etc. ont requis de rechercher des LQ plus élevées, de par leurs concentrations thérapeutiques de référence (37).

L'équivalence de matrice entre le sang total et les matrices sérum et urine est déterminée à partir d'une précision d'un lot CIQ (en triplicata) à différentes concentrations vis-à-vis d'une gamme de sang total comme expliqué précédemment (Tableau 9). Certaines molécules non reproductibles ou avec des variations supérieures à 40% pour les CIQ sur sang total sont exclues de l'interprétation. L'équivalence est validée pour la plupart des analytes à des concentrations supérieures ou égales à 160 ng/mL.

Concentrations (ng/mL)	Equivalence ST-SE			Equivalence ST-UR			Equivalence ST-ST		
	160	80	10	160	80	10	160	80	10
Nombre molécules retenues	185	167	156	206	187	152	214	204	181
Variation < 15%	49,2 %	20,4 %	14,7 %	16,0 %	20,3 %	15,1 %	53,7 %	66,2 %	46,4 %
Variation entre 15 et 30%	25,9 %	15,6 %	24,4 %	25,2 %	21,4 %	13,8 %	36,0 %	20,1 %	29,3 %
Variation entre 30 et 40%	4,9 %	13,2 %	4,5 %	20,9 %	13,4 %	9,9 %	4,2 %	4,9 %	6,1 %
Variation > 40%	20,0 %	50,9 %	56,4 %	37,9 %	44,9 %	61,2 %	6,1 %	8,8 %	18,2 %

Tableau 9 - Résultats de l'équivalence de matrices

La situation est plus délicate à interpréter pour les concentrations inférieures ou égales à 80 ng/mL, pour lesquelles la précision est plus aléatoire, certaines familles comme les cardiotropes, les neuroleptiques ou les stupéfiants sont un peu plus concernées que les autres. Cependant l'interprétation semi-quantitative est globalement moins impactée à ces niveaux de concentration, de plus les résultats pour la matrice urinaire sont renseignés à titre informatifs (résultat rendu de manière qualitative pour les urines). En conclusion, les matrices peuvent être considérées comme équivalentes en pratique, cependant le sérum ne doit être utilisé que par dérogation au sang total qui reste une référence.

3. Phase post-analytique

Cette phase concerne le rendu de résultat, l'objectif est d'indiquer pour chaque molécule son absence ou sa présence. Comme il s'agit d'une méthode semi-quantitative, il est nécessaire de définir si la molécule est dans une zone infra-thérapeutique, thérapeutique, supra-thérapeutique ou toxique, en se référant à la bibliographie pour avoir une notion de la marge thérapeutique de chaque molécule (37) si elle est documentée.

Une nouvelle méthode de retraitement logiciel a été mise en place prenant en compte les changements et évolutions de la méthode. Un nouveau classement des molécules a également été mis en place, le simple ordre alphabétique initialement utilisé n'étant pas le plus adapté. Les métabolites ont été placés juste après leurs molécules mères afin d'avoir une interprétation plus rapide : par exemple le midazolam et l'alpha-hydroxy midazolam ont été placés à la suite, ce qui n'était pas le cas dans l'ancienne méthode de retraitement. Des familles ont été créées pour faciliter la lecture : le classement par stupéfiants, cardiotropes, neuroleptiques, etc. conduit à un retraitement plus ciblé en fonction des renseignements donnés par le prescripteur.

Cependant, ce classement peut être discuté, étant donné que certains analytes pourraient être classés dans plusieurs catégories : par exemple certains antalgiques pourraient être mis avec les stupéfiants.

IV. Conclusion et perspective d'avenir

Pour conclure, le screening toxicologique est une méthode d'analyse avec un potentiel inégalé dans la recherche étiologique d'une intoxication connue ou inconnue à un ou plusieurs toxiques. Cette force de rechercher des centaines de molécules, en moins de 8 minutes par échantillon, a pour contrepartie sa difficulté à être accrédité dans le système qualité actuel.

Ce travail est un exemple d'évolution, puis de validation de méthode d'un screening toxicologique suivant les recommandations de la SFTA et la SFBC.

Malgré la rigidité induite par l'accréditation selon la norme 15189, cette méthode analytique devra évoluer en fonction de retraits ou mises sur le marché de nouveaux médicaments, en fonction de la nécessité de détecter certains toxiques particuliers, mais aussi avec les améliorations technologiques.

Une première évolution prévue est de se procurer les substances de références des nouvelles molécules incluses afin de les intégrer dans la gamme pour en obtenir une évaluation semi-quantitative

Une seconde évolution à envisager serait une maintenance poussée plus régulière du système analytique afin de garantir une certaine stabilité de sensibilité des résultats dans le temps. Ce facteur dépend du contrat de maintenance négocié entre le fournisseur et l'hôpital, ainsi une modification de la fréquence des maintenances n'est pas attendue dans l'immédiat.

Un autre axe d'évolution, à plus longue échéance, concernerait plus spécifiquement la chromatographie. Avec l'avènement de la chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC), l'utilisation de colonnes plus courtes remplies de particules plus fines (de 2 μ m au lieu de 3-5 μ m pour l'HPLC), à des pressions de l'ordre de 550 à 1000 bars au lieu de 170-400

bars, permettrait soit d'augmenter le nombre de molécules détectables dans le même temps de séparation grâce à une meilleure résolution, soit de diminuer le temps d'analyse de la méthode actuelle.

L'évolution du détecteur est également une piste à envisager. En effet, la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse haute résolution a montré un réel apport dans le domaine de la toxicologie (40,41). Contrairement à l'appareil actuel ayant une résolution en masse unitaire, la haute résolution permet d'obtenir une masse moléculaire très précise avec une résolution de 2-5 ppm, soit une marge d'erreur inférieure à 0,0002 m/z , au point de pouvoir différencier des molécules et métabolites de masse moléculaire très proche.

Il existe de nombreux intérêts à ces évolutions : tout d'abord, la possibilité d'analyser une bien plus grande quantité de molécules en même temps. De plus, cela permettrait un screening non ciblé : un enregistrement et un retraitement global permettrait une recherche exhaustive de molécules ou stupéfiants (42) et un retraitement des données *a posteriori* serait possible si la recherche de nouvelles substances s'avérait nécessaire sur une ancienne analyse.

Un autre élément à considérer serait l'amélioration de l'automatisation de l'analyse depuis la préparation d'échantillon jusqu'au résultat, à la manière d'un automate d'immunochimie. Cela permettrait d'uniformiser le temps et le passage des échantillons dans le système, et pourrait offrir une perspective d'analyse 24H/24H afin de répondre au mieux au caractère urgent de la demande, améliorant de manière intrinsèque, la prise en charge du patient (43).

Enfin, il est prévu d'étendre la méthode analytique développée au cours de ce travail pour la recherche des nouveaux produits de synthèses (NPS), de par l'évolution des usages et consommations, qui pose un défi analytique et réglementaire du même ordre que celui rencontré par les laboratoires antidopage.

V. Annexes

Annexe 1 - Solutions mères pour dopants

Molécule	Concentration	Solvant	Stabilité des solutions stocks en mois
Dopant stupéfiants			
Amphétamine	1 mg/ml	MeOH	24
MBDB	1 mg/ml	MeOH	24
MDA	1 mg/ml	MeOH	18
MDEA	1 mg/ml	MeOH	34
MDMA	1 mg/ml	MeOH	24
Méphédronne	1 mg/ml	MeOH	24
Métamphétamine	1 mg/ml	MeOH	18
Buprénorphine	100 µg/ml	MeOH	22
Buprénorphine-Glucuronide	100 µg/ml	MeOH	23
Norbuprénorphine	100 µg/ml	MeOH	16
Norbuprénorphine-Glucuronide	100 µg/ml	MeOH	24
Kétamine	1 mg/ml	MeOH	27
LSD	1 mg/ml	ACN	11
Methoxetamine	1 mg/ml	MeOH	6
Norkétamine	1 mg/ml	MeOH	44
Benzoylécgonine	1 mg/ml	MeOH	18
Cocaéthylène	1 mg/ml	ACN	27
Cocaïne	1 mg/ml	ACN	24
EDDP	1 mg/ml	MeOH	22
Méthadone	1 mg/ml	MeOH	29
6MAM	1 mg/ml	MeOH	18
Codéine	1 mg/ml	MeOH	25
Dextrometorphane	1 mg/ml	MeOH	19
Dihydrocodéine	1 mg/ml	MeOH	33
Ethylmorphine	1 mg/ml	MeOH	63
Fentanyl	1 mg/ml	MeOH	22
Sufentanil	1 mg/ml	MeOH	18
Morphine	1 mg/ml	MeOH	18
Norfentanyl	1 mg/ml	MeOH	41
Oxycodone	1 mg/ml	MeOH	7
Pholcodine	1 mg/ml	MeOH	22
Rémifentanyl	100 µg/ml	MeOH	18
Tramadol	1 mg/ml	MeOH	28
Dopant THC			
THC	1 mg/ml	MeOH	23

THC-COOH	100µg/ml	MeOH	21
THC-OH	1 mg/ml	MeOH	23
THC-COOH-glu	100µg/ml	MeOH	29
Dopant Antidépresseurs			
Amitriptyline	1mg/ml	MeOH	22
Citalopram	100µg/ml	MeOH	11
Clomipramine	1mg/ml	MeOH	18
Desméthyl-clomipramine	1mg/ml	MeOH	15
Dosulepine = dothiepin	1mg/ml	MeOH	6
Doxepine	1mg/ml	MeOH	29
Duloxetine	1mg/ml	MeOH	18
Fluoxetine	1mg/ml	MeOH	10
Fluvoxamine	1mg/ml	MeOH	11
Imipramine	1mg/ml	MeOH	23
Maprotiline	1mg/ml	MeOH	22
Miansérine	1mg/ml	MeOH	18
Milnacipran	1mg/ml	H2O	35
Mirtazapine	1mg/ml	MeOH	22
Norfluoxétine	1mg/ml	MeOH	32
Nortriptyline	1mg/ml	MeOH	24
Norsertaline	100µg/ml	MeOH	7
Paroxétine	1mg/ml	MeOH	11
Sertraline	1mg/ml	MeOH	32
Trimipramine	1mg/ml	MeOH	21
Venlafaxine	1mg/ml	MeOH	7
Dopant cardiotropes			
Acébutolol	1 mg/ml	MeOH	8
Aténolol	1 mg/ml	MeOH	6
Amlodipine (1mg/ml	MeOH	12
Bisoprolol	1 mg/ml	MeOH	17
Flecainide	1mg/ml	MeOH	14
Labetalol (Poudre)	1 mg/ml	MeOH	12
Métoprolol	1 mg/ml	MeOH	17
Nadolol	1 mg/ml	MeOH	17
Nebivolol (Poudre)	1 mg/ml	MeOH	11
Oxprenolol (Poudre)	1 mg/ml	H2O	17
Phenylephrine (synephrine) (Poudre)	1 mg/ml	MeOH	12
Pindolol	1 mg/ml	MeOH	17
Propafenone (Poudre)	1 mg/ml	MeOH	12
Propranolol	1 mg/ml	MeOH	28
Sotalol (Poudre)	1 mg/ml	H2O	12

Vérapamil	1mg/ml	MeOH	18
Dopant neuroleptiques			
Alimémazine = Trimeprazine	1 mg/ml	MeOH	25
Amisulpride	1 mg/ml	MeOH	10
Aripiprazole	1 mg/ml	ACN	6
Chlorpromazine	1 mg/ml	MeOH	28
Clozapine	1 mg/ml	MeOH	6
Cyamémazine (Poudre LGC)	1 mg/ml	MeOH	12
N-Desmethylozapine	1 mg/ml	MeOH	10
Dimenhydrinate (Poudre)	1 mg/ml	MeOH	12
Doxylamine	1 mg/ml	MeOH	20
Droperidol	1 mg/ml	DMSO	34
Flupentixol (Poudre LGC)	1 mg/ml	MeOH	12
Halopéridol	1 mg/ml	MeOH	24
Hydroxyzine	1 mg/ml	MeOH	21
Levomépromazine	1 mg/ml	MeOH	24
Loxapine (Poudre Sigma)	1 mg/ml	MeOH	12
Olanzapine	1 mg/ml	MeOH	24
Prométhazine	1 mg/ml	DMSO	11
Rispéridone	1 mg/ml	MeOH	25
Dopant antidépresseurs			
Amitriptyline	1mg/ml	MeOH	22
Citalopram	100µg/ml	MeOH	11
Clomipramine	1mg/ml	MeOH	18
Desméthyl-clomipramine	1mg/ml	MeOH	15
Dosulepine = dothiepin	1mg/ml	MeOH	6
Doxepine	1mg/ml	MeOH	29
Duloxetine	1mg/ml	MeOH	18
Fluoxetine	1mg/ml	MeOH	10
Fluvoxamine	1mg/ml	MeOH	11
Imipramine	1mg/ml	MeOH	23
Maprotiline	1mg/ml	MeOH	22
Miansérine	1mg/ml	MeOH	18
Milnacipran	1mg/ml	MeOH	35
Mirtazapine	1mg/ml	MeOH	22
Norfluoxétine	1mg/ml	MeOH	32
Nortriptyline	1mg/ml	MeOH	24
Norsertaline	100µg/ml	MeOH	7
Paroxétine	1mg/ml	MeOH	11
Sertraline	1mg/ml	MeOH	32
Trimipramine	1mg/ml	MeOH	21

Venlafaxine	1mg/ml	MeOH	7
O-Desméthyl Venlafaxine	100 µg/ml	MeOH	7
Dopant mixte 1			
Acétazolamide	1 mg/ml	MeOH	15
Carvédilol (Poudre)	1 mg/ml	ACN	14
Cetirizine	1 mg/ml	H2O	23
Colchicine (Poudre)	1 mg/ml	H2O	7
Diphenhydramine	1 mg/ml	MeOH	18
Gabapentine	1 mg/ml	MeOH	24
Gliclazides (Poudre)	1 mg/ml	MeOH	12
Hydroxychloroquine (Poudre)	1 mg/ml	H2O	12
Indapamide	1mg/ml	MeOH	31
Lamotrigine	1 mg/ml	MeOH	19
Lévétiracétam	1 mg/ml	MeOH	15
Méprobamate	1 mg/ml	MeOH	16
Quinine	1 mg/ml	EtOH	8
Ropivacaine (Poudre)	1 mg/ml	ACN	14
Scopolamine (Poudre)	1 mg/ml	MeOH	12
Trihexyphenidyle	1 mg/ml	MeOH	15
Warfarine	1 mg/ml	MeOH	6
Dopant mixte 2			
Amiloride	1 mg/ml	MeOH	35
Amoxapine	1 mg/ml	MeOH	12
Bumétanide	1 mg/ml	ACN	17
Buspirone	1 mg/ml	MeOH	35
Chloroquine	1 mg/ml	MeOH	6
Clonidine	1 mg/ml	MeOH	31
Clopidamide (Poudre)	1 mg/ml	MeOH	12
Diltiazem	1 mg/ml	ACN	20
Disopyramide	1 mg/ml	MeOH	6
Felodipine (Poudre)	1 mg/ml	MeOH	35
Fluphenazine	1 mg/ml	MeOH	6
Glimépiride (Poudre)	1 mg/ml	DMSO	12
Glipizide (Poudre)	1 mg/ml	DMSO	12
Moclobemide	1 mg/ml	MeOH	31
Nicardipine (Poudre)	1 mg/ml	MeOH	12
Nifédipine (Poudre)	1 mg/ml	MeOH	12
Oxcarbazépine	1 mg/ml	ACN	35
Propofol	1 mg/ml	MeOH	6
Quétiapine	1 mg/ml	MeOH	16
Quinidine (Poudre)	1 mg/ml	MeOH	12

Répaglinide (Poudre)	1 mg/ml	ACN	17
Rifampicine (Poudre)	1 mg/ml*	MeOH	< 6
Triamterene (Poudre)	1 mg/ml	MeOH	12
O-Desmethyltramadol*	1mg/mL	MeOH	< 6
O-Desmethylvenlafaxine	1mg/mL	MeOH	7
Thiopental (Poudre)	1mg/mL	MeOH	5
Dopant mixte 3			
Amiodarone	1mg/mL	MeOH	18
Atropine	1mg/mL	ACN	33
Benzthiazide (Poudre)	1mg/mL	MeOH	12
Caféine	1mg/mL	MeOH	7
Carbamazépine	1mg/mL	MeOH	37
Dexaméthasone	1mg/mL	MeOH	9
Furosémide	1mg/mL	MeOH	< 6
Glibenclamide (poudre)	1mg/mL	MeOH	12
Lévamisole	1mg/mL	MeOH	10
Noscapine	1mg/mL	MeOH	18
Paracétamol	1mg/mL	MeOH	< 6
Pseudoéphédrine	1mg/mL	MeOH	6
Papavérine	1mg/mL	MeOH	12
Phénytoïne	1mg/mL	MeOH	16
Phénobarbital	1mg/mL	MeOH	12
Tianeptine (Poudre)	1mg/mL	MeOH	12
Dopant benzodiazépines			
7-amino-clonazéпам	100 µg/ml	ACN	20
Alpha-hydroxymidazolam	100 µg/ml	MeOH	24
Alprazolam	1 mg/ml	MeOH	24
Bromazéпам	1 mg/ml	MeOH	< 6
Chlordiazépomide	1 mg/ml	MeOH	19
Clobazam	1 mg/ml	MeOH	17
Clonazéпам	1 mg/ml	MeOH	24
Diazéпам	1 mg/ml	MeOH	27
Estazolam	1 mg/ml	MeOH	21
Flunitrazéпам	1 mg/ml	MeOH	20
Loprazolam	1 mg/ml	MeOH	42
Lorazéпам	1 mg/ml	ACN	23
Lormétazéпам	1 mg/ml	MeOH	24
Midazolam	1 mg/ml	MeOH	16
Nitrazéпам	1 mg/ml	ACN	29
Nordiazéпам	1 mg/ml	MeOH	22
Oxazéпам	1 mg/ml	MeOH	22

Prazépam	1 mg/ml	MeOH	33
Témazépam	1 mg/ml	MeOH	33
Tétrazépam	1 mg/ml	ACN	19
Triazolam	1 mg/ml	MeOH	21
Zolpidem	1 mg/ml	MeOH	24
Zopiclone	1 mg/ml	ACN	16

Annexe 2 - Liste des transitions en mode positif AVANT révision de la méthode

Analyte	Q1	Q3	TR (min)	DP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (eV)
Diazepam-D5	290	153,9	5,2	10	40	35	15
6MAM	328,2	165,2	2,3	10	100	50	15
7-Aminoclonazepam	286,2	121	3,2	10	60	35	15
7-Aminoflunitrazepam	284,2	135	3,7	10	40	35	15
Acébutolol	337,2	116,1	3,3	10	60	20	15
Acéprometazine	327,2	240,1	0	10	60	35	15
Acétazolamide	223,2	180,9	0	10	60	20	15
Aciclovir	226	152	1,8	10	60	20	15
Alimémazine	299,1	100	4,5	10	40	20	15
Alphahydroxymidazolam	342	202,9	4,3	10	60	35	15
Alprazolam	309	281	4,9	10	100	35	15
Amiloride	230,1	171,1	2	10	60	20	15
Amiodarone	646	100	5,6	10	60	50	15
Amisulpride	370,1	242,1	2,8	10	40	35	15
Amitriptyline	278,4	233,1	4,5	10	60	20	15
Amlodipine	409,1	238	4,6	10	40	20	15
Amoxapine	314,1	193,1	4,4	10	60	50	15
Amoxicilline	366	349	1	10	60	20	15
Amphétamine	136,1	91,2	2,2	10	40	20	15
Aripiprazole	448,3	285,2	4,6	10	60	35	15
Aténolol	267,2	145	1,8	10	40	35	15
Atropine	290,2	124	2,7	10	60	20	15
Baclofène	214,1	115	2,5	10	60	20	15
Benzoylcegonine	290,3	168	3,3	10	40	35	15
Bisoprolol	326,2	116,2	3,9	10	60	20	15
Bromazépam	316	182	4,5	10	60	50	15
Bumétanide	365,1	240,2	5	10	60	20	15
Buprénorphine	468,4	396,3	4,2	10	140	50	15

Buprénorphine-Glu	644,4	468,3	3,7	10	140	50	15
Buspirone	386,3	122,1	3,9	10	60	35	15
Caféine	195,1	138,1	3,1	10	60	20	15
Carbamazépine	237,1	194,2	4,6	10	60	20	15
Carbamazépine-10-11-époxyde	253,1	180,2	0	10	60	20	15
Carbutamide	272,1	92,1	4	10	60	20	15
Carvédilol	407,2	224,1	4,4	10	40	20	15
Céfépime	480,9	395,9	1,8	10	60	20	15
Céfotaxime	455,8	395,9	3,4	10	60	20	15
Céfoxitine	449,8	388,8	3,9	10	60	20	15
Ceftazidime	547,1	467,9	1	10	60	20	15
Ceftriaxone	554,8	395,8	1	10	60	20	15
Cetirizine	389,3	201	4,8	10	40	35	15
Chlordiazépoxyde	300,2	227	4,1	10	60	35	15
Chloroquine	320,2	247,1	2,1	10	60	35	15
Chlorpromazine	319,1	214,1	4,8	10	60	50	15
Cibenzoline	263,1	115,1	0	10	60	20	15
Ciprofloxacine	332,1	288	3	10	60	20	15
Citalopram	325,2	109	4,1	10	60	35	15
Clarithromycine	748,5	158,1	0	10	60	20	15
Clobazam	301,2	259	4,9	10	60	35	15
Clomipramine	315,2	86,1	4,8	10	60	20	15
Clonazépan	315,9	269,9	4,7	10	60	35	15
Clonidine	230	213,1	2,2	10	40	35	15
Cloпамide	346,1	250,1	3,9	10	60	35	15
Clopidogrel	322,1	155,1	0	10	60	20	15
Cloxacilline	435,9	177,9	5	10	60	20	15
Clozapine	327,1	270,1	3,9	10	40	35	15
Cocaéthylène	318,1	196,5	3,7	10	60	35	15
Cocaïne	304,1	181,9	3,4	10	40	35	15
Codéine	300	127,2	2	10	60	50	15
Colchicine	400,1	358,1	4,4	10	100	35	15
Cyamémazine	324	100,1	4,4	10	40	35	15
Daptomycine	810,8	159	5,1	10	60	20	15
Desipramine	267,4	71,8	4,5	10	40	20	15
Desmethylclozapine	313,2	191,9	3,8	10	60	50	15
Dexaméthasone	393,2	355,2	4,9	10	60	20	15
Dextrometorphane	272,2	171,2	0	10	60	20	15
Diazépan	285,3	153,9	5,2	10	40	35	15

Diclofénac	296	214,1	0	10	60	20	15
Dihydrocodéïne	302,1	199	2	10	60	50	15
Diltiazem	415,2	177,9	4,4	10	60	35	15
Diphenhydramine	256,2	167,1	4,1	10	40	20	15
Disopyramide	340,2	239,2	3,6	10	60	20	15
Dosulepine	296,1	218,1	4,3	10	40	35	15
Doxepine	280,2	107	4,1	10	60	35	15
Doxylamine	271,2	167,2	2,6	10	40	50	15
Droperidol	380	194	3,8	10	111	20	15
Duloxetine	298,2	154	4,5	10	40	20	15
Ecgoninmethylester	200,2	182,1	1,6	10	60	20	15
EDDP	278,4	234,1	4,2	10	40	35	15
Ertapenem	475,9	432	1	10	60	20	15
Estazolam	295,1	205,2	4,8	10	60	50	15
Ethacrynic acid	302,8	179,1	5	10	40	50	15
Ethylmorphine	314,2	127,8	2,6	10	60	50	15
Felodipine	384,1	338	5,6	10	60	20	15
Fentanyl	337,3	188	4,1	10	40	35	15
Flecainide	415,2	398,1	4,1	10	60	35	15
Fluconazole	307	238,2	3,6	10	60	20	15
Flunitrazépam	314,2	268	4,8	10	60	35	15
Fluoxetine	310	148	4,5	10	51	20	15
Flupentixol	435,2	305	0	10	60	20	15
Fluphenazine	438,2	171,2	5	10	60	35	15
Fluvoxamine	319,3	258,1	4,5	10	40	20	15
Gabapentine	172,1	137,1	1	10	60	20	15
Ganciclovir	256,1	151,9	1,7	10	60	50	15
Glibenclamide	494,2	169,1	5,5	10	60	20	15
Gliclazide	324,2	126,9	5	10	60	20	15
Glimépiride	491,3	352,1	5,5	10	60	20	15
Glipizide	446,3	321	4,9	10	60	20	15
Griséofulvine	353,1	165,1	5	10	60	35	15
Halopéridol	376,1	165,1	4,3	10	100	35	15
Héroïne	370,1	268,1	3,3	10	100	35	15
Hydromorphone	286,2	184,9	1,8	10	60	20	15
Hydroxychloroquine	336,2	179,2	1,85	10	60	50	15
Hydroxyitraconazole	721,2	408,2	5,7	10	140	50	15
Hydroxyzine	375,2	201,1	4,6	10	60	35	15
Imipenème	299,9	141,9	1	10	60	20	15

Imipramine	281,2	86,1	4,4	10	40	20	15
Indapamide	366,1	132,1	4,3	10	40	20	15
Itraconazole	705,2	392,4	6	10	60	50	15
Kétamine	238,1	125	3,1	10	40	35	15
Labetolol	329,2	311,1	3,8	10	40	20	15
Lamotrigine	256	211,1	3,2	10	40	35	15
Lercanidipine	612	280,3	5,1	10	60	35	15
Lévamisole	205	178	2,1	10	60	35	15
Lévétiracétam	171,1	126,1	2,3	10	40	20	15
Lévofloxacine	362	318,1	2,9	10	60	20	15
Lévomepromazine	329,1	100,2	4,6	10	60	35	15
Lidocaïne	235,1	86,1	2,6	10	40	35	15
Lopéramide	477,4	266,2	4,7	10	60	35	15
Loprazolam	465	408	4,1	10	141	35	15
Lorazépam	321	275	4,8	10	60	35	15
Lormétazépam	335,1	288,9	5	10	60	35	15
Loxapine	328	271	4,4	10	60	35	15
LSD	324,1	281	3,7	10	60	20	15
Maprotiline	278,2	250,2	4,5	10	60	35	15
MBDB	208,1	177	3	10	40	20	15
MDA	180,1	163,1	2,3	10	60	20	15
MDEA	208,2	163,1	2,7	10	60	20	15
MDMA	194,2	163	2,4	10	40	20	15
Méphédronne	178,2	145	2,7	10	40	35	15
Méprobamate	219,1	158,1	3,9	10	40	20	15
Meropenem	384	141	2,1	10	60	20	15
Méthamphétamine	150,1	91,2	2,3	10	40	35	15
Metformine	130,2	71,1	1,7	10	60	20	15
Méthadone	310,1	265,1	4,5	10	51	20	15
Methoxetamine	248	120,9	3,2	10	76	35	15
Metopimazine	446,2	140,9	0	10	60	20	15
Metopimazine acide	447,2	142	0	10	60	20	15
Métoprolol	268,3	115,9	3,3	10	60	20	15
Miansérine	265,3	208,1	4,1	10	60	35	15
Midazolam	326	291,2	4,1	10	40	35	15
Milnacipran	247,2	100	3,8	10	40	20	15
Mirtazapine	266,2	195,2	3,3	10	40	35	15
Moclobemide	269,1	182,1	2,7	10	40	35	15
Morphine	286	152	1,7	10	100	90	15

Morphine-3&6-bêta-glu	462	285,9	1,5	10	40	50	15
Nadolol	310,2	254,2	2,7	10	60	20	15
N-Desmethyltramadol	250,2	44	3,4	10	60	50	15
Nebivolol	406,2	150,9	4,6	10	100	35	15
Néfopam	254,1	181	3,7	10	30	20	15
Nicardipine	480,3	314,9	4,4	10	60	35	15
Nifédipine	347,1	254,2	4,9	10	40	20	15
Nitrazépam	282,3	236,2	4,6	10	60	35	15
Norbuprénorphine	414,3	101	3,9	10	140	50	15
Norbuprénorphine-Glu	590,4	414,3	3,2	10	140	50	15
Norclomipramine	301,1	72,1	4,8	10	60	20	15
Norcodeine	286,2	164,9	2	10	100	50	15
Nordiazépam	271	139,8	5	10	60	35	15
Norfentanyl	233,2	83,9	3,1	10	60	20	15
Norfluoxétine	296	134	4,6	10	20	20	15
Norkétamine	224,1	207	3	10	40	20	15
Norpropoxyphene	326,2	252,3	0	10	60	20	15
Norsertraline	292	274,9	4,8	10	20	20	15
Nortriptyline	264,4	233,2	4,6	10	60	20	15
Norvenlafaxine	264,1	246	3,8	10	60	20	15
Noscapine	414,1	220,2	3,7	10	60	35	15
Olanzapine	313,1	256	2	10	60	35	15
Oxazépam	287,1	241,2	4,8	10	60	35	15
Oxcarbazépine	253,1	180,1	4,3	10	60	50	15
Oxprenolol	266,2	225,1	3,7	10	60	20	15
Oxycodone	316,3	298	2,1	10	60	20	15
Papavérine	340,2	202,2	3,7	10	60	35	15
Paracétamol	152	109,9	2,1	10	60	20	15
Paroxétine	330,1	192,1	4,5	10	100	35	15
Penfluridol	524	203,1	0	10	60	50	15
Phénylbutazone	309,2	160,2	5,5	10	60	35	15
Phénytoïne	253,1	182,2	4,5	10	60	35	15
Pholcodine	399,2	113,8	1,6	10	40	35	15
Pimozide	462,1	328,2	0	10	60	50	15
Pindolol	249,1	116	2,4	10	40	20	15
Pipamperone	376,2	165,2	0	10	60	35	15
Piperacilline	517,9	143	4,6	10	60	20	15
Posaconazole	701,3	683,2	5,6	10	100	50	15
Prazépam	325,1	270,9	5,6	10	60	35	15

Procaïne	237,2	120	1,9	10	60	35	15
Prométhazine	285,1	86	4,3	10	40	20	15
Propafenone	342,2	116,1	4,4	10	60	35	15
Propoxyphene	340,1	266,3	0	10	60	20	15
Propranolol	260,2	116,2	3,9	10	40	20	15
Pseudoéphédrine	166,1	148	2	10	60	20	15
Quétiapine	384,2	253,2	4,1	10	60	35	15
Quinidine	325,2	172,1	3,2	10	100	50	15
Quinine	325,2	79,1	3,1	10	100	50	15
Rémifentanyl	377,2	112,7	3,6	10	60	20	15
Répaglinide	453,3	230	5,1	10	60	35	15
Rifampicine	823,5	791,5	5,2	10	60	20	15
Rilmenidine	181,1	95,1	0	10	60	20	15
Rispéridone	411,1	191,1	3,8	10	40	35	15
Ropivacaine	275,1	125,8	3,4	10	40	35	15
Scopolamine	304,2	103,1	2,1	10	40	20	15
Sertraline	306,1	159	4,7	10	40	35	15
Sotalol	273,2	255	1,8	10	40	20	15
Sufentanil	387,2	238,1	4,4	10	40	35	15
Sulpiride	342,2	214,1	0	10	60	50	15
Témazépam	301,2	255,1	5	10	40	35	15
Tetrabenazine	318,3	220,1	0	10	60	20	15
Tétrazépam	289,3	225,1	5,3	10	40	35	15
THC	315,1	193,1	6,1	10	40	35	15
THC-COOH	344,9	299,1	5,8	10	60	35	15
THC-COOH-glu	521	345,1	5,6	10	100	20	15
THC-OH	331,1	193,2	5,7	10	40	35	15
Thebacon	342,1	243,1	0	10	60	35	15
Thébaïne	312	251	0	10	60	50	15
Théophylline	181,1	124	0	10	60	35	15
Tianeptine	437,2	291,9	4,3	10	60	20	15
Tiapride	329,1	256,1	1,9	10	60	35	15
Tramadol	264,1	57,9	3,2	10	40	50	15
Triamterene	254,1	237,2	3	10	40	35	15
Triazolam	343,2	308,1	4,9	10	100	35	15
Trihexyphenidyle	302,1	98	4,5	10	86	35	15
Trimipramine	295,3	100	4,6	10	40	20	15
Tropatepine	334,2	211	4,5	10	60	20	15
Urapidil	388,2	233,1	3,3	10	60	35	15

Venlafaxine	278,2	121,1	3,8	10	40	35	15
Vérapamil	455,2	165	4,4	10	40	35	15
Voriconazole	350	126,9	4,8	10	40	50	15
Warfarine	309,2	162,9	5,2	10	40	20	15
Zolpidem	308,1	235	3,7	10	60	50	15
Zopiclone	389,1	245,1	3,3	10	40	20	15
Zuclopenthixol	401,1	231,1	4,8	10	60	20	15

Annexe 3 - Liste des transitions en mode négatif AVANT révision de la méthode

Analyte	Q1	Q3	TR (min)	EP (V)	DP (V)	CE (eV)	CXP (eV)
Phenobarbital-d5	235,9	193	3,9	-10	-60	-20	-15
Acétazolamide	221	83	0	-10	-60	-35	-15
Acide Acétylsalicylique	179	137,1	0	-10	-60	-20	-15
Acide Salicylique	137,1	93	0	-10	-60	-35	-15
Acide Valproïque	143	143	4,5	-10	-60	-20	-15
Bendroflumethiazide	420	328	4,4	-10	-60	-50	-15
Benzthiazide	430	307,7	4,4	-10	-60	-35	-15
Chloralose	307	161	0	-10	-60	-20	-15
Fluorouracile	129	58,8	0	-10	-60	-50	-15
Flurbiprofène	243	199,2	0	-10	-60	-20	-15
Furosémide	328,9	284,7	4,3	-10	-60	-20	-15
GHB	103	84,9	0	-10	-60	-20	-15
Hydrochlorothiazide	296	269	2,6	-10	-60	-35	-15
Hydroflumethiazide	330,1	160,2	2,3	-10	-60	-50	-15
Ibuprofène	205	161,1	5,6	-10	-30	-10	-10
Phénobarbital	231	187,8	3,9	-10	-60	-20	-15
Thiopental	241	57,9	4,8	-10	-60	-50	-15
Topiramate	338	77,8	4	-10	-150	-42	-12

Annexe 4 - Liste des transitions en mode positif APRES révision de la méthode

Analyte	Q1	Q3	TR (min)	EP (V)	DP (V)	CE (eV)	CXP (eV)
EI - Diazepam-D5	290	153,9	5,2	10	40	35	15
EI – Morphine-D3	288,8	151,8	1,7	10	40	50	10
EI – THC-D3	318,1	196,1	6,1	10	40	35	10
A – Codéine	300	127,2	2,0	10	60	50	10
A - Codéine (Nor-)	286,2	164,9	2,0	10	100	50	10
A - Dihydrocodéine	302,1	199	2,0	10	60	50	10
A - Fentanyl (44)	337,3	188	4,1	10	40	35	10
A - Fentanyl (Nor)	233,2	83,9	3,1	10	60	20	10
A - Hydrocodone (44,45)	300,5	199,1	2,1	10	60	35	15
A - Hydromorphone	286,2	184,9	1,8	10	60	20	10
A - Kétamine	238,1	125	3,1	10	40	35	10
A - Kétamine (Nor-)	224,1	207	3,0	10	40	20	10
A - Lidocaïne (44,46)	235,1	86,1	2,6	10	40	35	10
A - Morphine	286	152	1,7	10	40	50	10
A - Nalbuphine (47)	358,3	340,3	2,8	10	60	35	15
A - Oxycodone	316,3	298	2,1	10	60	20	10
A - Paracétamol (44)	152	109,9	2,1	10	60	20	10
A - Procaïne	237,2	120	1,9	10	60	35	15
A - Rémifentanyl	377,2	112,7	3,6	10	60	20	10
A - Ropivacaine	275,1	125,8	3,4	10	40	35	10
A - Sufentanil	387,2	238,1	4,4	10	40	35	10
A - Tramadol (44,48)	264,1	57,9	3,2	10	40	50	10
A - Tramadol (N-Desméthyl-)	250,2	44,0	3,4	10	60	50	10
B - Alprazolam (44)	309	281	4,9	10	100	35	10
B - Bromazépam	316	182	4,5	10	60	50	10
B - Buspirone (44)	386,3	122,1	3,9	10	60	35	10
B - Chlordiazépoxyde	300,2	227	4,1	10	60	35	15
B - Citalopram (44)	325,2	109	4,1	10	60	35	10
B - Clobazam (44)	301,2	259	4,9	10	60	35	10
B - Clonazépam (44)	315,9	269,9	4,7	10	60	35	10
B - Clonazépam (7-Amino-) (44)	286,2	121	3,2	10	100	50	10
B - Clotiazépam	319,1	291,1	5,3	10	60	35	15
B - Diazépam	285,3	153,9	5,2	10	40	35	10
B - Diazépam (Nor-)	271	139,8	5,0	10	60	35	10
B - Diltiazem (44)	415,2	177,9	4,4	10	60	35	10
B - Estazolam	295,1	205,2	4,8	10	60	50	10
B - Flunitrazépam	314,2	268	4,8	10	60	35	10

B - Flunitrazépam (7-Amino-)	284,2	135	3,7	10	40	35	10
B - Hydroxyzine (44)	375,2	201,1	4,6	10	60	35	10
B - Loprazolam	465	408	4,1	10	60	35	15
B - Lorazépam	321	275	4,8	10	60	35	10
B - Lormétazépam (44)	335,1	288,9	5,0	10	60	35	10
B - Méprobamate	219,1	158,1	3,9	10	40	20	10
B - Midazolam	326	291,2	4,1	10	40	35	10
B - Midazolam (Alpha-hydroxy-)	342	202,9	4,3	10	60	35	10
B - Nitrazépam	282,3	236,2	4,6	10	60	35	10
B - Oxazépam	287,1	241,2	4,8	10	60	35	10
B - Prazépam	325,1	270,9	5,6	10	60	35	10
B - Témazépam (44)	301,2	255,1	5,0	10	40	35	10
B - Tétrazépam	289,3	225,1	5,3	10	40	35	10
B - Triazolam	343,2	308,1	4,9	10	100	35	10
B - Zolpidem (44)	308,1	235	3,7	10	60	50	10
B - Zopiclone(44)	389,1	245,1	3,3	10	40	20	10
C - Acébutolol	337,2	116,1	3,3	10	60	20	10
C - Acétazolamide	223,2	180,9	0,0	10	40	20	10
C - Amiloride (44)	230,1	171,1	2,0	10	60	20	10
C - Amlodipine	409,1	238	4,6	10	60	50	10
C - Aténolol (44)	267,2	145	1,8	10	40	35	10
C - Betaxolol (49)	308	253,9	0	10	60	35	15
C - Bisoprolol (44)	326,2	116,2	3,9	10	60	20	10
C - Bumétanide	365,1	240,2	5,0	10	60	20	10
C - Candésartan (50)	441,2	263,1	1,6	10	60	35	15
C - Carvédilol (44)	407,2	224,1	4,4	10	40	20	10
C - Clonidine (44)	230	213,1	2,2	10	40	35	10
C - Enalapril	377,2	234,2	4,1	10	60	35	15
C - Indapamide	366,1	132,1	4,3	10	60	35	15
C - Irbesartan (51,52)	429,5	207	5,1	10	60	35	15
C - Labetolol (44)	329,2	311,1	3,8	10	40	20	10
C - Lercanidipine	612	280,3	5,1	10	60	35	15
C - Losartan (53)	423,2	207,2	5	10	60	35	15
C - Métoprolol	268,3	115,9	3,3	10	60	20	10
C - Nadolol	310,2	254,2	2,7	10	60	20	10
C - Nebivolol	406,2	150,9	4,6	10	100	35	10
C - Nicardipine	480,3	314,9	4,4	10	60	35	10
C - Nifédipine (44)	347,1	254,2	4,9	10	40	20	10
C - Olmésartan (54)	447,1	206,9	4,2	10	60	35	15

C - Oxprenolol	266,2	225,1	3,7	10	60	20	10
C - Périndopril (55)	369,2	172,2	4,3	10	60	35	15
C - Pindolol	249,1	116	2,4	10	40	20	10
C - Propranolol	260,2	116,2	3,9	10	40	20	10
C - Ramipril (55)	417,5	234,2	4,6	10	60	35	15
C - Rilmenidine	181,1	95,1	2,7	10	60	20	10
C - Spironolactone (Canrénone) (56)	341	107,1	5,3	10	60	35	15
C - Sotalol (44)	273,2	255	1,8	10	40	20	10
C - Triamterene	254,1	237,2	3,0	10	40	35	10
C - Vérapamil	455,2	165	4,4	10	40	35	10
C - Valsartan	436,3	291,2	5,3	10	60	35	15
C - Urapidil	388,2	233,1	3,1	10	60	35	10
D - Amoxapine	314,1	193,1	4,4	10	60	50	10
D - Buprénorphine (44)	468,4	396,3	4,2	10	140	50	10
D - Buprénorphine-Glu	644,4	468,3	3,7	10	140	50	10
D - Buprénorphine (Nor-)	414,3	101	3,9	10	140	50	10
D - Buprénorphine (Nor-glu-)	590,4	414,3	3,2	10	140	50	10
D - Clomipramine (44)	315,2	86,1	4,8	10	60	20	10
D - Clomipramine (Nor-)	301,1	72,1	4,8	10	60	20	10
D - Desipramine	267,4	71,8	4,5	10	40	20	10
D - Dosulepine	296,1	218,1	4,3	10	40	35	10
D - Doxepine	280,2	107	4,1	10	60	35	10
D - Duloxetine	298,2	154	4,5	10	40	50	10
D - Fluoxetine (44)	310	148	4,5	10	51	20	10
D - Fluoxetine (Nor-)	296	134	4,6	10	20	20	10
D - Fluvoxamine (44)	319,3	258,1	4,5	10	40	20	10
D - Imipramine	281,2	86,1	4,4	10	40	20	10
D - Maprotiline (44)	278,2	250,2	4,5	10	60	35	10
D - Miansérine (44)	265,3	208,1	4,1	10	60	35	10
D - Milnacipran	247,2	100	3,8	10	40	20	10
D - Mirtazapine (44)	266,2	195,2	3,3	10	40	35	10
D - Moclobemide (44)	269,1	182,1	2,7	10	40	35	10
D - Paroxétine	330,1	192,1	4,5	10	100	35	10
D - Sertraline	306,1	159	4,7	10	40	35	10
D - Sertraline (Nor-)	292	274,9	4,8	10	20	20	10
D - Tianeptine	437,2	291,9	4,3	10	60	20	10
D - Trimipramine	295,3	100	4,6	10	40	20	10
D - Venlafaxine	278,2	121,1	3,8	10	40	35	10
D - Venlafaxine (Nor-)	264,1	246	3,8	10	60	20	10

D - Vortioxétine (57)	299,2	204,1	4,3	10	60	35	15
E - Brivaracétam (58)	213,1	168,1	4,3	10	60	35	15
E - Carbamazépine (44)	237,1	194,2	4,6	10	60	20	10
E - Carbamazépine-10-11-époxyde	253,1	180,2	4,0	10	60	20	10
E - Gabapentine	172,1	137,1	1,0	10	60	20	10
E - Lacosamide (59)	251,2	108,1	3,6	10	60	35	15
E - Lamotrigine (44)	256	211,1	3,2	10	40	35	10
E - Lévétiracétam	171,1	126,1	2,3	10	40	20	10
E - Oxcarbazépine	253,1	180,1	4,3	10	60	50	10
E - Phénytoïne	253,1	182,2	4,5	10	60	35	10
E - Prégabaline (48)	160,2	97,1	2,2	10	60	35	15
E - Zonisamide (60)	213	132	3,3	10	60	35	15
G - Glibenclamide (61)	494,2	169,1	5,5	10	60	20	10
G - Gliclazide (61)	324,2	126,9	5,0	10	60	20	10
G - Glimépiride (61)	491,3	352,1	5,5	10	60	20	10
G - Glipizide (61)	446,3	321	4,9	10	60	20	10
G - Metformine	130,2	71,1	1,7	10	60	20	10
G - Répaglinide (61,62)	453,3	230	5,1	10	60	35	10
G - Saxagliptine (61)	316,22	180	2,9	10	60	35	15
G - Sitagliptine (61)	408,22	174,6	3,4	10	60	35	15
G - Vildagliptine (61)	304,19	153,9	1,9	10	60	35	15
H - Acénocoumarol (63)	354,1	163,1	5,2	10	60	35	15
H - Apixaban (64)	460,1	199,1	4,7	10	60	35	15
H - Clopidogrel (65,66)	322,1	155,1	5,5	10	60	20	10
H - Clopidogrel (MP-H3) (67)	504,2	155	0,0	10	60	20	10
H - Dabigatran (68)	472,1	289	0,0	10	60	35	15
H - Fluindione (69)	239	211	5,1	10	60	35	15
H - Rivaroxaban (64)	436,1	144,9	4,6	10	60	35	15
H - Warfarine	309,2	162,9	5,2	10	40	20	10
M - 6MAM	328,2	165,2	2,3	10	100	50	10
M - Amphétamine	136,1	91,2	2,2	10	40	20	10
M - Benzoylécgonine (44)	290,3	168	3,3	10	40	35	10
M - Cannabidiol	315	193,1	6,0	10	60	35	15
M - Cocaéthylène	318,1	196,5	3,7	10	60	35	10
M - Cocaïne (44)	304,1	181,9	3,4	10	40	35	10
M - Héroïne	370,1	268,1	3,3	10	100	35	10
M - Lévamisol	205	178	2,1	10	60	35	10
M - LSD	324,1	281	3,7	10	60	20	10
M - MBDB	208,1	177	3,0	10	40	20	10

M - MDA	180,1	163,1	2,3	10	60	20	10
M - MDEA	208,2	163,1	2,7	10	60	20	10
M - MDMA (44)	194,2	163	2,4	10	40	20	10
M - Méphédron	178,2	145	2,7	10	40	35	10
M - Méthamphétamine	150,1	91,2	2,3	10	40	35	10
M - Méthadone (44)	310,1	265,1	4,5	10	51	20	10
M - Méthadone (EDDP)	278,4	234,1	4,2	10	40	35	10
M - Methoxetamine	248	120,9	3,2	10	60	35	15
M - Noscapine (44)	414,1	220,2	3,7	10	60	35	10
M - Papavérine(44)	340,2	202,2	3,7	10	60	20	10
M - Phénacétine	180,1	110,1	0,0	10	60	35	15
M - THC	315,1	193,1	6,1	10	40	35	10
M - THC-COOH	344,9	299,1	5,8	10	60	35	10
M - THC-COOH-glu	521	345,1	5,6	10	100	20	10
M - THC-OH	331,1	193,2	5,7	10	40	35	10
N - Amantadine (70)	152,2	135,3	0,0	10	60	35	15
N - Amisulpride	370,1	242,1	2,8	10	40	35	10
N - Amitriptyline (44)	278,4	233,1	4,5	10	60	20	10
N - Amitriptyline (Nortriptyline) (44)	264,4	233,2	4,6	10	60	20	10
N - Apomorphine (71)	268	237	2,9	10	60	35	15
N - Aripiprazole	448,3	285,2	4,6	10	60	35	10
N - Bromocriptine (72,73)	656,7	348,2	4,7	10	60	35	15
N - Chlorpromazine (44)	319,1	214,1	4,8	10	60	50	10
N - Clozapine (44)	327,1	270,1	3,9	10	40	35	10
N - Clozapine (Desméthyl-)	313,2	191,9	3,8	10	60	50	10
N - Cyamémazine	324	100,1	4,4	10	40	35	10
N - Droperidol (46)	380	194	3,8	10	60	35	15
N - Entacapone	306,1	233,1	4,6	10	60	35	15
N - Flupentixol	435,2	305	5,0	10	60	20	10
N - Halopéridol (44)	376,1	165,1	4,3	10	100	35	10
N - Levomépromazine	329,1	100,2	4,6	10	60	35	10
N - Loxapine	328	271	4,3	10	60	35	10
N - Méthylphénidate (44,74)	234	84	3,4	10	60	35	15
N - Olanzapine (44)	313,1	256	2,0	10	60	35	10
N - Penfluridol	524	203,1	5,1	10	60	50	10
N - Pimozide	462,1	328,2	4,9	10	60	50	10
N - Pipamperone	376,2	165,2	4,2	10	60	35	10
N - Pramipexole (75)	212	153	1,8	10	60	35	15
N - Prométhazine	285,1	86	4,3	10	40	20	10

N - Quétiapine	384,2	253,2	4,1	10	60	35	10
N - Rispéridone (44)	411,1	191,1	3,8	10	40	35	10
N - Rispéridone 9-OH (=Palipéridone) (76,77)	427,2	207	3,6	10	60	35	15
N - Ropinirole (55)	261,1	114,1	2,7	10	60	35	15
N - Rotigotine (78)	316,2	147,2	3,7	10	60	35	15
N - Rivastigmine (79)	251	206	3,2	10	60	35	15
N - Sulpride (44)	342,2	214,1	1,8	10	60	50	10
N - Tetrabenzazine	318,3	220,1	4,5	10	60	20	10
N - Tiapride	329,1	256,1	4,5	10	60	35	10
N - Trihexyphenidyle	302,1	98,0	4,5	10	60	35	15
N - Tropatepine	334,2	211	4,5	10	60	20	10
N - Zuclopenthixol	401,1	231,1	4,8	10	60	20	10
R - Amiodarone (44)	646	100	5,6	10	60	50	10
R - Cibenzoline	263,1	115,1	4	10	60	20	10
R - Disopyramide	340,2	239,2	3,6	10	60	20	10
R - Felodipine	384,1	338	5,6	10	60	20	10
R - Flecainide (44)	415,2	398,1	4,1	10	60	35	10
R - Propafenone	342,2	116,1	4,4	10	60	35	15
R - Quinidine / Quinine	325,2	172,1	3,2	10	100	50	10
Z - Alimémazine	299,1	100	4,5	10	40	20	10
Z - Amoxicilline	366	349	1,0	10	60	35	15
Z - Atropine	290,2	124	2,7	10	60	20	10
Z - Cetirizine (44)	389,3	201	4,8	10	60	35	10
Z - Chloroquine (44)	320,2	247,1	2,1	10	60	35	10
Z - Colchicine	400,1	358,1	4,4	10	100	35	10
Z - Dexaméthasone	393,2	355,2	4,9	10	60	20	10
Z - Dextrometorphane	272,2	171,2	4,1	10	60	20	10
Z - Diclofénac (80)	296	214,1	5,6	10	60	20	10
Z - Diphenhydramine (44)	256,2	167,1	4,1	10	40	20	10
Z - Doxylamine	271,2	167,2	2,6	10	60	35	15
Z - Ethylmorphine	314,2	127,8	2,6	10	60	50	10
Z - Granisétron	313,2	138,2	3,5	10	60	35	15
Z - Hydroxychloroquine	336,2	179,2	1,9	10	60	35	15
Z - Lopéramide	477,4	266,2	4,7	10	60	35	15
Z - Malathion (44,81)	331	127,2	0	10	60	35	15
Z - Métopimamide (44)	300,2	227,2	2,9	10	60	35	15
Z - Metopimazine	446,2	140,9	4,0	10	60	20	10
Z - Metopimazine acide	447,2	142	4,1	10	60	20	10
Z - Nalmefène (82)	340	268	3,0	10	60	35	15

Z - Néfopam	254,1	181	3,7	10	60	35	10
Z - Nicotine (44,45)	163,1	130,1	1,6	10	60	35	15
Z - Cotinine (83)	177,2	79,9	1,7	10	60	35	15
Z - Ondansétron	294,2	170,2	3,4	10	60	35	15
Z - Pholcodine	399,2	113,8	1,6	10	40	35	10
Z - Pseudoéphédrine	166,1	148	2,0	10	60	20	10
Z - Psilocybine (84)	285	58,2	0,0	10	60	35	15
Z - Scopolamine	304,2	103,1	2,1	10	40	20	10

Légende :

- EI - Etalon interne
- A - Antalgiques - Analgésiques
- B - Benzodiazépines et apparentés
- C - Anti-hypertenseurs
- D - Anti-dépresseurs
- E - Antiépileptiques
- G - Hypoglycémiant
- H - Anti-coagulants
- M - Stupéfiants
- N - Neuroleptiques
- R - Antiarythmiques
- Z - Divers

Annexe 5 - Liste des transitions du screening toxicologique en mode négatif APRES révision de la méthode

Analyte	Q1	Q3	TR (min)	DP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (eV)
Phenobarbital-d5	235,9	193	3,9	-60	-10	-20	-15
Acétazolamide	221	83	0,0	-60	-10	-35	-15
Acide acétylsalicylique	179	137,1	0,0	-60	-10	-20	-15
Acide méfénamique (80)	240	196	0,0	-60	-10	-10	-15
Acide salicylique	137,1	93	4,0	-60	-10	-35	-15
Acide tolfénamique (80)	260	216	0,0	-60	-10	-10	-15
Acide valproïque	143	143	4,5	-60	-10	-20	-15
Bendroflumethiazide	420	328	4,4	-60	-10	-50	-15
Benzthiazide	430	307,7	4,4	-60	-10	-35	-15
Chloralose	307	161	0,0	-60	-10	-20	-15
Fluorouracile	129	58,8	0,0	-60	-10	-20	-15
Flurbiprofène	243	199,2	0,0	-60	-10	-20	-15
Furosémide	328,9	284,7	4,3	-60	-10	-20	-15
GHB	103	84,9	0,0	-60	-10	-35	-15
Hydroflumethiazide	330,1	160,2	2,3	-30	-10	-50	-15
Hydrochlorothiazide (85)	298,1	269	2,6	-60	-10	-35	-15
Ibuprofène (80)	205	161,1	5,6	-60	-10	-10	-10
Kétoprofène (80)	253	197	0,0	-60	-10	-10	-12
Méloxicam (80)	350	286	0,0	-60	-10	-10	-15
Naproxène (80)	229	185	0,0	-60	-10	-10	-15
Phénobarbital	231	187,8	3,9	-60	-10	-20	-15
Phénylbutazone (80)	307	279	0,0	-60	-10	-10	-15
Propofol (86)	177	145	0,0	-60	-10	-10	-15
Propofol Glucuronide (38)	353	113	0,0	-60	-10	-10	-15
Thiopental	241	57,9	4,8	-60	-10	-50	-15
Topiramate	338	77,8	4,0	-150	-10	-42	-12

Analyte	Répétabilité avec AUC (CV en %)	Reproductibilité avec AUC (CV en %)	Limite de quantification (en ng/mL)	Equivalence ST-SE à 160 ng/mL (Précision en %)	Equivalence ST-UR à 160 ng/mL (Précision en %)	Contamination inter-échantillon (AUC < AUC LQ)	Effet matrice (AUC < AUC LQ)
A - Codéine	16,07	16,47	10	115,6	79,3	RAS	RAS
A - Tramadol	5,74	7,51	1	87,4	62,4	RAS	RAS
B - Diazépam	2,91	3,76	1	Non testé	102,8	RAS	RAS
B - Oxazépam	2,06	5,12	1	Non testé	118,7	RAS	RAS
B - Zopiclone	3,37	6,49	1	Non testé	114,5	RAS	RAS
C – Bisoprolol	2,19	8,17	1	82,8	46,8	RAS	RAS
C - Irbesartan	7,17	14,66	5	142,8	152,6	RAS	RAS
C - Ramipril	9,51	14,99	2,5	112,4	125,9	RAS	RAS
D - Buprénorphine	4,72	15,04	1	169,8	70,4	RAS	RAS
D - Fluoxetine	6,63	20,39	10	109,4	74,4	RAS	RAS
D - Sertraline	6,84	8,36	1	161,6	103,2	RAS	RAS
D - Venlafaxine	5,81	10,14	1	97,4	55,0	RAS	RAS
E - Carbamazépine	5,12	4,82	1	104,0	65,6	RAS	RAS
G - Saxagliptine	15,71	21,77	5	87,4	140,4	RAS	RAS
H – Rivaroxaban	18,52	23,99	10	104,9	91,6	RAS	RAS
M - Benzoylcegonine	7,28	26,13	1	93,8	67,1	RAS	RAS
M – THC-COOH-glu	8,75	10,83	5	303,3	503,9	RAS	RAS
N - Méthylphénidate	13,32	15,81	1	97,7	70,2	RAS	RAS
R – Disopyramide	4,63	7,64	1	95,3	76,4	RAS	RAS
Z - Ondansétron	6,31	10,85	1	78,4	60,9	RAS	RAS

Annexe 6 - Résultats de la validation qualité à 200ng/mL (160ng/mL pour l'équivalence matrice)

Analyte	Répétabilité avec AUC (CV en %)	Reproductibilité avec AUC (CV en %)	Limite de quantification (en ng/mL)	Equivalence ST-SE à 80 ng/mL (Précision en %)	Equivalence ST-UR à 80 ng/mL (Précision en %)	Contamination inter-échantillon (AUC < AUC LQ)	Effet matrice (AUC < AUC LQ)
A - Codéine	27,68	22,74	10	147,4	86,9	RAS	RAS
A - Tramadol	6,94	9,86	1	110,8	60,5	RAS	RAS
B - Diazépam	5,29	5,81	1	Non testé	107,4	RAS	RAS
B - Oxazépam	10,78	18,81	1	Non testé	118,7	RAS	RAS
B - Zopiclone	13,22	16,20	1	Non testé	82,4	RAS	RAS
C - Bisoprolol	13,31	44,86	1	46,8	45,2	RAS	RAS
C - Irbesartan	13,43	21,51	5	146,2	238,4	RAS	RAS
C - Ramipril	9,90	9,81	2,5	119,1	109,7	RAS	RAS
D - Buprénorphine	15,88	10,41	1	221,0	59,3	RAS	RAS
D - Fluoxetine	8,03	21,09	10	165,3	59,3	RAS	RAS
D - Sertraline	9,46	12,96	1	199,7	95,0	RAS	RAS
D - Venlafaxine	7,37	12,52	1	122,1	55,0	RAS	RAS
E - Carbamazépine	4,79	8,88	1	144,7	54,4	RAS	RAS
G - Saxagliptine	17,03	24,89	5	85,4	143,6	RAS	RAS
H - Rivaroxaban	29,29	32,14	10	122,7	84,8	RAS	RAS
M - Benzoylécgonine	13,43	24,51	1	107,8	59,6	RAS	RAS
M - THC-COOH-glu	9,92	19,16	5	281,2	411,6	RAS	RAS
N - Méthylphénidate	10,39	23,97	1	103,5	63,2	RAS	RAS
R - Disopyramide	9,21	24,52	1	134,1	94,1	RAS	RAS
Z - Ondansétron	7,30	16,42	1	85,6	57,6	RAS	RAS

Analyte	Répétabilité avec AUC (CV en %)	Reproductibilité avec AUC (CV en %)	Limite de quantification (en ng/mL)	Equivalence ST-SE (Précision en %)	Equivalence ST-UR (Précision en %)	Contamination inter-échantillon (AUC < AUC LQ)	Effet matrice (AUC < AUC LQ)
A - Codéine	27,68	22,74	10	Non reproductible ST	Non reproductible ST	RAS	RAS
A - Tramadol	6,94	9,86	1	124,8	74,0	RAS	RAS
B - Diazépam	5,29	5,81	1	126,1	79,5	RAS	RAS
B - Oxazépam	10,78	18,81	1	125,3	98,6	RAS	RAS
B - Zopiclone	13,22	16,20	1	114,5	12,4	RAS	RAS
C - Bisoprolol	13,31	44,86	1	96,5	22,0	RAS	RAS
C - Irbesartan	13,43	21,51	5	98,6	228,8	RAS	RAS
C - Ramipril	9,90	9,81	2,5	126,1	88,7	RAS	RAS
D - Buprénorphine	15,88	10,41	1	Non reproductible ST	Non reproductible ST	RAS	RAS
D - Fluoxétine	8,03	21,09	10	265,6	58,7	RAS	RAS
D - Sertraline	9,46	12,96	1	Non reproductible ST	Non reproductible ST	RAS	RAS
D - Venlafaxine	7,37	12,52	1	142,6	90,7	RAS	RAS
E - Carbamazépine	4,79	8,88	1	165,7	45,2	RAS	RAS
G - Saxagliptine	17,03	24,89	5	Non reproductible ST	Non reproductible ST	RAS	RAS
H - Rivaroxaban	29,29	32,14	10	159,9	437,2	RAS	RAS
M - Benzoylécgonine	13,43	24,51	1	108,6	66,7	RAS	RAS
M - THC-COOH-glu	9,92	19,16	5	348,7	456,8	RAS	RAS
N - Méthylphénidate	10,39	23,97	1	Non reproductible ST	Non reproductible ST	RAS	RAS
R - Disopyramide	9,21	24,52	1	165,0	100,1	RAS	RAS
Z - Ondansétron	7,30	16,42	1	93,1	83,2	RAS	RAS

VI. Sources

1. Lambert JH. Photometria, sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae. In p. MDCCCLX. Disponible sur: <https://archive.wikiwix.com/cache/index2.php?url=http%3A%2F%2Fimgbase-scd-ulp.u-strasbg.fr%2Fimgbase%2Fdisplayimage.php%3Fpos%3D-16189>
2. Beer A. Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. In: Annalen der Physik und Chemie [Internet]. 1852. p. 78-88. Disponible sur: <https://archive.wikiwix.com/cache/index2.php?url=https%3A%2F%2Fgallica.bnf.fr%2Fark%3A%2F12148%2Fbpt6k151715.image.f90.langEN>
3. Rubenstein KE, Schneider RS, Ullman EF. "Homogeneous" enzyme immunoassay. A new immunochemical technique. Biochemical and Biophysical Research Communications. mai 1972;47(4):846-51.
4. EMIT Illustration [Internet]. 2022 [cité 9 févr 2022]. Disponible sur: http://www.perrin33.com/biochanalys/ie/ie_3-f1.svg
5. Henderson DR, Friedman SB, Harris JD, Manning WB, Zoccoli MA. CEDIA, a new homogeneous immunoassay system. Clin Chem. sept 1986;32(9):1637-41.
6. Dieter Engel W, Khanna PL. CEDIA in vitro diagnostics with a novel homogeneous immunoassay technique. Journal of Immunological Methods. juin 1992;150(1-2):99-102.
7. Popelka SR, Miller DM, Holen JT, Kelso DM. Fluorescence polarization immunoassay. II. Analyzer for rapid, precise measurement of fluorescence polarization with use of disposable cuvettes. Clinical Chemistry. 1 juill 1981;27(7):1198-201.
8. Nasir MS, Jolley ME. Fluorescence polarization: an analytical tool for immunoassay and drug discovery. Comb Chem High Throughput Screen. août 1999;2(4):177-90.
9. Jameson DM, Croney JC. Fluorescence polarization: past, present and future. Comb Chem High Throughput Screen. mai 2003;6(3):167-73.
10. Wu W, Yang S, Liu J, Mi J, Dou L, Pan Y, et al. Progress in immunoassays for nitrofurans detection. Food and Agricultural Immunology. 1 janv 2020;31(1):907-26.
11. Colbert DL, Childerstone M. Multiple drugs of abuse in urine detected with a single reagent and fluorescence polarization. Clinical Chemistry. 1 oct 1987;33(10):1921-3.
12. ASSIM. Méthodes en immunologie: Des principes aux bonnes applications en recherche, en industrie. Elsevier Health Sciences; 2020. 275 p.
13. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry. sept 1971;8(9):871-4.
14. Illustration CCM [Internet]. [cité 11 févr 2022]. Disponible sur: <https://microbenotes.com/wp-content/uploads/2018/10/Procedure-of-Thin-Layer-Chromatography-TLC.jpg>
15. Ettre LS. The Beginnings of Gas Adsorption Chromatography 60 Years Ago [Internet]. Chromatography Online. [cité 2 déc 2021]. Disponible sur:

<https://www.chromatographyonline.com/view/beginnings-gas-adsorption-chromatography-60-years-ago>

16. Evers FR. Development of a Liquid Chromatography Ion Trap Mass Spectrometer Method for Clinical Drugs of Abuse Testing with Automated On-Line Extraction Using Turbulent Flow Chromatography. 2014 [cité 11 févr 2022]; Disponible sur: <http://rgdoi.net/10.13140/2.1.2125.1367>
17. Molina J, Poe RD. Gas-liquid chromatography of imidazoline salts. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 12 avr 2011;20(6):481-481.
18. Chromatographie d'adsorption [Internet]. [cité 16 févr 2022]. Disponible sur: <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/chromato/chromato12.gif>
19. Platosz NA, Binz TM, Baumgartner MR, Lendoiro E, de Castro A, Concheiro M. Quantification of Classic, Prescription and Synthetic Opioids in Hair by LC–MS–MS. *Journal of Analytical Toxicology*. 1 nov 2021;45(9):943-9.
20. Martinez MA, de la Torre CS, Almarza E. A Comparative Solid-Phase Extraction Study for the Simultaneous Determination of Fluoxetine, Amitriptyline, Nortriptyline, Trimipramine, Maprotiline, Clomipramine, and Trazodone in Whole Blood by Capillary Gas–Liquid Chromatography with Nitrogen-Phosphorus Detection. *Journal of Analytical Toxicology*. 1 sept 2003;27(6):353-8.
21. Chromatographie d'exclusion [Internet]. [cité 16 févr 2022]. Disponible sur: <http://www.123bio.net/cours/chromato/images/exclu.jpg>
22. Martin AJP, Synge RLM. A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochemical Journal*. 1 déc 1941;35(12):1358-68.
23. Chromatographie en phase inverse - Pouvoir d'élution [Internet]. [cité 16 févr 2022]. Disponible sur: http://www4.ac-nancy-metz.fr/physique/liens/Jumber/HPLC/Chromatographie_en_phase_liquide_fichiers/hplc_fichiers/Image3.gif
24. Illustration d'une pompe à injection [Internet]. Disponible sur: http://s.bourdreux.free.fr/sciences/agregation_fichiers/CHIMIE/chromato/chroma3_fichiers/fig34.gif
25. Injecteur HPLC [Internet]. 2022 [cité 13 mai 2022]. Disponible sur: https://i0.wp.com/www.analyticaltoxicology.com/wp-content/uploads/2017/12/img_5a422e7f383b7.png
26. Photos de colonnes chromatographiques [Internet]. [cité 16 févr 2022]. Disponible sur: https://www.lustiner.com/index.php?tg=addon%2F5%2Fimage&tablename=lgds_articles&row=5255067&filename=Colonne_Spherisorb_Waters.JPG&width=300&height=300
27. Schéma simplifié du principe d'HPLC [Internet]. [cité 16 févr 2022]. Disponible sur: https://chimieanalytique.com/wp-content/uploads/2020/09/hplc_principe.png
28. Menet MC. Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone des Laboratoires*. déc 2011;2011(437):41-53.

29. Imbert L. Développement d'outils chimométriques pour l'étude des traitements antileishmaniens. :196.
30. Driscoll JN. Review of Photoionization Detection in Gas Chromatography: The First Decade. *Journal of Chromatographic Science*. 1 nov 1985;23(11):488-92.
31. Sadou Yayé H. Etude du cycle de vie du Ticagrelor par une approche combinée prédictive et caractérisation structurale. 2018.
32. Devoto P. Conception et réalisation d'un spectromètre de masse à temps de vol spatialisable de type `` réflectron `` : électronique et tête de mesure. :162.
33. Orbitrap : exemple de trajectoire d'un ion [Internet]. [cité 17 févr 2022]. Disponible sur: <https://www.creative-proteomics.com/images/Q-Exactive-Hybrid-Quadrupole-Orbitrap-Mass-Spectrometer-4.png>
34. Guitton J, Gaulier JM, Citterio-Quentin A, Abé E, Allibé N, Bartoli M, et al. Accréditation du criblage toxicologique : recommandations du groupe SFBC — SFTA. *Toxicologie Analytique et Clinique*. mars 2019;31(1):12-7.
35. Lane D, Lawson A, Burns A, Azizi M, Burnier M, Jones DJL, et al. Nonadherence in Hypertension: How to Develop and Implement Chemical Adherence Testing. *Hypertension*. 5 nov 2021;HYPERENSIONAHA.121.17596.
36. PubChem [Internet]. [cité 10 janv 2022]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
37. Schulz M, Schmoldt A, Andresen-Streichert H, Iwersen-Bergmann S. Revisited: Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 1100 drugs and other xenobiotics. *Crit Care*. déc 2020;24(1):195.
38. Schenck A. Analysis of Propofol (2,6-Diisopropylphenol) and its Metabolites in One Injection using the DuoSpray™ Ion Source. :8.
39. Candésartan logP. In: PubChem Compound Summary for CID 2541, Candesartan [Internet]. [cité 13 mai 2022]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Candesartan#section=Chemical-and-Physical-Properties>
40. Helfer AG, Michely JA, Weber AA, Meyer MR, Maurer HH. Liquid chromatography-high resolution-tandem mass spectrometry using Orbitrap technology for comprehensive screening to detect drugs and their metabolites in blood plasma. *Analytica Chimica Acta*. mai 2017;965:83-95.
41. Ojanperä I, Kolmonen M, Pelander A. Current use of high-resolution mass spectrometry in drug screening relevant to clinical and forensic toxicology and doping control. *Anal Bioanal Chem*. mai 2012;403(5):1203-20.
42. Roche L, Pinguet J, Herviou P, Libert F, Chenaf C, Eschalier A, et al. Fully automated semi-quantitative toxicological screening in three biological matrices using turbulent flow chromatography/high resolution mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. avr 2016;455:46-54.
43. Yang YK, Reichman HA, Bankhead CD, McNamee JA. Evaluate the comparability of two automated liquid handling systems for clinical toxicology assays. *Drug Test Anal*. févr 2021;13(2):404-11.

44. Gergov M, Ojanperä I, Vuori E. Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography–ionspray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring. *Journal of Chromatography B*. sept 2003;795(1):41-53.
45. Gray TR, Shakleya DM, Huestis MA. A liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 20 drugs of abuse and metabolites in human meconium. *Anal Bioanal Chem*. avr 2009;393(8):1977-90.
46. Yin Z, Chai T, Mu P, Xu N, Song Y, Wang X, et al. Multi-residue determination of 210 drugs in pork by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. sept 2016;1463:49-59.
47. Huang PW, Liu HT, Hsiung CH, Pao LH, Lu CC, Ho ST, et al. Simultaneous determination of nalbuphine and its prodrug sebacoly dinalbuphine ester in human plasma by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study in humans: UPLC-MS/MS quantification nalbuphine and sebacoly dinalbuphine. *Biomed Chromatogr*. juill 2013;27(7):831-7.
48. Nagaraju P, Kodali B, Datla PV, Kovvasu SP. LC-MS/MS Quantification of Tramadol and Gabapentin Utilizing Solid Phase Extraction. *International Journal of Analytical Chemistry*. 28 oct 2018;2018:1-9.
49. Kwiecie A, Krzek J, Walczak M, Mazur M. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF STABILITY-INDICATING TLC-DENSITOMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF BETAXOLOL WITH LC-ESI/MS ANALYSIS OF DEGRADATION PRODUCT. :10.
50. Lee HW, Kang WY, Jung W, Gwon MR, Yang DH, Kim EH, et al. Pharmacokinetics and bioequivalence of fixed-dose combination of candesartan cilexetil/amlodipine besylate (16/10 mg) versus coadministration of individual formulations in healthy subjects. *Transl Clin Pharmacol*. 2020;28(2):92.
51. Wani TA, Zargar S. New ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of irbesartan in human plasma. *Journal of Food and Drug Analysis*. sept 2015;23(3):569-76.
52. Katteboina MY, Pilli NR, Inamadugu JK, Satla SR. LC-MS/MS ASSAY FOR IRBESARTAN IN HUMAN PLASMA USING SOLID PHASE EXTRACTION TECHNIQUE: A PHARMACOKINETIC STUDY. 7(9):6.
53. Marier JF, Guilbaud R, Kambhampati SRP, Mathew P, Moberly J, Lee J, et al. The Effect of AST-120 on the Single-Dose Pharmacokinetics of Losartan and Losartan Acid (E-3174) in Healthy Subjects. *The Journal of Clinical Pharmacology*. mars 2006;46(3):310-20.
54. Liu D, Hu P, Matsushima N, Li X, Li L, Jiang J. Quantitative determination of olmesartan in human plasma and urine by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. sept 2007;856(1-2):190-7.
55. Jain DS, Subbaiah G, Sanyal M, Pande UC, Shrivastav P. First LC–MS/MS electrospray ionization validated method for the quantification of perindopril and its metabolite perindoprilat in human plasma and its application to bioequivalence study. *Journal of Chromatography B*. juin 2006;837(1-2):92-100.

56. Vlase L, Imre S, Muntean D, Achim M, Muntean DL. Determination of Spironolactone and Canrenone in Human Plasma by High-performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Detection. *Croat Chem Acta*. 2011;84(3):361-6.
57. Guan S, Zou Y, Jia B, Wu L, Yang Z, Yuan F, et al. Pharmacokinetic and metabolic studies of Vortioxetine in rats using ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*. déc 2018;41(24):4469-79.
58. Stockis A, Hartstra J, Mollet M, Hadi S. Bioavailability and bioequivalence comparison of brivaracetam 10, 50, 75, and 100 mg tablets and 100 mg intravenous bolus. *Epilepsia*. août 2016;57(8):1288-93.
59. Kim SJ, Koo TS, Ha DJ, Baek M, Lee SK, Shin DS, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for quantification of lacosamide, an antiepileptic drug, in rat plasma and its application to pharmacokinetic study: Bioanalysis of lacosamide in rat plasma with LC/MS/MS. *Biomed Chromatogr*. juill 2011;n/a-n/a.
60. Palte MJ, Basu SS, Dahlin JL, Gencheva R, Mason D, Jarolim P, et al. Development and Validation of an Ultra-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for the Concurrent Measurement of Gabapentin, Lamotrigine, Levetiracetam, Monohydroxy Derivative of Oxcarbazepine, and Zonisamide Concentrations in Serum in a Clinical Setting. *Therapeutic Drug Monitoring*. août 2018;40(4):469-76.
61. Hess C, Musshoff F, Madea B. Simultaneous identification and validated quantification of 11 oral hypoglycaemic drugs in plasma by electrospray ionisation liquid chromatography–mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. avr 2011;400(1):33-41.
62. Gan J, Chen W, Shen H, Gao L, Hong Y, Tian Y, et al. Repaglinide-gemfibrozil drug interaction: inhibition of repaglinide glucuronidation as a potential additional contributing mechanism: Inhibition of repaglinide glucuronidation by gemfibrozil and its glucuronide. *British Journal of Clinical Pharmacology*. déc 2010;70(6):870-80.
63. Bernard M, Akrouf W, Van Buu CT, Metz C, Antignac M, Yagoubi N, et al. Liquid chromatography with tandem mass spectrometry for the simultaneous identification and quantification of cardiovascular drugs applied to the detection of substandard and falsified drugs: Liquid Chromatography. *J Sep Science*. févr 2015;38(4):562-70.
64. Zhao Y, Couchman L, Kipper K, Arya R, Patel JP. A UHPLC-MS/MS method to simultaneously quantify apixaban, edoxaban and rivaroxaban in human plasma and breast milk: For emerging lactation studies. *Journal of Chromatography B*. mai 2020;1144:122095.
65. Robinson A, Hillis J, Neal C, Leary AC. The validation of a bioanalytical method for the determination of clopidogrel in human plasma. *Journal of Chromatography B*. avr 2007;848(2):344-54.
66. Silvestro L, Gheorghe M, Iordachescu A, Ciuca V, Tudoroni A, Rizea Savu S, et al. Development and validation of an HPLC–MS/MS method to quantify clopidogrel acyl glucuronide, clopidogrel acid metabolite, and clopidogrel in plasma samples avoiding analyte back-conversion. *Anal Bioanal Chem*. août 2011;401(3):1023-34.
67. Liu C, Lu Y, Sun H, Yang J, Liu Y, Lai X, et al. Development and validation of a sensitive and rapid UHPLC–MS/MS method for the simultaneous quantification of the common active and inactive

- metabolites of vicagrel and clopidogrel in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. févr 2018;149:394-402.
68. Slavik L, Jacova J, Friedecky D, Ulehlova J, Tauber Z, Prochazkova J, et al. Evaluation of the DOAC-Stop Procedure by LC-MS/MS Assays for Determining the Residual Activity of Dabigatran, Rivaroxaban, and Apixaban. *Clin Appl Thromb Hemost*. 1 janv 2019;25:107602961987255.
 69. Fourel I, Hugnet C, Goy-Thollot I, Berny P. Validation of a New Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Ion-Trap Technique for the Simultaneous Determination of Thirteen Anticoagulant Rodenticides, Drugs, or Natural Products. *Journal of Analytical Toxicology*. 1 mars 2010;34(2):95-102.
 70. Li Y, Jiang Y, Lin T, Wan Q, Yang X, Xu G, et al. Amantadine hydrochloride monitoring by dried plasma spot technique: High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry based clinical assay. *J Sep Sci*. juin 2020;43(12):2264-9.
 71. Keski-Hynnälä H, Kurkela M, Elovaara E, Antonio L, Magdalou J, Luukkanen L, et al. Comparison of Electrospray, Atmospheric Pressure Chemical Ionization, and Atmospheric Pressure Photoionization in the Identification of Apomorphine, Dobutamine, and Entacapone Phase II Metabolites in Biological Samples. *Anal Chem*. 1 juill 2002;74(14):3449-57.
 72. Salvador A, Dubreuil D, Denouel J, Millerioux L. Sensitive method for the quantitative determination of bromocriptine in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 25 juin 2005;820(2):237-42.
 73. Zang Q, Liu Y, He J, Yue X, Zhang R, Wang R, et al. A sensitive and rapid HPLC–MS/MS method for the quantitative determination of trace amount of bromocriptine in small clinical prolactinoma tissue. *Journal of Chromatography B*. mai 2015;989:91-7.
 74. Gandhi A, Beekman C, Parker R, Fang L, Babiskin A, Matta MK. Novel and rapid LC–MS/MS method for quantitative analysis of methylphenidate in dried blood spots. *Bioanalysis*. 1 juin 2018;10(11):839-50.
 75. Mohamed S, Riva R, Contin M. Validated UHPLC–MS/MS method for the simultaneous determination of pramipexole and ropinirole in plasma of patients with Parkinson’s disease. *Journal of Chromatography B*. avr 2016;1017-1018:114-9.
 76. Aman MG, Vinks AA, Remmerie B, Mannaert E, Ramadan Y, Mastj J, et al. Plasma Pharmacokinetic Characteristics of Risperidone and Their Relationship to Saliva Concentrations in Children with Psychiatric or Neurodevelopmental Disorders. *Clinical Therapeutics*. juill 2007;29(7):1476-86.
 77. Qi Y, Liu G. Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Simultaneous Determination of Antipsychotic Drugs in Human Plasma and Its Application in Therapeutic Drug Monitoring. *DDDT*. févr 2021;Volume 15:463-79.
 78. Sha C, Han J, Zhao F, Shao X, Yang H, Wang L, et al. Validated LC–MS/MS method for the simultaneous determination of rotigotine and its prodrug in rat plasma and an application to pharmacokinetics and biological conversion in vitro. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. nov 2017;146:24-8.

79. Pommier F, Frigola R. Quantitative determination of rivastigmine and its major metabolite in human plasma by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 5 févr 2003;784(2):301-13.
80. Jedziniak P, Szprengier-Juszkiewicz T, Pietruk K, Śledzińska E, Żmudzki J. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. juill 2012;403(10):2955-63.
81. Huertas Pérez JF, Sejerøe-Olsen B, Fernández Alba AR, Schimmel H, Dabrio M. Accurate determination of selected pesticides in soya beans by liquid chromatography coupled to isotope dilution mass spectrometry. *Talanta*. mai 2015;137:120-9.
82. Li P, Chen X, Dai X, Wen A, Zhang Y, Zhong D. Application of a sensitive liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method to pharmacokinetic study of nalmefene in humans. *Journal of Chromatography B*. juin 2007;852(1-2):479-84.
83. Kronstrand R, Nyström I, Strandberg J, Druid H. Screening for drugs of abuse in hair with ion spray LC–MS–MS. *Forensic Science International*. oct 2004;145(2-3):183-90.
84. Sergi M, Compagnone D, Curini R, D'Ascenzo G, Del Carlo M, Napoletano S, et al. Micro-solid phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of stimulants, hallucinogens, ketamine and phencyclidine in oral fluids. *Analytica Chimica Acta*. août 2010;675(2):132-7.
85. Shah JV, Shah PA, Sanyal M, Shrivastav PS. Simultaneous quantification of amiloride and hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. oct 2017;7(5):288-96.
86. Jutras M, Williamson D, Chassé M, Leclair G. Development and validation of a liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of five analgesics and sedatives, and six of their active metabolites in human plasma: Application to a clinical study on the determination of neurological death in the intensive care unit. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. oct 2020;190:113521.

SERMENT DE GALIEN

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

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

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

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

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

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



BOURGAIN Julien

Révision et validation d'une méthode de screening toxicologique semi-quantitative en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Th. D. Pharm., Rouen, 2022, 75 p.

RESUME

Les analyses toxicologiques sont indispensables à la prise en charge des patients, de nombreux cas d'intoxications, de mésusages, d'utilisation de stupéfiants, sont à noter parmi les passages dans les services d'urgences, de réanimations, etc. L'évolution des techniques analytiques, notamment de la spectrométrie de masse, a permis l'élaboration de nouvelles analyses plus complexes pour aider aux diagnostics d'étiologies souvent suspectes, voir inconnues. Le screening toxicologique est une méthode analytique permettant la détection ou la détermination semi-quantitative d'au moins 200 analytes dans un seul échantillon. Le présent travail a pour objectif de décrire les démarches de mises en place et de validation de cette méthode assez complexe. Au laboratoire de pharmacologie-toxicologie du CHU de Rouen, le screening toxicologique réalisé depuis plusieurs années repose sur de la chromatographie liquide haute performance en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse avec ionisation par électrospray. Ce screening a nécessité plusieurs améliorations, aussi bien concernant la nature des molécules recherchées que sur son utilisation au quotidien, avec l'ajout d'une gamme d'étalonnage complète et de contrôles de qualité interne réguliers. Ce travail décrit les démarches aussi bien bibliographiques qu'expérimentales afin de répondre au mieux aux critères proposés par les sociétés savantes telles que la Société Française de Toxicologie Analytique (SFTA) ou la Société Française de Biologie Clinique (SFBC) mais aussi du Comité Français d'accréditation (COFRAC). Le screening toxicologique est une méthode amenée à évoluer avec son temps et selon les besoins, malgré la « rigidité » découlant du processus d'accréditation des laboratoires. En complément, son usage pourrait être développé et appliqué à d'autres classes de toxiques, en particulier les nouveaux produits de synthèse, autrement appelés NPS, de par l'évolution des usages et consommations, et qui représente une problématique digne du domaine du dopage.

MOTS CLES : Screening toxicologique – Chromatographie – Spectrométrie de masse – HPLC-MS - Validation de méthode – Qualité

JURY

Président : Pr. FAVENNEC Loïc, PU-PH

Membres : Dr. IMBERT Laurent, PH

Dr. WILS Julien, MCU-PH

Dr. LAMOUREUX Fabien, PH

DATE DE SOUTENANCE : 08 septembre 2022