



UNIL | Université de Lausanne

Unicentre

CH-1015 Lausanne

<http://serval.unil.ch>

Year : 2014

Etude d'administration contrôlée de cannabis et profils cinétiques des cannabinoïdes dans les fluides biologiques

Fabritius Marie

Fabritius Marie, 2014, Etude d'administration contrôlée de cannabis et profils cinétiques des cannabinoïdes dans les fluides biologiques

Originally published at : Thesis, University of Lausanne

Posted at the University of Lausanne Open Archive.
<http://serval.unil.ch>

Droits d'auteur

L'Université de Lausanne attire expressément l'attention des utilisateurs sur le fait que tous les documents publiés dans l'Archive SERVAL sont protégés par le droit d'auteur, conformément à la loi fédérale sur le droit d'auteur et les droits voisins (LDA). A ce titre, il est indispensable d'obtenir le consentement préalable de l'auteur et/ou de l'éditeur avant toute utilisation d'une oeuvre ou d'une partie d'une oeuvre ne relevant pas d'une utilisation à des fins personnelles au sens de la LDA (art. 19, al. 1 lettre a). A défaut, tout contrevenant s'expose aux sanctions prévues par cette loi. Nous déclinons toute responsabilité en la matière.

Copyright

The University of Lausanne expressly draws the attention of users to the fact that all documents published in the SERVAL Archive are protected by copyright in accordance with federal law on copyright and similar rights (LDA). Accordingly it is indispensable to obtain prior consent from the author and/or publisher before any use of a work or part of a work for purposes other than personal use within the meaning of LDA (art. 19, para. 1 letter a). Failure to do so will expose offenders to the sanctions laid down by this law. We accept no liability in this respect.



UNIL | Université de Lausanne

FACULTÉ DE BIOLOGIE ET MEDECINE

CENTRE UNIVERSITAIRE ROMAND DE MEDECINE LEGALE

Etude d'administration contrôlée
de cannabis et profils cinétiques
des cannabinoïdes dans les
fluides biologiques

THÈSE DE DOCTORAT

présentée à la

Faculté de Biologie et Médecine
de l'Université de Lausanne

pour l'obtention du grade de

Docteur ès Sciences

par

Marie FABRITIUS

Directeur de thèse
Dr Christian GIROUD

Co-directeur de thèse
Dr Christian STAUB

Jury

Prof. Laurent Décosterd
Dr. Thomas Briellmann
Prof. Patrice Mangin
Prof. Wolfgang Weinmann

LAUSANNE
2014



UNIL | Université de Lausanne
Faculté de biologie
et de médecine

Ecole Doctorale
Doctorat ès sciences de la vie

Imprimatur

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de

Président	Monsieur Prof. Laurent Décosterd
Directeur de thèse	Monsieur Dr Christian Giroud
Co-directeur de thèse	Monsieur Dr Christian Staub
Experts	Monsieur Prof. Wolfgang Weinmann
	Monsieur Dr Thomas Briellmann
	Monsieur Prof. Patrice Mangin

le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de

Madame Marie Fabritius

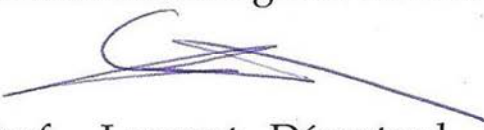
Master of Science de l' Université de Strasbourg, France

intitulée

**ÉTUDE D'ADMINISTRATION CONTRÔLÉE DE CANNABIS ET PROFILS CINÉTIQUES
DES CANNABINOÏDES DANS LES FLUIDES BIOLOGIQUES**

Lausanne, le 5 mars 2014

pour Le Doyen
de la Faculté de Biologie et de Médecine



Prof. Laurent Décosterd

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Docteur Christian Giroud, qui m'a guidé tout au long de ces années, à la fois pour la qualité de son encadrement, sa disponibilité, ses précieux conseils, son aide non négligeable à la rédaction des publications et ses petites blagues.

Je remercie également le Docteur Christian Staub pour avoir accepté de co-diriger cette thèse, pour sa disponibilité, ses conseils scientifiques et l'opportunité qu'il m'a donnée de faire de l'assistantat pour les étudiants en deuxième année de pharmacie à Genève.

J'adresse mes remerciements au Professeur Patrice Mangin pour m'avoir accueillie au sein du Centre Universitaire Romand de Médecine Légale et m'avoir permis d'effectuer mon doctorat dans de bonnes conditions. Je le remercie également pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

J'aimerais adresser toute ma reconnaissance au Professeur Laurent Décosterd qui a accepté de présider le jury de thèse, ainsi qu'au Professeur Wolfgang Weinmann et au Docteur Thomas Briellmann pour avoir accepté de donner de leur temps afin de juger ce travail de thèse.

Mes plus vifs remerciements vont à toute l'équipe cannabis : l'équipe de la division de pharmacologie clinique, en particulier le Professeur Thierry Buclin, Madame Monique Appenzeller, le Docteur Kim Dao et le Docteur Haithem Chtioui ; l'équipe de radiologie : le Professeur Philippe Maeder, le Docteur Eleonora Fornari et le Docteur Giovanni Battistella ; notre psychiatre le Docteur Jean-Frédéric Mall ; enfin, le Docteur Bernard Favrat et le Docteur Paul Vaucher de l'équipe de médecine et psychologie du trafic.

Merci au Docteur Marc Augsburger pour l'intérêt porté à mes recherches et pour son aide pour les cas réels de THCCOOH. Merci également au Docteur Frank Sporkert pour ses conseils scientifiques avisés et ses bonnes idées pour découvrir la Suisse. Merci aussi au Docteur Vincent Varlet pour son intérêt à mon sujet de thèse et les discussions enrichissantes dans notre bureau.

Pour tous les bons moments passés au laboratoire en leur compagnie, je remercie chaleureusement Joëlle Baechler, Angélique Chevalley, Magali Dovat Sabatella, Cinzia Forney, Annette Jordan Vouardoux, Catherine Meylan Bohnenblust, Filomena Rocha Cuna, Aurélien Thomas, Céline Vermeille et Sara Petter, ainsi que l'équipe de Genève : Julien Déglon, Melek Donmez-Altun, Françoise Iatropoulos, Estelle Lauer, François Versace, Max Villa, Christelle Widmer, Federica Zbinden et Lucia Delprete. Merci beaucoup à Aline Chaupond, pour son amitié, son soutien et tous les bons moments hors-thèses passés ensemble.

Merci également à mes stagiaires Aude Delangle et Margaux Benhaim-Delarbre pour leur travaux sur les cannabinoïdes de synthèse.

Un énorme merci à ma famille et en particulier à mes parents qui m'ont permis d'être ce que je suis, pour leur soutien, leur gentillesse, leur affection et leur enthousiasme dans ce que j'ai entrepris. Je remercie chaleureusement mon mari Jean-François qui a vécu cette thèse en direct, pour son soutien, sa patience et son amour.

Enfin, merci à toutes les personnes que je n'ai pas citées ici et qui se reconnaîtront dans ces quelques lignes.

Résumé

Le cannabis est l'une des drogues illégales les plus consommées au monde. Le delta-9-tétrahydrocannabinol (THC) est le composé psychoactif majeur du cannabis et est fréquemment détecté dans le sang de conducteurs impliqués dans un accident de la route, alors qu'il est actuellement interdit de conduire sous l'influence du THC en Suisse comme dans de nombreux pays européens. La détection de ce composé dans le sang est suivie d'une série de mesures pénales et administratives à l'encontre du conducteur impliqué.

Cette thèse intitulée « Etude d'administration contrôlée de cannabis et profils cinétiques dans les fluides biologiques » s'inscrit dans une étude toxicologique menée au Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV). Le but de cette étude est d'évaluer les effets du cannabis sur le fonctionnement du cerveau lorsque le consommateur accomplit une tâche fondamentale de la conduite automobile. Pour cela, l'imagerie médicale par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) est combinée à un test informatisé simulant une tâche psychomotrice requise pour une conduite automobile sûre. Il s'agit d'un test de double tâche de poursuite d'une cible au moyen d'un curseur dirigé par un joystick, combiné à une tâche secondaire de détection de signaux routiers. Parallèlement, les profils cinétiques sanguins et salivaires des volontaires ont été déterminés grâce à des prélèvements effectués tout au long de la journée d'étude.

Les objectifs principaux de ce travail de thèse sont les suivants : après une revue de la littérature existante sur les techniques d'analyse des cannabinoïdes dans les fluides biologiques, une méthode a été développée et validée pour ces composés dans la salive puis appliquée aux échantillons de l'étude. En parallèle, les échantillons sanguins et urinaires ont été analysés, en partie avec une méthode adaptée de celle développée pour la salive. Pour montrer la versatilité de cette méthode, celle-ci a été employée pour analyser des échantillons de bile qui a l'avantage de contenir des concentrations élevées de métabolites conjugués. Dans un deuxième temps, les dosages effectués sur le sang et la salive ont permis d'établir les profils cinétiques des cannabinoïdes, de déterminer leurs paramètres pharmacocinétiques et de les

comparer. Les données obtenues ont montré que la concentration sanguine en acide 11-nor-9-carboxy-delta-9-tétrahydrocannabinol (THCCOOH) pouvait servir à distinguer les fumeurs occasionnels des fumeurs réguliers de cannabis, car elle est significativement plus élevée chez les consommateurs réguliers. De plus, d'autres cannabinoïdes présents dans la salive pourraient servir de marqueurs de consommation récente dans ce fluide biologique. Enfin, que ce soit dans le sang, la salive ou l'urine, des phytocannabinoïdes peuvent être utilisés comme marqueur de consommation de cannabis illégal car ils sont absents des médicaments à base de cannabis utilisant des préparations synthétiques ou purifiées du THC.

Summary

Cannabis is one of the most widely used drugs in the world. Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) is the major psychoactive molecule of cannabis and it is frequently detected in the blood of drivers implicated in a road accident. Detection of this compound in the blood implies that the driver will be convicted because it is currently forbidden to drive under the influence of THC in Switzerland like in most European countries.

This thesis entitled “Study of cannabis administration and kinetic profiles of cannabinoids in biological fluids” is part of a clinical study which took place at the University Hospital of the Canton de Vaud (CHUV). The aim of this study is to evaluate the impact of cannabis on the driving ability of occasional and heavy smokers, by investigating changes in the brain network by functional magnetic resonance imaging combined to a tracking task. At the same time, whole blood and oral fluid samples were collected along the day of experiment and kinetic profiles were determined in these two biological fluids.

The main goals of this thesis were as follows: first, I reviewed the literature on the analysis of cannabinoids in biological fluids to develop and validate an analytical method for these compounds in oral fluid. At the same time, whole blood and urine samples were analysed, with a method adapted from the one used for oral fluid. To demonstrate the versatility of this method, it was employed to analyze bile samples, because this biological matrix is known to contain high concentrations of phase II metabolites. Results of analysis were used to establish kinetic profiles of cannabinoids, to determine pharmacokinetic parameters in oral fluid and blood and to compare them. The obtained values allow us to propose a cut-off concentration of delta-9-tetrahydrocannabinol carboxylic acid (THCCOOH) in whole blood to help to distinguish occasional from heavy cannabis smokers, because THCCOOH concentration is significantly higher in samples of heavy consumers. Furthermore, other cannabinoids found in oral fluid could be used as markers of recent cannabis consumption. Finally, in blood, oral fluid or urine, plant cannabinoids could be used to distinguish consumption of illegal from therapeutic cannabis,

because these compounds are not known to be present in the medical preparations using synthetic or purified THC.

Liste des abréviations

11-OH-THC	11-hydroxy-delta-9-tétrahydrocannabinol
AUC	Surface sous la courbe (Area Under the Curve)
CBC	Cannabichromène
CBD	Cannabidiol
CBN	Cannabinol
Cmax	Concentration maximale déterminée par la lecture des données
DC	Chlorure de dansyle (Dansyle Chloride)
DMABC	Chlorure de diméthylaminobenzoyle (diméthyl-amino-benzoyle chloride)
Gluc	Glucuronide
GTFCh	Société de langue allemande de toxicologie et chimie forensique (Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie)
IRMf	Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
LC	Chromatographie liquide (Liquid Chromatography)
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LCR	Loi fédérale sur la circulation routière
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
m/z	Rapport masse/charge
MRM	Suivi de réactions multiples (Multiple Reaction Monitoring)
OCR	Ordonnance sur les règles de la circulation routière
OF	Fluide oral (oral fluid)
PA	Picolylamine
PD	Pharmacodynamique
PK	Pharmacocinétique
RT	Temps de rétention (Retention Time)
SFSTP	Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques
SFTA	Société Française de Toxicologie Analytique
T _{1/2}	Demi-vie d'élimination
THC	Delta-9-tétrahydrocannabinol
THC-A	Acide delta-9-tétrahydrocannabinolique A
THCCOOH	Acide 11-nor-delta-9-tétrahydrocannabinol carboxylique

THCV	Tétrahydrocannabivarine
THCVCOOH	Acide 11-nor-delta-9-tétrahydrocannabivarine carboxylique
Tmax	Temps auquel la concentration maximale est observée
VAS	Echelle visuelle analogique (Visual Analog Scale)

Table des matières

Remerciements	i
Résumé	v
Summary	vii
Liste des abréviations	ix
Table des matières	xi
I. Introduction générale	1
I.1. Le cannabis	1
I.1.1. Consommation	2
I.1.1.1. Modes et habitudes de consommation.....	2
I.1.1.2. Usage thérapeutique.....	3
I.1.2. Absorption, distribution, métabolisme et élimination chez l'homme.....	5
I.1.3. Différences PD/PK entre consommateurs occasionnels et réguliers.....	7
I.1.4. Effets souhaités et indésirables chez l'homme	10
I.2. Chiffres et législation.....	11
I.3. Effets sur la conduite automobile	12
II. Présentation de l'étude cannabis / IRMf / conduite automobile	15
II.1. Description de l'étude pluridisciplinaire	15
II.1.1. Recrutement des volontaires	16
II.1.2. Journées d'administration.....	17
II.1.3. Protocole d'inhalation	18
II.1.4. IRMf.....	19
II.1.5. Questionnaires subjectifs.....	20
II.2. Matrices biologiques investiguées.....	21
II.2.1. Sang.....	21
II.2.2. Fluide oral	22
II.2.2.1. Distinction entre fluide oral et salive	22
II.2.2.2. Prélèvement par Salivette®	22
II.2.2.3. Prélèvement par Quantisal™	22
II.2.2.4. Difficultés de prélèvement.....	24
II.2.3. Urine.....	24
III. Méthodes d'analyse des cannabinoïdes	25
III.1. Quelques rappels concernant les techniques analytiques utilisées	25

III.1.1. Chromatographie gazeuse et liquide	25
III.1.2. Spectrométrie de masse et spectrométrie de masse en tandem.....	25
III.1.3. Principes de la validation d'une méthode analytique.....	26
III.2. Revue de la littérature existante	28
III.2.1. Article : Revue : Analyse des cannabinoïdes par spectrométrie de masse en mode tandem	28
III.2.2. Littérature postérieure à l'article de revue	44
III.3. Développement d'une méthode d'analyse par LC-MS/MS pour le fluide oral	45
III.3.1. Article : Analysis of cannabinoids in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry	46
III.3.2. Dérivatisation.....	60
III.3.2.1. Présentation de la problématique.....	60
III.3.2.2. Evaluation de différents réactifs de dérivatisation.....	61
III.4. Description des analyses dans le sang	64
III.4.1. Analyses par GC-MS/MS.....	64
III.4.2. Analyses par LC-MS/MS	64
III.5. Adaptation et validation de la méthode pour la salive à l'analyse de la bile.....	65
III.5.1. Article 3 : Distribution of free and conjugated cannabinoids in human bile samples.	66
III.6. Description des analyses dans l'urine	72
IV. Résultats de l'étude cannabis / IRMf / conduite automobile	74
IV.1. Présentation et interprétation des résultats d'analyses dans les fluides biologiques	74
IV.1.1. Article 4 : Comparison of cannabinoid concentrations in oral fluid and whole blood between occasional and regular cannabis smokers prior to and after smoking a cannabis joint	75
IV.1.2. Concentrations en THCCOOH dans le sang	89
IV.1.2.1. Article 5: THCCOOH concentrations in whole blood: Are they useful in discriminating occasional from heavy smokers?	91
IV.1.3. Résultats des analyses des échantillons urinaires.....	101
IV.2. Thématiques complémentaires à l'étude	102
IV.2.1. Les moyens préconisés sur internet pour échapper à un contrôle salivaire positif sont-ils efficaces ?.....	102
IV.2.1.1. Présentation de l'étude pilote sur le rinçage de la bouche	102
IV.2.1.2. Résultats et discussion	103
IV.2.2. Cannabis médical vs. cannabis illégal, peut-on faire la distinction ?.....	108
IV.2.2.1. Présentation de la problématique	108

IV.2.2.2. Résultats et discussion	110
V. Discussion générale	113
VI. Bibliographie	117
VII. Annexes	124
VII.1. Lettre à l'éditeur	124
VII.2. Protocole de l'amendement à l'étude pour le rinçage de la bouche.....	128
VII.3. Liste des communications scientifiques.....	132

I. Introduction générale

I.1. Le cannabis

Le cannabis est l'une des drogues les plus consommées au monde [1]. Entre 2003 et 2005, on estime que 162 millions de personnes dans le monde ont consommé du cannabis, ce qui correspond à 4% de la population mondiale de 15 à 64 ans [2]. Le plus souvent fumé sous la forme de joint, le cannabis peut être consommé de nombreuses façons différentes, chacune ayant ses avantages et inconvénients. Cependant, depuis quelques années, le cannabis thérapeutique se développe dans les pays occidentaux : les médicaments à base de cannabinoïdes sont de plus en plus nombreux à être vendus sous ordonnance dans les pharmacies d'Amérique du Nord ou d'Europe.

Une problématique importante en médecine légale est la détection du composé psychoactif majeur du cannabis, le delta-9-tétrahydrocannabinol (THC), dans le sang de conducteurs impliqués dans un accident de la route ou soupçonnés de conduire sous l'influence de drogues ou de médicaments. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence que le cannabis est la substance la plus fréquemment détectée après l'alcool chez des conducteurs de véhicules [3]. La capacité et l'aptitude à conduire sont donc remises en question pour les personnes qui conduisent un véhicule sous l'influence du cannabis. La capacité à conduire est définie selon les instructions du 22 mai 2008 de l'Office fédéral des routes (OFROU) concernant la constatation de l'incapacité à conduire dans la circulation routière [4] : « 1.2.2. Par capacité à conduire, on entend l'état psychique et physique momentané de l'individu le rendant capable de conduire de façon sûre un véhicule automobile dans la circulation routière. [...]. L'incapacité de conduire correspond en principe à un état transitoire à court terme (p. ex. en raison d'une consommation d'alcool, de drogues ou de médicaments, de la fatigue) ». Cependant, si la capacité à conduire est remise en question de façon durable, il s'agit alors d'inaptitude. « Par aptitude à conduire, on entend les conditions psychiques et physiques générales, indépendantes de tout événement,

auxquelles un individu doit satisfaire pour conduire un véhicule automobile de façon sûre dans la circulation routière » [4]. Dans ce contexte, plusieurs études ont démontré que le cannabis augmente le temps de décision au volant et altère le contrôle du véhicule. La capacité et/ou l'aptitude à conduire sont donc fortement réduites chez un consommateur de cannabis. Dès lors, il est important, d'un point de vue médico-légal, de se pencher sur ce problème qu'est la consommation de cannabis en relation avec la conduite automobile.

I.1.1. Consommation

I.1.1.1. Modes et habitudes de consommation

La méthode la plus populaire de consommation de cannabis (plus de 90% des utilisateurs) est le joint ou « pétard » [1]. Il s'agit d'une cigarette artisanale roulée à la main, qui contient le plus souvent du cannabis (résine ou herbe) mélangée avec du tabac pour faciliter la combustion. Un petit bout de carton roulé est mis à l'extrémité du joint et fait office de filtre.

La pipe à eau (« bong »), le narguilé, la chicha ou le « hookah » sont également utilisés pour fumer le cannabis mais aussi d'autres substances comme le tabac. La fumée, aspirée par un tube, passe d'abord par un réservoir d'eau [2]. Cette opération permet de la refroidir et de la débarrasser de certaines substances irritantes pour les voies respiratoires. D'autres pipes, comme les chillums ou les sebsi marocains, permettent également de fumer plus facilement le cannabis pur.

L'ingestion de cannabis peut se faire également grâce au « space cake ». Il s'agit d'une pâtisserie dans laquelle du cannabis, sous forme de résine ou d'herbe, a été ajouté [5]. Les cookies au chocolat sont aussi un bon moyen de dissoudre le THC [6].

Le « bhang » est une boisson à base de feuilles de cannabis infusées dans du lait, assaisonnée avec des épices comme la cardamome, la muscade, le curcuma, les clous de girofle, le poivre, le miel, la cannelle ou autres [7-9].

Enfin, il existe également le vaporisateur, qui chauffe le cannabis mais ne le brûle pas. Il permet ainsi de libérer le THC dans un sac plastique. La vapeur est ensuite inhalée.

I.1.1.2. Usage thérapeutique

Le cannabis peut être utilisé pour le traitement de la spasticité due à la sclérose en plaques, contre les nausées ou contre les vomissements des patients sous chimiothérapie [10]. Il est aussi prescrit pour augmenter l'appétit des patients atteints du SIDA ou pour atténuer les douleurs de personnes atteintes de neuropathies [11, 12].

Il existe plusieurs formes de cannabis thérapeutique :

- Le spray buccal Sativex® (GW Pharmaceutical) : il contient des extraits de Cannabis sativa L., essentiellement du THC et du cannabidiol (CBD) purifiés, dans un ratio 1 : 1. Il est surtout prescrit en Amérique du Nord (Canada et USA) pour soulager les douleurs neuropathiques des patients atteints de sclérose en plaques [13]. Il est également approuvé en Espagne, en Allemagne, au Danemark, en Suède et en Nouvelle-Zélande.
- Les capsules de Marinol® (Abbott Laboratories) : elles contiennent 2.5, 5 ou 10 mg de Dronabinol, un cannabinoïde synthétique, structurellement identique au THC, dissout dans de l'huile de sésame. Le Marinol® est autorisé dans plusieurs pays européens comme en Allemagne, en Italie mais aussi en Suisse sur autorisation exceptionnelle.
- Le Namisol® (Echo Pharmaceuticals) : il est présenté sous forme de comprimé et contient du THC naturel pur à plus de 98%.
- Le Cesamet® (Meda Pharmaceuticals) : ce médicament existe sous forme de capsules. Ces dernières contiennent 1 mg de Nabilone, qui est lui aussi une version synthétique du THC. Le Cesamet® est disponible au Canada depuis 1982 et le dosage recommandé est de 2 à 6 mg par jour pour un effet antiémétique [13].

- Le Cannador® : il s'agit d'un produit issu de la Society for Clinical Research en Allemagne. Une capsule contient un extrait de la plante, avec des quantités standardisées de THC et CBD afin d'obtenir un ratio d'environ 2 :1 (THC/CBD).
- Le Bedrocan® : il est l'une des versions de cannabis à usage médical proposé par la société Bedrocan BV aux Pays-Bas. Il est issu du Cannabis Sativa L. (teneur en THC titrée à 19% et moins de 1% de CBD). Le Bedrobinol (THC 12% et CBD <1%) et le Bediol (THC 6% et CBD 7,5%) sont les autres versions proposées par ce fournisseur. Le Bedica® (THC 14% et CBD <1%) est une autre forme de cannabis médical, issu du Cannabis indica.
- La teinture d'extrait naturel de cannabis : elle est titrée à 10 mg de THC/10 mL d'alcool et délivrée sous ordonnance par des pharmacies habilitées en Suisse. Pour l'administration, sept à huit gouttes de teinture sont versées dans de l'eau et le tout est bu.
- La solution huileuse de dronabinol à 2.5% de THC : elle est également disponible sous ordonnance en pharmacie habilitée à délivrer du cannabis thérapeutique en Suisse. Selon la dose prescrite, entre 3 et 15 gouttes sont mises sur un aliment gras (cookie par exemple) qui est ensuite ingéré.

Il est également possible d'administrer le THC par voie rectale [14, 15] sous forme de suppositoire. Certaines publications démontrent également que le cannabis permet de lutter contre le glaucome en réduisant la pression intraoculaire. Cette affection de l'œil se caractérise par une augmentation de la pression intraoculaire et peut conduire à la cécité si elle n'est pas traitée à temps [13]. Cependant, les effets bénéfiques du cannabis contre le glaucome sont limités dans le temps (quelques heures) et des réactions d'irritations oculaires sont observées, en particulier chez les personnes âgées.

I.1.2. Absorption, distribution, métabolisme et élimination chez l'homme

Dans la plante fraîche *Cannabis Sativa L.*, environ 90% du THC est disponible sous forme d'acide tétrahydrocannabinolique A (THC-A). Le THC-A est le précurseur non psychoactif du THC. Lorsqu'il est chauffé (en fumant un joint ou dans le four pour un space cake par exemple), il va se décarboxyler partiellement pour former le THC [16, 17].

L'absorption et la distribution des cannabinoïdes dans le corps dépendent en grande partie du mode d'administration du cannabis. L'inhalation de cannabis permet une absorption rapide des cannabinoïdes, les fumeurs réguliers absorbant plus de drogue que les fumeurs occasionnels [18]. La différence serait due à la technique d'inhalation [19]. En général, le pic plasmatique de THC apparaît quelques minutes seulement après la première inhalation [20]. Les concentrations maximales sont variables et dose-dépendantes (entre 50 et 300 ng/mL). Lorsque le cannabis ou le THC est ingéré, l'absorption est plus lente : la concentration maximale de THC est atteinte environ 1h après la consommation, mais celle-ci est nettement inférieure à la concentration obtenue lors de l'inhalation (quelques dizaines de ng par mL de sang) [21, 22].

Environ 90% du THC dans le sang est distribué au plasma [23] où il est fortement lié aux protéines plasmatiques (97-99%), principalement les lipoprotéines [23-25]. Le THC pénètre rapidement dans les tissus vascularisés comme le foie, le cœur, les graisses, les reins, le placenta ou encore l'hypophyse [21]. Sa concentration plasmatique décroît alors rapidement.

Le THC est principalement métabolisé dans le foie. L'hydroxylation et l'oxydation sont catalysées par le cytochrome P450 (CYP) [21]. Un membre de la sous-famille du cytochrome CYP2C (CYP2C9) serait en particulier responsable de l'hydroxylation [26, 27]. Près d'une centaine de métabolites du THC ont été identifiés [28]. Le carbone 11 est le site le plus concerné par les réactions de métabolisation (Figure 1). L'hydroxylation va conduire à la

formation du 11-hydroxy-THC (11-OH-THC) et une oxydation supplémentaire forme l'acide 11-nor-THC carboxylique (THCCOOH). Le carbone 8 est également concerné par l'oxydation mais dans une moindre mesure que le carbone 11 [3, 21]. Le THC, le 11-OH-THC et le THCCOOH sont partiellement conjugués à l'acide glucuronide (gluc) par des enzymes UDP-glucuronosyltransferase (UGT), ce qui augmente leur solubilité dans l'eau et favorise leur élimination par les reins [29]. Les enzymes CYP2C et les UGT présentent des polymorphismes génétiques qui affectent la vitesse de métabolisation des cannabinoïdes [30].

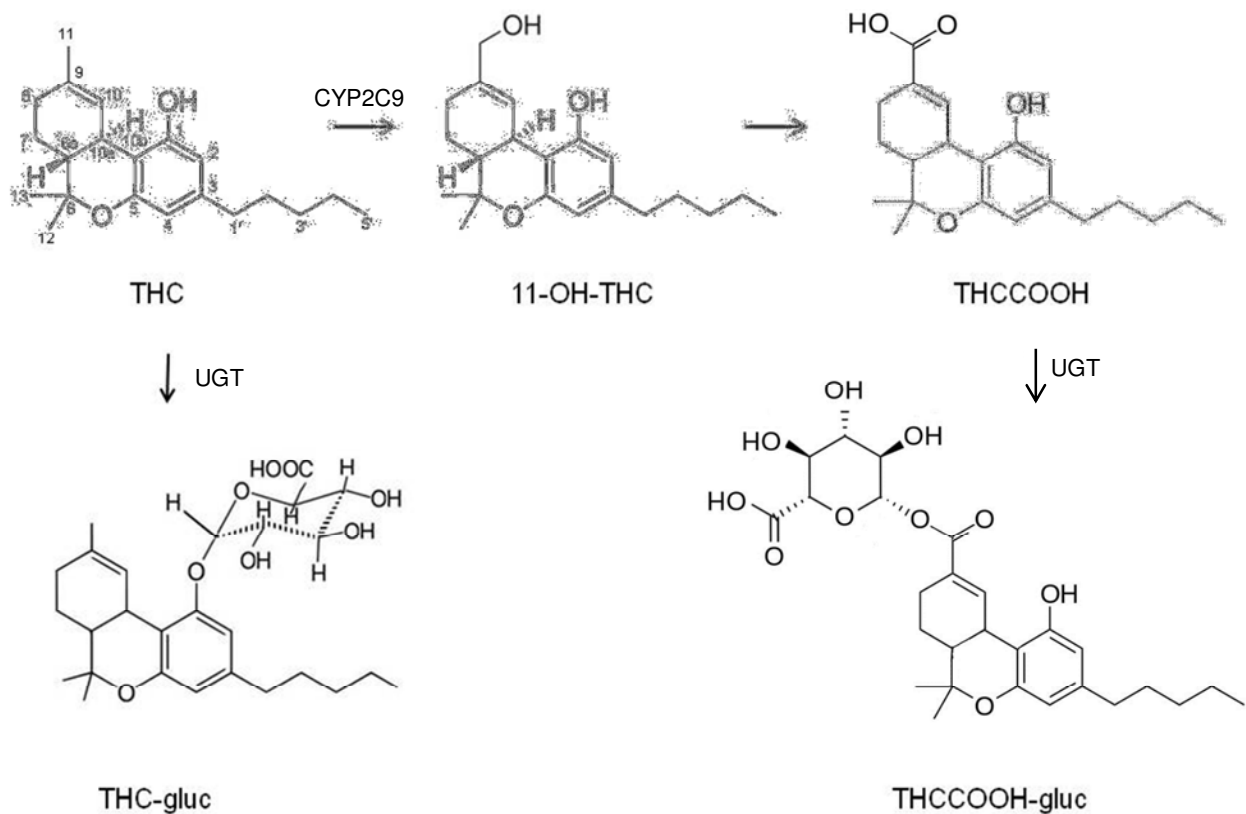


Figure 1. Principales voies de métabolisation du THC chez l'homme. La structure chimique du THC est numérotée selon le système dibenzopyrane [21].

Dans les jours qui suivent la consommation de marijuana (autre nom du cannabis pour désigner les fleurs séchées de la plante), le THC est excrété, essentiellement sous la forme de

métabolites inactifs, dans les selles et dans une moindre mesure dans l'urine. Ce sont essentiellement des acides qui sont excrétés dans l'urine, le principal métabolite étant le THCCOOH-gluc [31, 32]. Le THC et le 11-OH-THC sont également conjugués à l'acide glucuronique et excrétés dans l'urine, mais en plus faibles quantités.

I.1.3. Différences PD/PK entre consommateurs occasionnels et réguliers

Les courbes cinétiques du THC et de ses métabolites peuvent être décrites par plusieurs modèles pharmacocinétiques. Des modèles à plusieurs compartiments ont été utilisés [21] mais le modèle non-compartimental est le plus fréquemment mis à profit. Dans ce modèle, les paramètres suivants sont évalués : l'aire sous la courbe de concentration (AUC), la concentration maximale observée (C_{max}), le temps auquel la C_{max} est mesurée (T_{max}), la vitesse d'élimination terminale (λ) et la demi-vie d'élimination ($t_{1/2}$). Ces deux derniers paramètres sont difficilement mesurables à cause des longues périodes d'investigation nécessaires pour les déterminer. Selon les molécules, les matrices biologiques étudiées (sang ou urine par exemple) et la période de temps investiguée, les $t_{1/2}$ peuvent varier de quelques heures (THC dans le sang) à plusieurs jours (THCCOOH dans le sang ou l'urine).

Peu d'études cliniques se sont intéressées à la différence des paramètres pharmacocinétiques entre les consommateurs occasionnels et réguliers de cannabis. En 2008, l'équipe de Toennes s'est penchée sur les propriétés pharmacocinétiques du THC, du 11-OH-THC et du THCCOOH dans le sérum de fumeurs occasionnels et réguliers [33]. Bien que les doses de cannabis fumé soient égales et la procédure d'inhalation standardisée, les consommateurs chroniques présentaient des concentrations maximales (C_{max}) de THC significativement supérieures à celles des consommateurs occasionnels. De même, les $t_{1/2}$ du THC et du 11-OH-THC étaient significativement plus élevées chez les fumeurs chroniques que chez les fumeurs occasionnels.

La $t_{1/2}$ du THCCOOH n'était cependant pas significativement différente entre les deux groupes. Dans les conditions placebo, les fumeurs occasionnels ne présentaient aucune trace de cannabinoïdes dans les échantillons de sérum. Chez les consommateurs réguliers, le THCCOOH est détecté dans tous les échantillons et mesuré jusqu'à une concentration de 636.5 µg/L (valeur médiane : 37.3 µg/L). Skopp et Pötsch ont étudié les concentrations en cannabinoïdes dans le sérum 24 à 48h après inhalation [34]. Trois groupes de sujets volontaires ont été recrutés : des fumeurs réguliers (plus d'un joint/jour), des fumeurs modérés (entre un joint/jour et un joint/semaine) et des fumeurs légers (moins d'un joint/semaine). Le THC et le 11-OH-THC n'ont pas été détectés dans les échantillons des consommateurs légers, alors qu'ils étaient mesurés dans plusieurs spécimens des fumeurs réguliers et modérés. De même, bien qu'aucune valeur seuil n'ait pu être donnée, les consommateurs réguliers présentaient des concentrations en THCCOOH et en THCCOOH-gluc généralement plus élevées que celles des fumeurs modérés et légers. En 2010, Toennes et al. se sont intéressés aux propriétés pharmacocinétiques du THC dans le fluide oral des fumeurs occasionnels et réguliers [35]. Ils ont noté que la C_{max} du THC des consommateurs chroniques était significativement supérieure à celle des fumeurs occasionnels. Ceci est concordant avec les résultats obtenus sur le sérum. Pour la suite de la période d'observation, les concentrations étaient similaires entre les deux groupes.

En considérant les résultats présentés dans ces deux publications, il semble possible de distinguer d'après les analyses si l'échantillon appartient à un consommateur régulier ou occasionnel. Des concentrations élevées de THCCOOH dans le sang pourraient être un bon indicateur d'une consommation répétées de marijuana, mais des faibles concentrations n'excluent cependant pas complètement une consommation répétée.

D'un point de vue médico-légal, et en particulier en ce qui concerne la conduite automobile, la distinction entre fumeurs occasionnels et réguliers de cannabis est relativement importante car les conséquences pénales ne seront pas les mêmes si un conducteur sous l'emprise du THC appartient à l'un ou l'autre des deux groupes. Une consommation répétée de cannabis suggère une inaptitude à conduire à long terme, alors qu'un usage occasionnel indique une diminution temporaire de la capacité à conduire. Dans le cas d'une inaptitude à conduire, le fautif se voit retirer son permis et devra prouver son abstinence pour pouvoir le récupérer, ce qui induit des mesures administratives et des investigations toxicologiques supplémentaires par rapport à une incapacité temporaire de conduire. La concentration en THCCOOH dans le sang pourrait aider à faire la distinction entre ces deux groupes. En effet, à cause de sa longue demi-vie d'élimination (jusqu'à plusieurs jours), une accumulation de THCCOOH peut être observée dans le corps des fumeurs réguliers de cannabis. En Allemagne, la GTFCh (Gesellschaft für Toxicokologische und Forensische Chemie, société allemande de toxicologie et chimie forensique) se base sur les travaux de Daldrup et al. [36]. Ces auteurs estiment qu'une concentration en THCCOOH dans le sérum supérieure à 150 ng/mL (75 ng/mL si collectée dans les 8 jours qui suivent l'annonce du prélèvement sanguin) est associée à une consommation régulière de cannabis. A l'inverse, une concentration inférieure à 5 ng/mL suggère fortement un usage occasionnel. En France, la SFTA (Société Française de Toxicologie Analytique) a adopté un consensus national le 14 juin 2013 [37]. Il y est déclaré qu'une concentration en THCCOOH libre supérieure à 50 ng/mL dans le sang est en faveur d'une consommation régulière de cannabis (au moins 1 joint par jour, tous les jours). Toutefois, aucune étude prospective ou rétrospective originale ne vient apporter de la substance à cette proposition.

I.1.4. Effets souhaités et indésirables chez l'homme

Le THC provoque des effets psychologiques en stimulant les récepteurs spécifiques du système « endocannabinoïde » [38], en particulier le récepteur appelé CB1. Celui-ci est largement répandu dans le cerveau, il est particulièrement concentré dans l'hippocampe (mémoire) et le cervelet (coordination des mouvements). Un second récepteur, CB2, est situé essentiellement dans les cellules immunitaires, mais aussi dans certaines cellules du système nerveux central (microglie). Les cannabinoïdes se lient également à d'autres récepteurs, tels que le récepteur PPAR- γ (métabolisme des lipides) ou le récepteur TRPV1 (transmission de signaux suite à un stimulus douloureux). Rydberg et al. ont montré en 2007 que le récepteur orphelin GPR55 est aussi la cible de plusieurs cannabinoïdes [39]. La découverte de tels récepteurs chez l'homme a conduit à la recherche de ligands endogènes : les endocannabinoïdes. L'anandamide et le 2-arachidonoyl glycérol sont les premiers endocannabinoïdes à avoir été caractérisés. Des transporteurs, mais aussi des enzymes responsables de leur synthèse ont été mis à jour [40]. Les endocannabinoïdes agissent comme des signaux rétrogrades aux synapses du système nerveux central et sont des médiateurs essentiels des différentes formes de plasticité neuronale du cortex, du système limbique et du cervelet.

Le cannabis est l'une des drogues les plus consommées car ses effets sont ressentis comme agréables. La recherche du plaisir et l'envie de se sentir euphorique (« high »), relaxés sont parmi les raisons les plus souvent citées pour expliquer la consommation de cannabis [38].

Cependant, plusieurs études ont montré que le cannabis pouvait induire une paranoïa, mais aussi des hallucinations visuelles et auditives et des illusions de persécution. Il apparaît également que, comme les endocannabinoïdes favorisent l'encodage des souvenirs dans la mémoire, le THC diminue les facultés de mémorisation [1]. La prise de cannabis entraîne également une tachycardie, c'est-à-dire l'augmentation du rythme cardiaque entre 20 et 100%.

Enfin, la perception du temps est un autre paramètre altéré par la prise de cannabis : le temps qui passe paraît plus long qu'en réalité pour un consommateur sous l'influence de cette substance. Cette distorsion peut altérer les performances des tâches qui dépendent d'une estimation précise du temps écoulé. Par exemple, Rafaelsen et al. [41] ont montré que le cannabis avait un effet prononcé sur l'estimation du temps et de la distance dans une situation de conduite automobile.

I.2. Chiffres et législation

En Suisse en 2006, 34% des garçons de 15 ans et 27% des filles du même âge ont rapporté avoir consommé au moins une fois du cannabis, ce qui est supérieur à la moyenne européenne (20 et 15% respectivement) [42]. Chez les jeunes adultes, ces chiffres sont de 36 et 24%. En 2002, une étude menée en Suisse montre qu'à partir de 15 ans, environ 50% des hommes et 40% des femmes ont consommé au moins une fois du cannabis dans leur vie [43].

Les problèmes de la consommation de cannabis concernent notamment la conduite automobile. Le THC est de plus en plus souvent détecté dans le sang de conducteurs suspectés de conduire sous l'emprise de drogues ou impliqués dans un accident. Le nombre d'accidents survenus sous l'influence du cannabis a augmenté de 63 à 185 entre 2003 et 2006 [42]. Plusieurs études épidémiologiques ont également montré que, dans le cadre de la conduite automobile, le cannabis est la substance la plus fréquemment rencontrée après l'alcool éthylique [3]. Or, selon la législation en vigueur, « toute personne qui n'a pas les capacités physiques et psychiques nécessaires pour conduire un véhicule parce qu'elle est sous l'influence de l'alcool, de stupéfiants, de médicaments ou pour d'autres raisons, est réputée incapable de conduire pendant cette période et doit s'en abstenir » (Loi fédérale sur la circulation routière, LCR, Art. 31, al. 2). De plus, « un conducteur est réputé incapable de conduire chaque fois qu'il est prouvé

que son sang contient du tétrahydrocannabinol (Cannabis)» (Ordonnance sur les règles de la circulation routière, OCR, Art. 2, al. 2). Ceci permet d'appliquer la tolérance zéro en matière de conduite sous l'influence de drogues au volant. Ainsi, pour les substances les plus connues comme l'héroïne, la cocaïne, la morphine ou le cannabis, la présence dans le sang de l'une de ces substances peut suffire pour attester l'incapacité de conduire.

I.3. Effets sur la conduite automobile

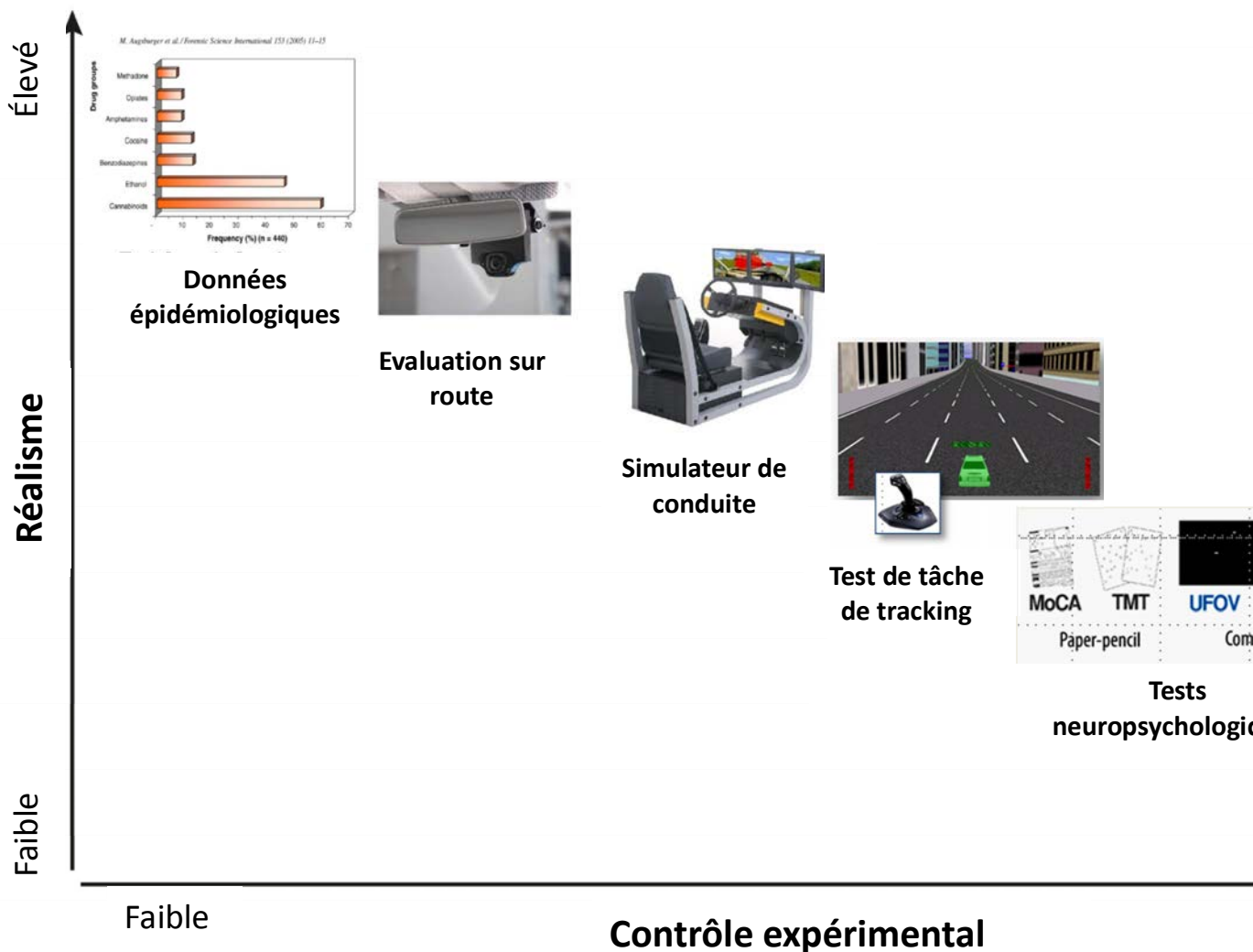
Depuis de nombreuses années, les effets du THC sur les performances de la conduite automobile ont fait l'objet de plusieurs études. Klonoff [44] a testé la conduite après administration de THC ou d'un placebo. Les sujets ont fumé un joint standardisé contenant 4.9 ou 8.4 mg de THC. Ils ont conduit ensuite sous la supervision d'un instructeur professionnel. Klonoff conclut que les compétences pour la conduite sont affectées uniquement lors de la prise de THC la plus importante.

Plus récemment, Ramaekers et al. [45] ont étudié la diminution de la performance après avoir fumé un joint de cannabis. Les sujets recrutés ont fumé un joint contenant 0, 250 ou 500 µg THC/kg. Après l'inhalation, les sujets ont passé plusieurs tests de performance. Les résultats obtenus montrent une augmentation du temps de réaction et une difficulté accrue pour prendre de bonnes décisions dans un laps de temps réduit. Le THC diminue donc significativement les performances cognitives et motrices.

Ramaekers et al. [46] ont aussi examiné les effets du cannabis combiné avec de l'alcool. Les sujets ont reçu alors des doses de THC de 0, 100 ou 200 µg/kg combinées ou non avec de l'alcool qui atteignait une concentration sanguine en éthanol de 0.04 g/dl. Ils ont passé ensuite un test de suivi de trajectoire sur route avec la poursuite d'un véhicule dans le trafic normal. Le principal paramètre de mesure est la déviation standard de la position latérale. Les résultats démontrent que si le THC a un effet néfaste pour la conduite automobile, la combinaison avec

de l'alcool a un effet encore plus prononcé. Mais les conducteurs semblent être conscients des altérations produites par le cannabis et compensent souvent cette baisse de performance par une conduite plus conservatrice (vitesse réduite et/ou pas de dépassement) [1, 47].

Il existe plusieurs stratégies pour évaluer l'influence des drogues, et en particulier du cannabis, sur les performances liées à la conduite automobile (Figure 2). Les données épidémiologiques (comme la détermination de la proportion d'accidents attribuée à un chauffeur sous l'influence du cannabis) sont celles qui se rapprochent le plus de la réalité. L'inconvénient majeur réside dans le fait que les investigateurs n'ont que très peu de contrôle expérimental et qu'il est alors difficile de tirer des informations précises sur la responsabilité du cannabis. L'évaluation de la conduite par un professionnel et/ou des caméras de suivi de trajectoire installées sur le véhicule donne une idée réaliste de la capacité ou de l'aptitude à conduire. Dans le même ordre d'idée, le



simulateur de conduite permet d'évaluer la réaction du conducteur au volant. Le contrôle expérimental est plus élevé puisque l'investigateur peut gérer le trajet et les obstacles souhaités, ainsi que les doses de cannabis consommées, mais l'étude perd en réalisme par rapport à la conduite sur route. Enfin, les tests neuropsychologiques et l'imagerie médicale sont les techniques qui présentent une rigueur du contrôle expérimental très élevée, mais ces stratégies sont assez éloignées de la situation réelle du conducteur au volant de sa voiture qui conduit pendant ou après avoir fumé un joint.

II. Présentation de l'étude cannabis / IRMf / conduite automobile

II.1. Description de l'étude pluridisciplinaire

L'étude « Fonctionnement du cerveau du fumeur de cannabis révélé par IRMf lorsqu'il réalise une tâche fondamentale de la conduite automobile et profils sanguins des cannabinoïdes » a pour but d'étudier le fonctionnement du cerveau du consommateur de cannabis inhalé et de déterminer les effets du cannabis sur des tâches spécifiques de la conduite automobile. Le projet combine l'imagerie médicale par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf), un test informatisé de double tâche avec la poursuite d'une cible au moyen d'un curseur dirigé par un joystick (test de tâche de « tracking ») comme tâche principale et un test de type Go/Nogo constituant un signal distracteur.

Pour cette étude, deux groupes de consommateurs sont sélectionnés : des fumeurs occasionnels (consommation habituelle d'un joint de cannabis entre 1 fois par mois et 1 fois par semaine) et des fumeurs réguliers (consommation habituelle entre 10 fois par mois et 2 fois par jour). Les fumeurs sélectionnés ont reçu, au cours de 2 séances d'administration distinctes et selon un protocole cadencé, un joint de cannabis pur titré à 11% de THC (CBD < 1%) ou un joint de cannabis placebo (cannabis agricole presque dépourvu de THC, CBD < 0.1%).

Cette étude pluridisciplinaire fait intervenir plusieurs équipes : l'unité de toxicologie et chimie forensiques et l'unité de médecine et psychologie du trafic du Centre Universitaire Romand de Médecine Légale, la division de pharmacologie clinique (PCL), le département de psychiatrie et l'unité de radiodiagnostic et de radiologie interventionnelle du Département de Radiologie Médicale du CHUV. La PCL s'est occupée du recrutement des volontaires, de l'inclusion avant la participation à l'étude et du suivi médical des sujets lors des journées d'inhalation. Un psychiatre était chargé de l'examen psychiatrique des sujets au moment de l'inclusion. L'équipe de radiologie s'est chargée de tout ce qui concerne l'imagerie médicale : installation des sujets dans l'IRM, acquisition des données et traitement des résultats. L'unité de médecine du trafic a contribué à l'interprétation des données en relation avec la conduite automobile. Son

responsable avait de plus la charge de veiller à la sécurité de l'étude. Enfin, l'unité de toxicologie et chimie forensiques est à la base de la conception de l'étude : elle s'est occupée de rédiger les protocoles et de soumettre le projet aux bailleurs de fonds (FNS, OFSP, UNIL-CHUV), d'obtenir le feu vert des diverses commissions (éthique, Swissmedic, CHUV, OFSP) et de réaliser les pré-études et enfin d'interpréter les données avec ses partenaires. Elle a joué un rôle de coordination tout au long de l'étude. Ma contribution particulière concerne l'encadrement des volontaires tout au long de la journée et de veiller au bon prélèvement des échantillons salivaires, sanguins et urinaires ainsi qu'à leur conservation en vue des analyses ultérieures. Parallèlement, j'étais chargée de développer une méthode d'analyse pour les cannabinoïdes dans la salive après une recherche bibliographique. Cette méthode a été utilisée pour les analyses des échantillons de fluide oral réalisées par mes soins. J'étais également chargée de faire les analyses des échantillons d'urine, de transmettre les échantillons sanguins au laboratoire genevois et de m'assurer de leurs analyses dans des délais raisonnables. Enfin, j'ai interprété et comparé les données, y compris sur le plan statistique, afin d'obtenir les profils cinétiques sanguins et salivaires présentés dans les articles de ce travail de thèse.

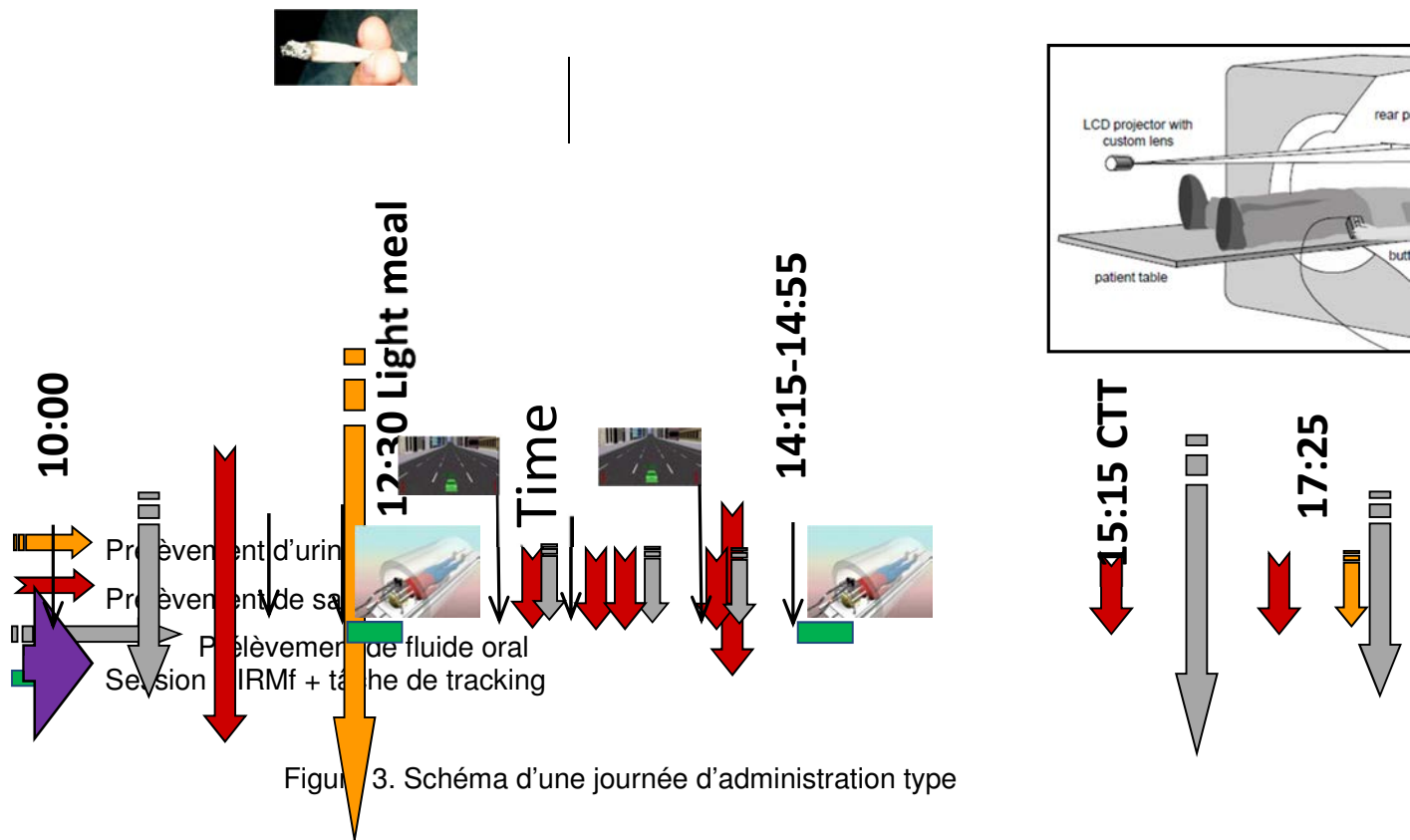
II.1.1. Recrutement des volontaires

Les volontaires ont été recrutés par voie d'affiche et ont dû passer par plusieurs étapes avant de participer à l'étude. Les sujets inclus sont des hommes, droitiers, âgés entre 18 et 30 ans. Lors d'une première visite, ils ont reçu les informations concernant les journées d'administration de cannabis et ont pu poser toutes les questions qu'ils souhaitaient. Après un délai de réflexion d'au moins 24 heures, ils ont confirmé leur souhait de participer. Les sujets ont alors passé un entretien psychiatrique et un examen médical. Ainsi, les sujets présentant des antécédents psychiatriques ou des paramètres cliniques anormaux ont été exclus de l'étude. Des échantillons d'urine et de sang ont également été prélevés afin de confirmer la fréquence de

consommation de marijuana et d'exclure tout participant consommant d'autres produits psychotropes courants comme la cocaïne, les amphétamines ou les opiacés.

II.1.2. Journées d'administration

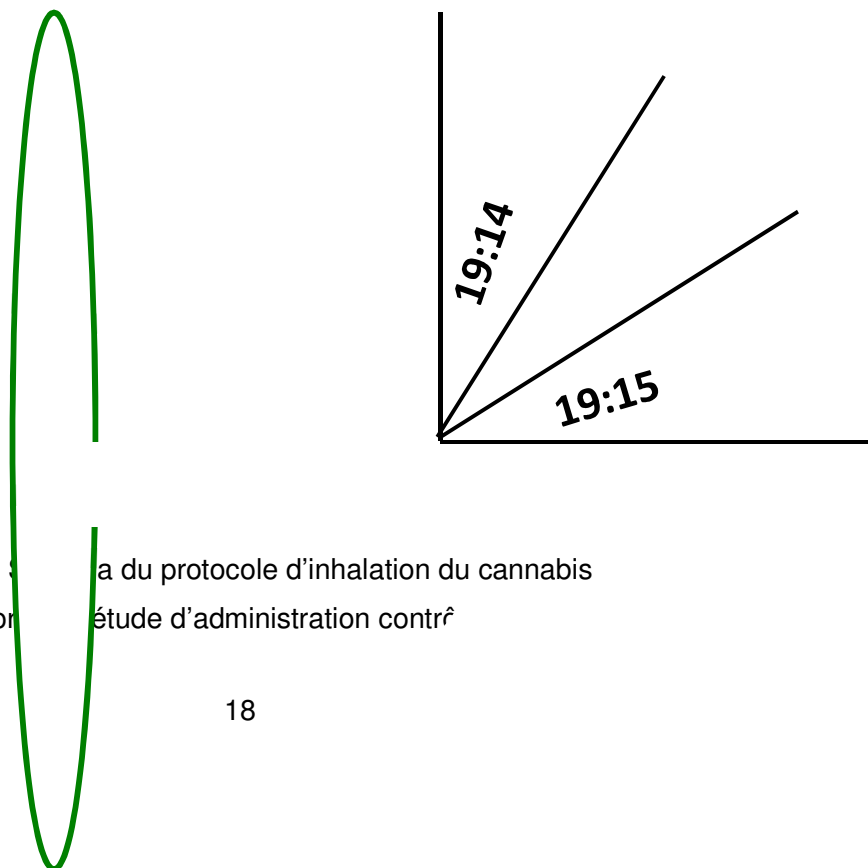
Les journées d'administration se sont déroulées de la façon suivante (Figure 3) : deux volontaires se sont présentés le matin à l'équipe encadrante. Ils ont été équipés d'un cathéter pour les prélèvements de sang qui ont eu lieu dans la journée. Ils ont également donné un échantillon d'urine et de salive et passé un test d'alcoolémie avant de commencer la journée. Après un repas léger, les sujets ont passé une première IRMf. Ensuite, juste après un prélèvement de sang et de salive, les volontaires ont inhalé un joint de cannabis (11% de THC) ou un placebo (< 1% de THC). D'autres échantillons biologiques ont été prélevés à intervalle de



temps réguliers après l'inhalation. Les sujets volontaires sont ensuite retournés dans l'IRM. Enfin, des prélèvements de sang et de salive ont eu lieu jusqu'à la fin de la journée d'administration. De même, tout au long de l'expérience, les sujets ont évalué eux-mêmes l'intensité des effets du cannabis en répondant à des questionnaires à échelle analogique visuelle (Visual Analog Scale, VAS) [48].

II.1.3. Protocole d'inhalation

Pour chaque expérience, le protocole d'inhalation était supervisé par un médecin épaulé par deux scientifiques. Les cycles d'inhalation ont duré 60 secondes et étaient décomposés ainsi : un avertissement de 3 s, 2 s d'inhalation, une phase de 5 s de retenue de la fumée dans les poumons puis une phase d'expiration et de repos de 50 s. Ce protocole est représenté dans la Figure 4. Plusieurs cycles d'inhalation et de repos étaient effectués jusqu'à ce que la combustion du joint ait atteint un trait dessiné 3 cm avant le filtre, sauf demande contraire du volontaire (en cas de malaise par exemple). Cette limite était généralement atteinte en 6 à 8 inhalations, le nombre variant essentiellement en fonction de l'intensité de l'inhalation.



II.1.4. IRMf

Des échantillons de sang et de salive ont été prélevés à intervalles réguliers, en particulier avant et après l'IRMf pour extrapoler les taux de THC et des métabolites pendant la phase d'imagerie. L'évaluation par IRMf a été effectuée après la phase de distribution du THC, pendant la phase d'élimination lente. Cette phase correspond souvent au moment où les consommateurs sont contrôlés pour conduite erratique ou impliqués dans un accident de la circulation.

Au cours des séances d'imagerie, le sujet volontaire devait faire un test de tâche de tracking. Grâce à un jeu de miroir, le participant apercevait une image projetée par un beamer pendant toute la séance d'imagerie. Sur cet écran, une cible (carré jaune) se déplaçait de façon pseudo aléatoire sur une ligne horizontale de gauche à droite et vice versa. Avec un joystick, le sujet devait superposer un curseur de poursuite (carré vide légèrement plus grand que le carré jaune) sur la cible. Cette tâche de tracking était la tâche principale. Une tâche secondaire a été ajoutée comme distracteur. Le sujet devait appuyer sur un bouton poussoir avec sa main gauche lorsqu'un feu orange ou rouge apparaissait à l'écran. Il devait maintenir le bouton appuyé jusqu'à ce que le feu disparaisse. Il ne devait pas presser le bouton si un feu vert apparaissait.

L'ensemble de ce test de tracking partagé en phases distinctes constituait un bloc :

- a) une phase de tracking actif avec manipulation du joystick et poursuite de la cible, d'une durée de 40 s ;
- b) une phase passive où seul le regard du sujet devait suivre la cible. Cette deuxième phase durait 30 s ;
- c) une phase de repos avec fixation de la cible immobile pendant 20 s.

Ce cycle de 3 phases durait 1,5 min et était répété 10 fois au cours de l'expérience d'imagerie. La moitié des blocs incluait la deuxième tâche avec les feux rouges, oranges ou verts et l'autre moitié comprenait seulement la tâche de tracking principale.

Les premières mesures effectuées ont été destinées à évaluer les régions du cerveau concernées par l'inhalation de THC ou de placebo. D'autres mesures ont permis d'étudier la morphologie du cerveau des sujets volontaires.

Les résultats obtenus lors des séances d'imagerie ont été traités par le service de Radiologie, en particulier par le Dr. Giovanni Battistella, qui a réalisé la moitié de son travail de thèse sur cette thématique [49]. Il a notamment montré que chez les fumeurs occasionnels la performance lors de la tâche visuo-motrice en relation avec la conduite automobile est significativement diminuée, même avec une faible concentration de THC dans le sang. L'imagerie morphologique a révélé que les fumeurs réguliers de cannabis présentent des atrophies de substance grise cérébrale dans des régions associées à la mémoire et aux émotions.

II.1.5. Questionnaires subjectifs

Les sujets retenus pour l'étude ont répondu six ou sept fois à un questionnaire à échelle VAS sur les effets qu'ils ressentaient. Il leur était par exemple demandé de préciser s'ils se sentaient capable de conduire et s'ils se sentaient intoxiqués ou confus. Le sentiment d'intoxication est un effet généralement désiré suite à l'inhalation de cannabis. La sensation d'euphorie est aussi un effet souhaité. A l'inverse, la sensation de confusion est plutôt considérée comme un effet secondaire indésirable [50, 51]. Pour indiquer les effets ressentis, les volontaires devaient tracer un trait vertical sur une échelle de 100 mm allant de 0 (effet pas du tout ressenti) à 100 (effet très fortement ressenti) par comparaison aux effets maximaux qu'ils avaient pu ressentir lors de leurs précédentes expériences privées avec le cannabis. Un exemple est représenté sur la Figure 5. La distance du trait tracé par rapport au zéro était ensuite mesurée et l'ensemble des données regroupé afin d'en tirer des graphiques présentant l'évolution des effets avant et suite à l'inhalation de cannabis.

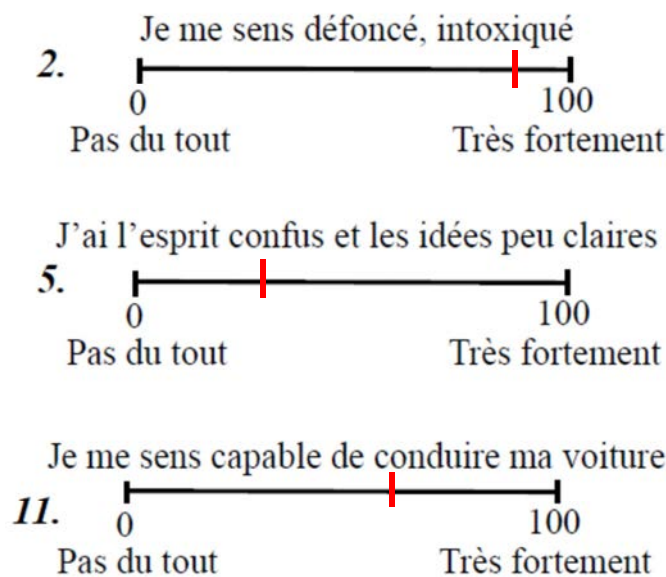


Figure 5. Exemple de questionnaire à échelle VAS

II.2. Matrices biologiques investiguées

II.2.1. Sang

Plusieurs échantillons de sang ont été prélevés à l'aide d'un cathéter tout au long de la journée et en particulier avant et plusieurs fois après l'inhalation dans le but d'obtenir le profil cinétique des cannabinoïdes. Les nombreux tests psychotechniques et l'imagerie ont limité le nombre de prélèvements pouvant être réalisés. Les échantillons de sang complet ont été congelés aussitôt après le prélèvement à -20°C. Les échantillons prélevés pour le plasma ont été centrifugés puis aliquotés et congelés à -80°C. L'ensemble a été transporté ou envoyé au laboratoire de toxicologie de Genève dans de la neige carbonique pour analyse. Le THC, le 11-OH-THC et le THCCOOH ont été dosés dans le sang complet par chromatographie gazeuse (GC) ou liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Les méthodes sont décrites dans le paragraphe III. Les échantillons de plasma ont été utilisés pour doser les endocannabinoïdes par LC-MS/MS [52].

II.2.2. Fluide oral

II.2.2.1. Distinction entre fluide oral et salive

Un abus de langage laisse penser que la salive et le fluide oral sont la même chose. Pourtant, la salive est une excrétion claire et légèrement acide [53] produite par diverses glandes salivaires (parotides, sous-maxillaires et sublinguales [54]) qui tapissent la bouche [55] alors que le fluide oral est constitué de la salive et d'autres fluides comme des expectorations des poumons et de la gorge ou encore de l'écoulement nasal [55]. Il peut contenir également des débris alimentaires.

Plusieurs échantillons de fluide oral ont été collectés lors de la journée d'administration.

II.2.2.2. Prélèvement par Salivette®

Pour les fumeurs occasionnels, le fluide oral a été prélevé à l'aide du collecteur Salivette® (Sarstedt). Il s'agissait d'un rouleau de coton qu'il fallait mâcher pendant une minute pour que celui-ci s'imprègne de salive. Aucun additif stimulant la salivation (par ex : acide citrique) n'était présent dans la Salivette®. Le rouleau était ensuite placé dans la Salivette® : un petit tube en polypropylène perforé qui était lui-même contenu dans un tube plus grand utilisé pour la centrifugation de l'ensemble. Le collecteur Salivette® est présenté en photo dans la Figure 6a et 6b. Le tout a été congelé à -80°C en attendant d'être analysé.

II.2.2.3. Prélèvement par Quantisal™

Comme l'étude d'administration s'est déroulée sur plusieurs années, nous avons pris en compte



Figure 6. Collecteur salivette® fermé (a) et ouvert (b) montrant successivement de gauche à droite le bouchon, le coton neutre, le collecteur percé et le tube de centrifugation

l'amélioration des connaissances, ainsi que celle des moyens de prélèvements. La littérature scientifique a montré que la Salivette était en particulier mal adapté à l'analyse des cannabinoïdes [56]. Ainsi, pour les fumeurs chroniques, le fluide oral a été recueilli avec le collecteur Quantisal™ (Immunoanalysis), représenté sur la Figure 7a et 7b. Le tampon de conservation contenu dans ce collecteur permet d'augmenter les rendements d'extraction des cannabinoïdes et améliore la stabilité des échantillons [56]. Un tampon de coton est maintenu

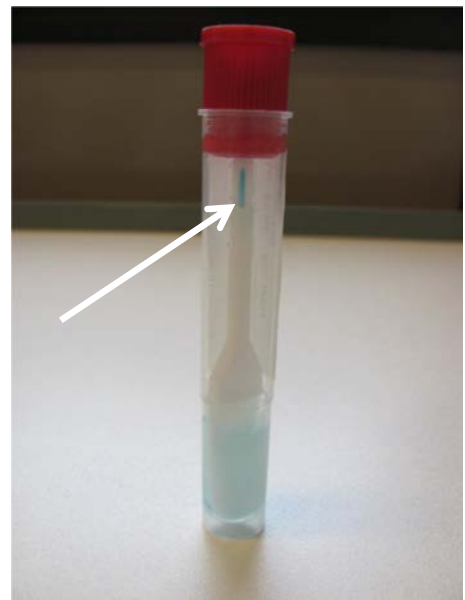


Figure 7. Collecteur Quantisal™ avant (a) et après utilisation (b) avec l'indicateur de volume devenu bleu.

sur une tige en polypropylène. On place le tampon dans la bouche pour que le fluide oral se dépose dessus. A l'extrémité de la tige en polypropylène se trouve un indicateur de volume qui devient bleu lorsqu'un millilitre de fluide oral s'est déposé. L'utilisateur retire le coton de sa bouche et le place dans un tube en plastique contenant 3 mL d'un tampon de conservation, puis referme le tube. Le collecteur est ensuite laissé à température ambiante pendant 4 à 8 heures avant d'être congelé.

II.2.2.4. Difficultés de prélèvement

Après inhalation d'un joint de cannabis, la sécrétion de salive est inhibée [57], la bouche devient sèche et la collecte de fluide oral jusqu'à un millilitre est difficile. C'est pourquoi, il est nécessaire de peser les collecteurs pour déterminer la quantité exacte de fluide oral recueillie. Les collecteurs sont donc pesés avant et après le prélèvement pour déterminer par soustraction la quantité de fluide oral recueillie.

II.2.3. Urine

Avant la participation à l'étude, les volontaires fournissaient un échantillon d'urine lors de l'inclusion. Celui-ci permettait de faire quelques tests immunologiques rapides pour confirmer la consommation de cannabis (chez les fumeurs réguliers) et exclure tout volontaire qui consommerait d'autres drogues, comme des amphétamines, de la cocaïne ou des opiacés. De plus, au cours des journées d'étude, un échantillon d'urine a été prélevé au début et à la fin de la journée d'administration. J'ai analysé ces échantillons à l'aide de deux méthodes présentées dans le paragraphe III.6 au laboratoire de Genève. La créatinine urinaire a été déterminée sur automate pour pouvoir exprimer les concentrations en ng/mg de créatinine en plus de la concentration volumétrique. Ce paramètre permet de tenir compte de la dilution de l'urine.

III. Méthodes d'analyse des cannabinoïdes

III.1. Quelques rappels concernant les techniques analytiques utilisées

Les techniques d'analyses utilisées dans le cadre de cette thèse sont principalement des techniques chromatographiques (chromatographie gazeuse GC ou liquide LC) couplée à un spectromètre de masse (MS).

III.1.1. Chromatographie gazeuse et liquide

La chromatographie est une technique chimique permettant la séparation physique de plusieurs analytes contenus dans un même échantillon. Les molécules présentes dans l'échantillon sont entraînées à travers une colonne chromatographique à l'aide d'un gaz pour la GC ou d'un mélange de solvants liquides dans le cas de la LC. Les analytes ayant une affinité plus ou moins élevée avec la colonne chromatographique et la phase mobile (gaz ou solvant), la différence d'affinité entre les composants permet leur séparation tout au long de la colonne. Pour la GC, on utilise généralement un gaz inerte (hélium, hydrogène, argon ou azote). Dans le cas de la LC, l'échantillon est entraîné par un mélange de solvants (par exemple : eau et méthanol ou solution de formate d'ammonium et acétonitrile) à haute pression. Le temps écoulé entre l'introduction de l'échantillon dans la colonne et la sortie du composé est appelé le temps de rétention et est spécifique pour chaque analyte.

III.1.2. Spectrométrie de masse et spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse est une méthode de détection qui mesure les rapports masse sur charge (m/z) de molécules ionisées. Pour ce faire, le spectromètre est composé 1) d'une source qui permet d'ioniser (et éventuellement de volatiliser) les molécules, 2) d'un analyseur qui

sépare les ions produits selon leur rapport masse/charge et enfin 3) d'un détecteur qui amplifie et amplifie le signal et le transmet au système informatique. Le couplage entre la GC ou la LC et le spectromètre de masse permet le passage de l'échantillon sous pression à un vide poussé juste avant son introduction dans la source. Le type de source utilisé varie selon la méthode chromatographique choisie et le type d'analyse souhaité. Dans le cas de la LC, la source permet d'éliminer le solvant et de volatiliser l'échantillon en plus de l'ioniser.

Pour une analyse de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), deux analyseurs sont couplés et reliés par une cellule de collision. Le premier analyseur sélectionne les ions d'intérêt à l'aide de leur rapport m/z . Les ions sélectionnés sont ensuite fragmentés dans la cellule de collision. Le deuxième analyseur va déterminer le rapport m/z des fragments produits. Dans le cas d'une analyse en suivi de réactions multiples (multiple reaction monitoring ou MRM) comme utilisée dans les méthodes présentées dans ce travail de thèse, le second analyseur va sélectionner un fragment particulier, si possible intense et spécifique, choisi par l'utilisateur et l'isoler pour qu'il atteigne le détecteur. On travaille ainsi sur des transitions spécifiques des composés à analyser. En général, on se focalise sur un couple de transitions, l'une servant à la quantification, l'autre confirmant par sa présence l'existence de la molécule recherchée.

III.1.3. Principes de la validation d'une méthode analytique

Avant de pouvoir être utilisée au laboratoire, une méthode analytique doit être validée. Le but de la validation analytique est d'établir que la méthode est adaptée à l'usage prévu, c'est-à-dire de montrer la fiabilité des résultats de la méthode dans des limites bien définies [58]. Dans le cadre de cette thèse, les méthodes ont été validées à l'aide des profils d'exactitude [58, 59]. Pour ce faire, des calibrateurs standards (échantillons de concentration connue) vont permettre d'établir une courbe de calibration sur une gamme de concentrations souhaitée. Les concentrations des échantillons inconnus analysés par la suite doivent se trouver dans la gamme de concentrations.

Des standards de validation (de concentration connue également) de trois niveaux de concentration au minimum sont analysés au moins trois fois et sur trois jours de validation au minimum. Les concentrations mesurées permettent ensuite de calculer le biais, le coefficient de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire [58-60]. Ces paramètres sont ensuite utilisés pour construire le profil d'exactitude de la méthode (Figure 8).

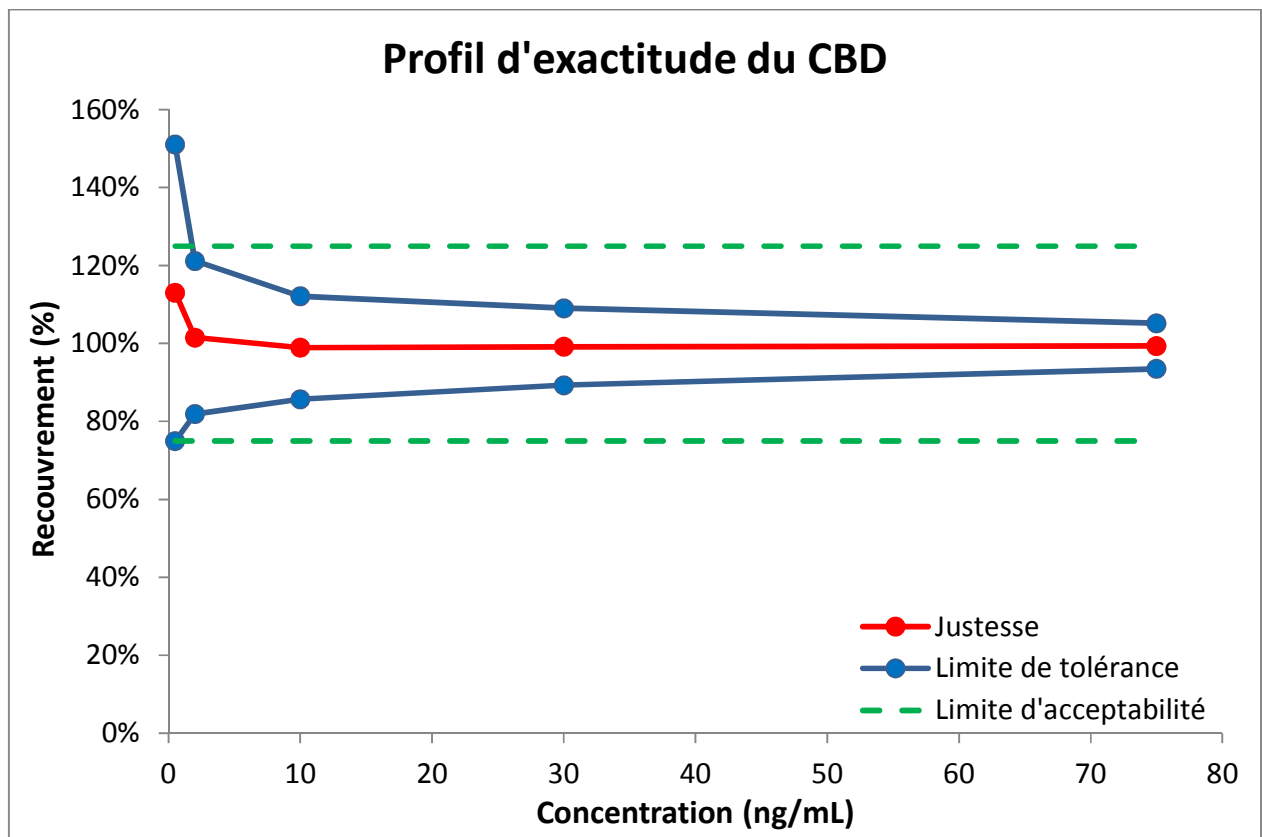


Figure 8. Exemple de profil d'exactitude

Les limites de tolérance déterminées par l'écart-type de fidélité intermédiaire doivent se trouver dans l'intervalle d'acceptabilité défini par l'utilisateur. Ici, les limites d'acceptabilité ont été placées à $\pm 25\%$, ce qui est souvent recommandé pour les dosages bio-analytiques [60]. Dans l'exemple présenté en Figure 8, pour des concentrations supérieures à 1.0 ng/mL, le profil d'exactitude se trouve dans l'intervalle d'acceptabilité. En dessous de cette valeur, on ne peut pas garantir que

la méthode soit capable de produire des résultats à $\pm 25\%$ de la valeur vraie de l'échantillon. Le domaine de validité est donc de 1.0 – 75 ng/mL.

III.2. Revue de la littérature existante

Le THC est le principal composé psycho-actif du cannabis et donc la molécule d'intérêt majeur pour déterminer une intoxication au cannabis. Dès lors, sa présence dans le corps peut indiquer une consommation de marijuana, qu'elle soit active ou passive. De nombreuses méthodes analytiques ont été publiées pour le THC seul ou avec d'autres cannabinoïdes d'intérêt, que ce soit dans le sang, les cheveux, l'urine, la salive ou même la sueur (personnes vivantes), le méconium et le lait maternel (nouveau-né et sa mère), la bile, l'humeur vitrée et le cerveau (personnes décédées). En général, les méthodes chromatographiques sont plébiscitées par les auteurs, car elles permettent une bonne séparation des composés présents dans les matrices biologiques. Au cours de cette dernière décennie, la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est devenue largement utilisée car ce détecteur présente une très haute sensibilité et sélectivité. Dans les années 2000 à 2010, plus de 40 méthodes GC-MS/MS ou LC-MS/MS ont été développées et publiées dans des journaux scientifiques pour l'analyse des cannabinoïdes. Elles sont inventoriées et discutées dans l'article de revue présenté ci-après.

III.2.1. Article : Revue : Analyse des cannabinoïdes par spectrométrie de masse en mode tandem

Revue / Review article

Analyse des cannabinoïdes par spectrométrie de masse en mode tandem

Analysis of cannabinoids by tandem mass spectrometry

Marie Fabritius¹, Christian Staub², Christian Giroud*

Centre Universitaire Romand de Médecine Légale, Unité de Toxicologie et Chimie Forensiques, Rue du Bugnon 21, 1011 Lausanne, Switzerland

Résumé – Depuis quelques années, la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) ne cesse de gagner du terrain comme méthode d'analyse en toxicologie forensique, notamment pour le dosage des cannabinoïdes. Couplée à la chromatographie liquide (LC) ou gazeuse (GC), elle permet l'identification fiable et le dosage rapide du THC, de son précurseur acide, et de ses principaux métabolites, y compris les glucuronides. Au cours de ces dix dernières années, un nombre significatif de publications sont parues sur ce sujet. L'objectif de cet article est de passer en revue les analyses par spectrométrie de masse en tandem des cannabinoïdes dans diverses matrices biologiques.

Mots clés : Cannabinoïdes, spectrométrie de masse en tandem, matrice biologique, chromatographie

Abstract – In recent years, tandem mass spectrometry (MS/MS) is gaining ground as a reference method of analysis in clinical and forensic toxicology, especially for the determination of cannabinoids. Coupled to liquid chromatography (LC) or gas chromatography (GC), it allows the definitive identification and rapid determination of THC, its acid precursor, and its major metabolites, including the glucuronides. During the past decade, several methods of analysis of cannabinoids in different matrices have appeared on this subject. The aim of this paper is to review the analysis of cannabinoids by tandem mass spectrometry methods in various biological matrices.

Key words: Cannabinoids, tandem mass spectrometry, biological, matrices, chromatography

Reçu le 17 janvier 2011, accepté après modifications le 29 mars 2011
Publication en ligne le 15 juin 2011

1 Introduction

Le cannabis est l'une des drogues illégales les plus consommées au monde. Environ la moitié des jeunes ont déjà expérimenté le cannabis et 10 % des consommateurs le fument quotidiennement [1]. Le THC est également fréquemment détecté dans le sang de conducteurs impliqués dans un accident de circulation ou arrêtés en raison d'une conduite erratique. Le dosage des cannabinoïdes est donc d'une grande importance en toxicologie clinique et médico-légale. La molécule active du cannabis, le Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) et ses métabolites peuvent être détectés dans de nombreuses matrices biologiques (sang, cheveux, urine, salive...) après consommation de marijuana ou d'autres dérivés du cannabis. La spectrométrie de masse en mode tandem (MS/MS) couplée avec différentes techniques séparatives permet l'identification sans équivoque et le dosage rapide de ces cannabinoïdes. Le but de cet article est de répertorier et décrire les techniques d'analyses des can-

nabinoïdes par spectrométrie de masse en mode tandem appliquées à un large spectre de matrices biologiques et publiées au cours de cette dernière décennie. Dans une première partie, l'article traite des matrices biologiques utilisées. La préparation d'échantillons est abordée dans la seconde partie. Enfin la dernière partie traite des techniques analytiques par MS/MS.

Les références scientifiques mentionnées ont été recherchées à l'aide de PubMed, Web of Science et Google Scholar essentiellement sur la période 2000–2010.

Le tableau I résume les abréviations utilisées pour les principaux cannabinoïdes couramment détectés dans les matrices biologiques.

2 Étalons et étalons internes

La plupart des cannabinoïdes présentant un intérêt pharmacologique ou médico-légal significatif sont commercialement disponibles. Certains métabolites, comme l'acide 7-carboxy-cannabidiolique, le principal métabolite du CBD,

* Correspondance : Christian Giroud, christian.giroud@chuv.ch

Tableau I. Abréviations employées pour les cannabinoïdes.

Composé	Abréviation
Δ^9 -tetrahydrocannabinol	THC
Δ^8 -tetrahydrocannabinol	Δ^8 -THC
11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol	11-OH-THC
11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol	THCCOOH
Cannabinol	CBN
Cannabidiol	CBD
acide Δ^9 -tetrahydrocannabinolique	THC-A
Glucuronide	gluc

restent toutefois toujours commercialement indisponibles. Des synthèses à façon sont toujours possibles par le biais de certains laboratoires expérimentés.

L'ajout d'un étalon interne précède l'extraction et l'analyse quantitative des cannabinoïdes dans les matrices biologiques. Ces étalons internes sont en général des homologues deutérés des molécules analysées, dans la mesure où ils sont commercialement disponibles. Comme ces étalons contiennent des traces de molécules non deutérées, et aussi en raison de leur prix très élevé, la concentration ajoutée doit être aussi basse que possible. Plusieurs étalons, comme le THC-A ou le THC-gluc ne sont pas disponibles ou alors proposés à des prix exorbitants par un seul fournisseur. De plus, certains métabolites comme le THC-gluc se décomposent rapidement sitôt l'ampoule ouverte. En l'absence d'analogue deutéré, un analogue de structure présentant des propriétés physicochimiques voisines est sélectionné.

3 Matrices biologiques

La stabilité des analytes dans les échantillons biologiques est un paramètre critique à prendre en considération lors de l'interprétation des résultats d'analyse quantitative. En effet, le THC et ses dérivés sont des molécules qui sont sensibles à la lumière, à la chaleur, au pH et à l'oxydation [2]. Le THC peut s'isomériser (en Δ^8 -THC) et vraisemblablement aussi se polymériser. En outre, les dérivés du cannabis peuvent se lier aux glycoprotéines, notamment celles du sang [3]. Les dérivés conjugués comme les glucuronides et les sulfates peuvent être hydrolysés par voie enzymatique ou chimique. Enfin, les cannabinoïdes ont la propriété de s'adsorber à la surface des tubes de prélèvement [2]. Dans le sang natif, les cannabinoïdes sont fortement liés aux protéines plasmatiques. Des changements de la valeur de l'hématocrite ou affectant l'intégrité des protéines vont donc influencer sur la distribution des cannabinoïdes entre les différents compartiments sanguins. La stabilité des dérivés glucuronides semble dépendre de la température et de la nature du set de prélèvement. Des résultats contradictoires ont d'ailleurs été obtenus vis-à-vis des conditions optimales de stockage pour ces conjugués [4, 5]. Enfin, la dégradation des cannabinoïdes serait accélérée par la répétition des cycles de congélation/décongélation. Ces données montrent que les méthodes de prélèvement et de conservation des échantillons doivent être décrites de manière détaillée si l'on désire comparer les résultats d'analyses publiés dans la littérature scientifique ou obtenus lors de contrôles inter-laboratoires.

Les matrices biologiques présentent différentes fenêtres de détection et sont utiles comme indicateurs objectifs d'abus de drogues. Dans un article publié en 2002 sur l'utilisation de la salive et des cheveux pour le dépistage de stupéfiants, Samyn et coll. [6] présentent un tableau comparant les avantages et les inconvénients de 3 matrices biologiques (urine, salive et cheveux). Ainsi, pour la confirmation de l'abstinence d'usage de cannabis, l'analyse d'urine semble être très utile, puisque la présence de THCCOOH peut être détectée plusieurs jours, voire plusieurs semaines encore après consommation de marijuana. Par contre, les analyses de sang sont préférées pour rechercher une prise récente de cannabis et en évaluer les effets aigus sur le comportement et les performances [7]. L'analyse de la salive (fluide oral) présente un intérêt croissant car son prélèvement est moins invasif que celui du sang ou de l'urine. De plus la présence de THC dans la salive indique un usage récent du cannabis ; le THC reste en effet détectable dans cette matrice pendant quelques heures seulement après avoir fumé, la détection est même possible plus longtemps que dans le sérum [8]. L'origine du THC dans la salive est attribuée principalement à une contamination buccale survenue lors de la phase d'inhalation. Le transfert du THC et de ses métabolites du sang vers la salive apparaît comme extrêmement médiocre. Enfin, les cheveux présentent une fenêtre de détection beaucoup plus importante que le sang, la salive ou l'urine : selon la longueur des cheveux, une consommation régulière de marijuana remontant à plusieurs mois peut être mise en évidence par ce biais [7]. Cependant, contrairement aux drogues basiques, les cannabinoïdes présents dans le sang ne sont que médiocrement transférés dans la matrice capillaire si bien que les concentrations de THC y sont extrêmement faibles. De plus, les métabolites, en particulier le THCCOOH, sont encore plus mal absorbés dans les cheveux que la molécule parente. En conséquence, seules les méthodes les plus sensibles sont aptes à détecter la présence de cannabinoïdes dans les cheveux. Les concentrations élevées de THC, voire de THC-A qui sont mesurées juste après l'inhalation proviennent sans doute, comme pour la salive, d'une contamination environnementale dans le cas des cheveux [7]. La détection de métabolites du THC dans les cheveux, même à des concentrations extrêmement faibles procure sans doute une meilleure évidence d'une inhalation réelle de cannabis que la présence de THC, pouvant être issue d'une exposition passive.

3.1 Sang, plasma et sérum

3.1.1 Prélèvement

Le prélèvement de l'échantillon se fait de manière classique par ponction veineuse à l'aide d'une seringue et tube de collecte. Plusieurs millilitres sont ainsi collectés. Plus rarement, des échantillons artériels ou capillaires peuvent être prélevés. Les tubes contiennent en général un adjuvant pour stabiliser le sang et empêcher sa dégradation. Les adjuvants comme le mélange fluorure/EDTA freinent l'hydrolyse des xénobiotiques et empêchent la croissance bactérienne. Quelques études ont été menées sur les micro-volumes (typiquement moins de 100 μ L). C'est le cas de Thomas et coll. [9] qui présentent une méthode de désorption de spots de sang séchés

recueillis sur du papier buvard suivie de l'analyse par LC-MS/MS. Dans ce cas, une goutte de sang capillaire (5 μ L) est prélevée au bout du doigt et recueillie sur un papier buvard.

3.1.2 Préparation

Les échantillons sanguins ne nécessitent pas de prétraitement particulier avant l'extraction et l'analyse. Ils sont éventuellement centrifugés pour en récolter le sérum ou le plasma avant d'être stockés à 4 °C, -20 °C ou -80 °C en fonction du délai d'analyse.

3.1.3 Volume d'échantillon et concentrations habituellement mesurées

Le volume d'échantillon de sang nécessaire pour l'analyse des cannabinoïdes est habituellement de 1 mL. Pourtant, certains auteurs indiquent n'utiliser que 500 [10, 11] voire 200 ou 250 μ L [12, 13] avec des limites de quantification (LOQ) équivalentes à celles obtenues avec 1 mL d'échantillon.

La concentration de THC dans le sang complet est généralement inférieure à 20 ng/mL dans les échantillons réels [11, 14]. Pour le THCCOOH et le 11-OH-THC, les échantillons montrent des concentrations variant de 3 à 100 ng/mL et de 0,3 à 10 ng/mL respectivement. En ce qui concerne les échantillons de sérum, la concentration en THC est généralement inférieure à 70 ng/mL [15, 16]. La concentration en THCCOOH est habituellement comprise entre 5 et 300 ng/mL [15].

3.2 Urine

3.2.1 Prélèvement

Plusieurs dizaines de millilitres sont recueillies et aliquotées par le laboratoire en vue des analyses. Pour tenir compte du degré de dilution naturel de l'urine et d'une possible falsification par dilution, la concentration de la créatinine urinaire est mesurée et le rapport THCCOOH/créatinine calculé.

3.2.2 Préparation

De nombreux auteurs procèdent à une hydrolyse alcaline ou à une β -deglycuronidation avant l'extraction des composés [17-21]. Ceci permet de convertir les métabolites conjugués (glucuronides) en métabolites libres et de doser la totalité du composé. Le choix de la source de glucuronidase est déterminant, seules certaines enzymes étant capables d'hydrolyser les conjugués glucuronidés du THC. Ces deux méthodes d'hydrolyse ont été combinées pour déterminer de manière plus précise les concentrations de THC, 11-OH-THC et THCCOOH totaux dans l'urine [22]. La présence de dérivés sulfates nécessite l'emploi d'une arylsulfatase [23]. L'urine est sujette à contamination, dilution et adultération par ajout d'agents masquants, sans oublier que la substitution d'échantillon reste toujours possible. Pour ces raisons, on préfère parfois prélever d'autres échantillons moins facilement falsifiables tels que la salive ou les cheveux.

3.2.3 Volume d'échantillon et concentrations habituellement mesurées

Le volume habituel d'urine analysé est de 1 à 2 mL. Cependant, des résultats satisfaisants en terme de limites de détection (LOD < 0,5 ng/mL) et de quantification avec un volume d'échantillon de 500 μ L [20] voire avec seulement 200 μ L [17] sont mentionnés dans la littérature.

D'après les valeurs trouvées dans la littérature pour des échantillons réels [15, 24, 25], les concentrations habituellement obtenues pour le THCCOOH total varient entre 1 et 250 ng/mL. Cependant, des échantillons peuvent atteindre une concentration en THCCOOH de plus de 2000 ng/mL [24].

3.3 Cheveux

3.3.1 Prélèvement

Une mèche de cheveux est prélevée à l'arrière de la tête (vertex), au plus près possible du cuir chevelu. La période de temps investiguée dépend de la longueur des cheveux (environ 1 mois/cm). En général, on considère que des données quantitatives fiables peuvent être obtenues jusqu'à environ 6 mois.

3.3.2 Préparation

Que ce soit pour une analyse par GC ou LC-MS/MS, les cheveux sont d'abord décontaminés puis subissent une digestion alcaline avant l'extraction et l'analyse des cannabinoïdes [18, 26-33]. Ils sont mis en présence d'hydroxyde de sodium ou de potassium pendant quinze à soixante minutes et chauffés entre 75 et 100 °C [26-29, 31-33].

3.3.3 Quantité d'échantillon et concentrations habituellement mesurées

Dix à cinquante milligrammes sont nécessaires pour l'analyse des cannabinoïdes. Seuls Gambelunghe et coll. [28] préconisent l'analyse de 200 mg de cheveux.

Les analyses d'échantillons réels donnent les résultats suivants : pour le CBN et le CBD, les concentrations sont généralement comprises entre la limite de quantification et 300 pg/mg [28, 34]. En ce qui concerne le THC et le THCCOOH, les concentrations dans les cheveux varient entre 3 et 200 pg/mg et 0,1 et 10 pg/mg, respectivement [28, 29].

3.4 Salive / fluide oral

3.4.1 Prélèvement

Il existe différents kits de prélèvements salivaires [35]. Dans certains cas, il s'agit d'un bâtonnet de polypropylène avec un tampon en cellulose à l'extrémité (Statsure Saliva SamplerTM, Orasure Intercept[®], Immunalysis QuantisalTM). Le tampon est placé dans la bouche, sous la langue pendant quelques minutes. Il est ensuite placé dans un tube contenant

1 à 3 mL de tampon de conservation. Pour d'autres kits, le prélèvement s'effectue à l'aide d'un coton à mâcher pendant plusieurs minutes. Une fois le prélèvement effectué, il est placé dans un tampon (Cozart®) ou dans un tube de collecte pour être centrifugé (Sarstedt Salivette®). Le prélèvement d'une expectoration (Acro Biotech Salicule) ou avec une solution d'extraction (Greiner Bio-One) sont d'autres techniques de prélèvement salivaire. Les performances de ces différentes méthodes de prélèvement ont été comparées [35]. Le kit Sarstedt donne des résultats décevants en raison de la forte adsorption du THC sur le tampon de prélèvement. Des rendements d'extraction satisfaisants, voire excellents ont été publiés pour les kits avec liquide de conservation. Par exemple avec le Quantisal™, Moore et coll. [36] et Quintela et coll. [37] obtiennent des rendements d'extraction de 80–100 %. Cependant, des modes opératoires spécifiques sont recommandés pour le cannabis, comme par exemple laisser incuber le tampon dans son liquide pendant plusieurs heures (au moins 4 h) avant de procéder à son recueil et à l'analyse. Enfin, il convient de rappeler l'existence de kits commerciaux proposés sur le web et servant à masquer la présence de cannabinoïdes dans la salive [38]. Cependant, la spectrométrie de masse en tandem est certainement capable de détecter les fraudeurs malgré l'utilisation de tels kits.

3.4.2 Préparation

La salive ne nécessite pas un traitement particulier avant l'extraction des composés. Les échantillons sont stockés à -20 °C en attendant d'être analysés.

3.4.3 Volume d'échantillon et concentrations habituellement mesurées

Le volume de fluide oral nécessaire pour les investigations toxicologiques est de quelques centaines de microlitres (100 à 500 µL). Comme la salive est souvent diluée par le liquide de conservation des kits de prélèvements, un volume 4 à 5 fois plus important est couramment analysé. Comme la prise de cannabis diminue la salivation et assèche la bouche [39], la collecte de salive peut s'avérer difficile. L'effet inhibiteur pourrait être influencé par le système endocannabinoïde [40].

Des prélèvements salivaires effectués lors d'études [25, 41, 42] ont permis de montrer que la concentration en THC et THCCOOH dans la salive varie généralement entre 0,5 et 200 ng/mL pour le THC, entre 10 et 100 pg/mL pour le THCCOOH libre et entre 100 et 300 pg/mL pour le THCCOOH total (libre + conjugué). Cependant, certains échantillons prélevés peu de temps après avoir fumé peuvent dépasser 350 ng de THC/mL [42].

3.5 Autres matrices alternatives

Le méconium collecté après la naissance permet la recherche de drogue pendant environ les 20 semaines qui précèdent la naissance. En cas de suspicion d'exposition à un toxique survenue après la naissance, le lait maternel et les cheveux du nouveau-né peuvent être investigués.

Une étude a été réalisée sur le méconium [43] : un screening de drogues a été effectué par extraction liquide-liquide et LC-MS/MS. Une autre étude a également été développée avec les mêmes techniques pour l'analyse de cannabinoïdes dans le cerveau de souris [44].

Quelques méthodes ont également été mises au point par GC-MS pour le méconium [45–49], la sueur [50] ou l'humeur vitrée [51]. En ce qui concerne ces dernières matrices alternatives, des méthodes par spectrométrie de masse en mode tandem sont manquantes.

Il pourrait être intéressant de se concentrer sur du plasma ou le cordon ombilical en complément du méconium pour établir un transfert du cannabis de la mère à l'enfant.

3.5.1 Préparation

Les échantillons d'humeur vitrée et de méconium subissent une hydrolyse alcaline avant l'extraction.

3.5.2 Quantité d'échantillon

Pour les analyses de méconium, les auteurs utilisent 1 g d'échantillon, à l'exception de Ristimaa et coll. [43] qui a développé une méthode avec 2 g d'échantillon.

Dans le cas de la sueur, des patchs sont appliqués sur la peau et changés chaque jour ou chaque semaine [50].

3.6 Composés, matrices et seuils de concentration

La plupart des analytes peut être retrouvée dans toutes les matrices pourvu qu'une méthode suffisamment sensible ait été appliquée. Cependant, leurs proportions relatives sont dépendantes de la matrice investiguée. Le tableau II donne un rapide aperçu de la présence des cannabinoïdes dans chaque matrice biologique.

Plusieurs sociétés savantes ont établi des directives ou des recommandations en ce qui concerne les seuils de concentrations limites. Certaines de ces valeurs ont été reprises par des organismes étatiques officiels. En septembre 2006, un groupe de travail de l'ICADTS dont la mission était d'établir des recommandations consensuelles dans le secteur de la recherche sur les drogues illégales et la conduite automobile a établi une liste de substances à tester qui mentionne les seuils de concentrations limites et les matrices biologiques à investiguer (sang complet, salive). Les experts de ce groupe qui émanaient de 9 pays et 3 continents étaient patronnés par plusieurs organisations nationales et internationales (ICADTS, EMCDDA, TIAFT, SFTA). Ces valeurs ont été reprises par le Centre national d'information sur la santé mentale américain (SAMHSA) et l'Institut National sur l'Abus de drogue (NIDA). En ce qui concerne les cheveux, la société d'analyse des cheveux (SoHT) a établi ses propres recommandations pour les valeurs seuils. Pour les concentrations dans le sérum ou le plasma, qui diffèrent de celles du sang complet, la société allemande de toxicologie et chimie forensiques (GTFCh) a également publié ses propres recommandations. Ces valeurs sont énumérées dans

Tableau II. Les analytes couramment mesurés en fonction de la matrice biologique.

Matrice	Composés présents dans la matrice
Fluide oral	essentiellement THC, THCCOOH en traces
Sang	THC, 11-OH-THC, THCCOOH
Plasma	THC, 11-OH-THC, THCCOOH, THCCOOH-gluc
Sérum	THC-A, THC, 11-OH-THC, THCCOOH, THCCOOH-gluc
Urine	principalement THCCOOH et THCCOOH-gluc, CBN, CBD, THC-A
Cheveux	THC, CBN, CBD, THCCOOH en traces
Méconium	THCCOOH

Tableau III. Valeurs seuils recommandées par diverses sociétés savantes pour les cannabinoïdes dans plusieurs matrices biologiques.

		Urine	Sang complet	Sérum Plasma	Cheveux	Salive	Sueur
THC	ICADTS*		1 ng/mL			2 ng/mL	
	SAMHSA		1 ng/mL			2 ng/mL	1 ng/patch
	GTFCh			1 ng/mL	0,02 ng/mg		
	SoHT				0,1 ng/mg		
	OFROU		1,5 ng/mL				
11-OH-THC	ICADTS*		1 ng/mL				
	SAMHSA		1 ng/mL				
	GTFCh						
	SoHT						
	OFROU						
THCCOOH	ICADTS*		5 ng/mL				
	SAMHSA	15 ng/mL	5 ng/mL				
	GTFCh	10 ng/mL		10 ng/mL			
	SoHT				0,2 pg/mg		
	OFROU						
	NIDA					10 pg/mL	

- *Consensus du groupe de travail initié par l'ICADTS (Conseil international sur l'alcool, la drogue et la sécurité routière) rédigé en 2006 au centre européen de l'Université Tufts à l'ancien monastère bénédictin de Talloires en France. Pour l'urine, les valeurs indiquées correspondent au THCCOOH total mesuré après hydrolyse alors que pour les autres matrices, il s'agit des cannabinoïdes libres.
- La valeur limite pour le THCCOOH dans la salive est suggérée d'après une publication de l'équipe de M. Huestis du NIDA (2010).

le tableau III synoptique. Les valeurs techniques légales définies en Suisse par l'Office Fédéral des Routes (OFROU) pour le sang complet y figurent aussi. Un compte rendu critique de cette problématique en rapport avec le cannabis et la conduite automobile a été publié récemment par Wille et coll. en 2010.

3.7 Préparation

3.7.1 Extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide (LLE) est principalement utilisée pour les échantillons de fluide oral [25, 42, 52–56] et occasionnellement pour le sang [11, 12, 18], l'urine [21], les cheveux [31], le méconium ou le cerveau (souris) [44]. Le mélange de solvant habituellement employé pour l'extraction des cannabinoïdes est un mélange hexane : acétate d'éthyle (9 : 1) [11, 12, 18, 25, 54] ou heptane : acétate d'éthyle (1 : 4) [31, 43, 52, 53]. Quelques auteurs privilégient un solvant unique comme l'hexane [42], le méthanol [55] ou l'acétonitrile [44]. Le THCCOOH-gluc qui est pourtant une molécule plus polaire est extrait de l'urine par l'éther diisopropylique avant d'être analysé par LC-MS/MS [10].

Les rendements d'extraction obtenus sont trop peu souvent mentionnés. Les quelques valeurs relevées dans la littérature

varient entre 40 et 100 % selon la méthode d'analyse et les molécules d'intérêt.

3.7.2 Extraction sur phase solide

L'extraction sur phase solide (SPE) est couramment utilisée pour les échantillons sanguins (sang complet, plasma, sérum) [4, 10, 14–16, 21, 57, 58] et urinaires [15, 20, 59–61]. Certains auteurs l'utilisent également pour les cheveux [28, 29, 32] ou le fluide oral [41, 62–64].

Dans le cas des échantillons d'urine, Fernandez et coll. [20], Robandt et coll. [60] et Jagerdeo et coll. [59] mentionnent l'emploi d'une phase C8. Pour les autres matrices, les phases employées sont des phases mixtes (Oasis HLB, Bond Elut Certify ou Cerex Polychrom).

Les rendements obtenus avec cette technique d'extraction varient entre 35 et 90 % suivant la matrice biologique et les composés à extraire.

3.7.3 Micro-extraction sur phase solide

À notre connaissance, une seule méthode a été développée avec une micro-extraction sur phase solide (SPME).

Ainsi, pour l'analyse du THC, du CBN et du CBD dans les cheveux, Emidio et coll. [27] ont mis au point une méthode head-space (HS)-SPME. Les rendements d'extraction sont faibles (<10 %), mais combinée à la chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse en tandem, Emidio obtient des limites de détection satisfaisantes comprises entre 7 et 31 pg/mg de cheveux.

3.7.4 Autres méthodes de préparation

Quelques autres méthodes d'extraction ont également été développées pour les cannabinoïdes. L'extraction dynamique sur phase solide (SPDE) [30] ou la micro-extraction en phase liquide (LPME) [26] ont été utilisées pour doser ces composés dans les cheveux. Cependant, les résultats obtenus ne sont pas très satisfaisants, car les rendements d'extraction sont souvent très faibles (<10 %) comparés à ceux que l'on peut obtenir avec une SPE ou une LLE.

Pour l'analyse du THCCOOH et éventuellement d'autres composés (autres drogues ou THCCOOH-gluc) dans l'urine, certains auteurs simplifient la préparation de l'échantillon et procèdent à une dilution avant l'injection directe en LC-MS/MS. Le méthanol est le solvant le plus employé : seul [24] ou mélangé à de l'eau (80 : 20) [19] ou encore à une solution d'acide formique (50 : 50) [17].

4 Chromatographie gazeuse – spectrométrie de masse en tandem

La chromatographie gazeuse semble être une méthode de choix pour l'analyse des cannabinoïdes dans les cheveux, mais elle est également utilisée pour l'analyse des autres matrices.

Le tableau IV répertorie les différentes matrices biologiques et présente les méthodes d'extraction et d'analyse employées selon les molécules d'intérêt. Le THC et le THCCOOH dans les cheveux et la salive sont les composés les plus fréquemment investigués par des techniques de GC-MS/MS. Le mode d'ionisation préféré est l'impact électronique. Les quantités d'échantillons prélevées sont moindres que celles habituellement collectées en cas d'analyse MS simple. Enfin les sensibilités (LOD) et les limites inférieures de quantification rapportées à ce jour varient considérablement, allant de 1 à 100 pg/mg pour les cheveux et de 10 pg/mL à 2,5 ng/mL pour les fluides biologiques.

4.1 Dérivation

La dérivation permet l'analyse de composés qui ne peuvent pas être directement analysés en GC (molécules thermiquement instables, température d'ébullition trop élevée...). Dans le cas des cannabinoïdes, la silylation et l'alkylation sont les deux méthodes de dérivation utilisées pour les cannabinoïdes. Pour la silylation, les réactifs employés sont le N-triméthylsilylimidazole (TMSI) [29], le N-méthyl-N-triméthylsilyltrifluoroacétamide (MSTFA) [28, 30] ou le N, O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide et triméthylchlorosilane

(BSTFA + TMCS) [25, 63]. Pour l'alkylation, les auteurs utilisent l'anhydride pentafluoropropionique (PFPA) [29, 31, 33], l'hexafluoro-2-propanol (HFIP) [11, 29] et/ou l'anhydride trifluoroacétique (TFAA) [11]. L'addition de groupes halogénés accroît de manière considérable la détectabilité des molécules par ionisation chimique en mode négatif. Cinq méthodes différentes de dérivation ont été comparées par Szirmai et coll. [65] pour l'analyse du THCCOOH.

Pourtant, la dérivation n'est pas toujours nécessaire pour l'analyse de certains cannabinoïdes et des auteurs choisissent de les analyser directement après l'extraction en GC-MS/MS [18, 26, 27, 41].

4.2 Colonne

Les colonnes GC utilisées lors de l'analyse de cannabinoïdes sont exclusivement des colonnes capillaires en silice fondue à phase stationnaire en poly-diméthylsiloxane avec 5 % de phenyl (DB-5MS, VF-5MS). En général, une colonne longue de 30 m est préconisée pour l'analyse des cheveux, alors qu'une colonne plus courte, allant de 12 à 15 m est employée pour les autres échantillons.

4.3 Mode d'ionisation

4.3.1 Impact électronique

Le mode d'ionisation par impact électronique (EI) a été employé pour toutes les matrices biologiques mais avec des succès divers. Par exemple, les résultats obtenus dans l'urine et le sang par Chiarotti et Costamagna [18] sont peu satisfaisants puisqu'ils obtiennent une LOQ de 5 ng/mL pour le THCCOOH. Pour les cheveux, les résultats sont également variables : les limites de quantification sont comprises entre 1 et 200 pg/mg selon les molécules [26, 27, 30]. Le mode d'ionisation utilisé pour la salive est rarement explicité. Seuls Chi et Cole [63] spécifient l'utilisation de l'impact électronique pour ce type de matrice et obtiennent une limite de détection de 0,2 ng/mL pour le THC. On peut supposer qu'en l'absence de toute indication, c'est l'EI qui a été utilisée.

4.3.2 Ionisation chimique

L'ionisation chimique (CI) peut être utilisée en mode positif avec du méthane [29] ou en mode négatif également avec du méthane [11, 31, 33] ou de l'ammoniac [41]. Dans les deux cas, les limites de détection et de quantification semblent meilleures que celles obtenues par EI. Dans le sang, Day et coll. [41] et Thomas et coll. [11] obtiennent des valeurs de LOQ très basses en comparaison de celles de Chiarotti et Costamagna [18] (respectivement 10 et 500 pg/mL par rapport au 5 ng/mL). Pour les cheveux, Huestis et coll. [29] mentionnent une LOQ de 1 pg/mg pour le THC et de 0,1 pour le THCCOOH en ionisation chimique positive. À l'opposé, Marsili et coll. [31] décrivent une LOD bien plus élevée (50 pg/mg) pour le THCCOOH avec la même technique d'ionisation.

Tableau IV. Analyse des cannabinoïdes par GC-MS/MS.

Composés	Matrice	Quant. éch.	Préparation	Dérivation	Colonne	Détection	LOD, LOQ, domaine	Réf.
THC, 11-OH-THC, THCCOOH	S	500 µL	Acide, LLE (hexane : acétate d'éthyle 9 : 1)	Chloroforme, TFEA, HFIP	DB-5MS, 15 m x 0,25 mm, 0,25 µm	CI- mode MS/MS	LOQ : 0,5, 0,5 et 2,5 ng/mL Linéarité : 0,5-20 et 2,5-200 ng/mL	[11]
THCCOOH	U, S, C	1 mL ou 50 mg	Hydrolyse alcaline, LLE (hexane : acétate d'éthyle 9 : 1)	BSTFA	5 % phenyl-methyl- silicone 12 m x 0,32 mm, 0,33 µm	EI mode MS/MS	Calibration : 5-50 ng/mL	[18]
THC, CBN, CBD	C	10 mg	Hydrolyse alcaline, HF-LPME		VF-5MS 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm	EI mode MS/MS	LOQ : 20, 1 et 1 pg/mg Linéarité : LOQ - 500 pg/mg	[26]
THC, CBN, CBD	C	10 mg	Hydrolyse alcaline, HS SPME		VF-5MS 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm	EI mode MS/MS	LOD : 31, 11 et 7 pg/mg LOQ : 62, 30 et 12 pg/mg Linéarité : 0,1-8 ng/mg	[27]
THC, CBN, CBD, THCCOOH	C	200 mg	Digestion alcaline, SPE (Bond Elut Certify)	MSTFA-NH ₄ -DTE	CCP-SIL 8CB-MS 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm	EI mode MS/MS	Calibration : 10-5000 pg/mg	[28]
THC THCCOOH	C	20 mg	Digestion alcaline, SPE (Cerex polychrome)	TMSI et acétate d'éthyle ou HFIP et PFPA	DB-5MS 15 m x 0,25 mm, 1 µm	CI+ MS/MS	LOQ : 1 et 0,1 pg/mg Linéarité : 1-100 et 0,1-25 pg/mg	[29]
THC, CBN, CBD	C	10 mg	Hydrolyse alcaline, SPDE	MSTFA	DB-5MS 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm	EI, SIM et MRM	LOD : 40, 51 et 52 pg/mg LOQ : 137, 216 et 187 pg/mg Linéarité : 0,05 ou 0,1-20 ng/mg	[30]
THCCOOH	C	50 mg	Hydrolyse LLE (heptane : acétate d'éthyle 9 : 1)	Pentafluoro- propanol + PFPA	Non indiquée 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm	CI- mode MS/MS	LOD : 50 pg/mg LOQ : 100 pg/mg Calibration : 0-1000 pg/mg	[31]
THCCOOH	C	25 mg	Hydrolyse alcaline, LLE (hexane : acétate d'éthyle 9 : 1)	Pentafluoro- propanol + PFPA	DB-5MS 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm	CI-, MRM	LOD : 0,02 pg/mg LOQ : 0,05 pg/mg Linéarité : 0,1-10 pg/mg	[33]
THC	O	200 µL	Hydrolyse alcaline, LLE (hexane : acétate d'éthyle 9 : 1)	BSTFA (1 % TMCS) + acétate d'éthyle	5 % phenyl-methyl silicone, 15 m x 0,25 mm	Non indiqué	LOQ : 0,2 ng/mL	[25]
THC	O	200 µL	SPE (HyperSpe Verify AX)	BSTFA	Non indiquée 15 m x 0,25 mm, 0,25 µm	EI MRM	LOD : 0,2 ng/mL Linéarité : 0,2-20 ng/mL	[63]
THCCOOH	O	100 µL	SPE (Cerex polychrome)	HFIP + PFPA	J&W DB-5 15 m x 0,25 mm, 1 µm	Mode négatif	LOQ : 10 pg/mL domaine : 10-240 pg/mL	[41]

Matrice : C : cheveu, U : urine, S : sang, O : fluide oral.
Détection : CI : ionisation chimique, EI : impact électronique.
Dérivation : NH₄F : iodure d'ammonium, DTE : dithioerythritol.

4.4 Validation de méthode

4.4.1 Identification et quantification

Dans la majorité des travaux, le mode MRM ou MS/MS est sélectionné. Deux transitions sont choisies selon des critères d'abondance et de sélectivité, l'une servant à la quantification et l'autre à l'identification [11, 26, 27, 29, 30, 41, 63].

4.4.2 Sélectivité

La sélectivité de la méthode est établie de deux façons : en analysant des échantillons blancs, afin de s'assurer qu'aucune interférence ne perturbe la détection des composés [11] ou en analysant des échantillons dopés avec des composés susceptibles d'être présents dans l'échantillon (autres drogues, médicaments) [41].

5 Chromatographie liquide-spectrométrie de masse en tandem

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) est une technique fréquemment utilisée pour l'analyse du THC et de ses métabolites dans les échantillons biologiques. En 2005, Marquet a rédigé un article très complet présentant la théorie et l'instrumentation de cette technique [66].

Le tableau synoptique V regroupe les méthodes de dosage des cannabinoïdes par LC-MS/MS publiées au cours de cette dernière décennie dans 30 articles. Ce tableau indique que l'approche analytique par LC-MS/MS a été appliquée à la plupart des matrices biologiques. Si dans la salive, seule la molécule parente (THC) est en général quantifiée, l'analyse porte sur une batterie de cannabinoïdes lorsque les dérivés du sang ou l'urine sont concernés. Cinq articles proposent des méthodes pour la détermination du THCCOOH-glucuronide et un seul considère l'analyse du précurseur du THC, à savoir le THC-A. Cette dernière molécule qui devrait pourtant être présente dans les cheveux contaminés par la fumée de cannabis n'est jamais analysée dans cette matrice par LC-MS/MS. Le CBN qui pourrait être utilisé comme marqueur de dégradation du THC est rarement investigué (par 4 publications). Il en va de même pour le CBD qui présente pourtant un intérêt certain en raison de son potentiel thérapeutique largement étudié et de sa possible conversion en THC dans le liquide gastrique [67]. Les méthodes d'extraction se partagent à presque égalité entre la SPE et la LLE (respectivement 16 et 12). Quelques méthodes proposent pour l'urine l'approche plus directe « diluer et injecter ». L'ionisation par ESI en mode positif est largement plébiscitée. Sur 30 articles revus, seuls 3 font appel à l'APCI dont 2 en mode positif et 1 seul en mode négatif. Aucun gain substantiel de sensibilité ne semble être obtenu en substituant l'APCI à l'ESI, que ce soit en mode positif ou négatif. Relevons que peu de travaux mentionnent l'utilisation de la photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI) pour l'analyse des cannabinoïdes [68].

5.1 Choix des colonnes

La plupart des analyses en chromatographie liquide a été réalisée avec des pompes classiques HPLC. Cependant, quelques auteurs ont bénéficié de pompes capables de travailler à des pressions très élevées, largement au-dessus du seuil maximum des pompes classiques (400 bars) [4, 19, 52, 62]. Ces pompes "UPLC" permettent l'emploi de colonnes à faible granulométrie (<2 µm) facilitant l'analyse des composés dans un laps de temps réduit généralement de l'ordre de 5 min [19, 52]. Relevons que les pics chromatographiques obtenus par UPLC pour les cannabinoïdes sont extrêmement fins, de l'ordre d'une dizaine de secondes contre une demi-minute pour les colonnes classiques, permettant ainsi un gain de sensibilité appréciable.

Pour l'analyse des cannabinoïdes, les colonnes C18 sont les plus couramment utilisées, bien qu'il soit possible de séparer les métabolites du cannabis avec une colonne C12 [21] ou une C8 [10, 16, 17]. Deux méthodes ont également été mises au point avec une colonne de type phenylhexyl pour le dosage du THC-A [15] ou d'une série de plusieurs cannabinoïdes (THC, 11-OH-THC, THCCOOH et THCCOOH-gluc) [58]. Les longueurs de colonne sont habituellement de 50 [14, 15, 19, 32, 53, 57-60, 64], 100 [4, 13, 20, 43, 52, 56, 62] ou 150 mm [10, 12, 16, 17, 24, 42, 54]. Quelques auteurs ont cependant choisi une colonne de 250 mm pour un screening [55] ou à l'opposé, une colonne de 20 mm pour l'analyse du THCCOOH uniquement [61].

5.2 Phase mobile

Les cannabinoïdes sont en général élués au moyen d'un gradient de polarité formé par des concentrations croissantes d'un solvant organique (acétonitrile ou méthanol). L'éluant est tamponné avec un tampon formate ou acétate d'ammonium acidifié avec 0,1 à 0,2 % d'acide formique. Plusieurs méthodes font abstraction de l'emploi d'un tampon [14, 19, 20, 59, 60].

La séparation des cannabinoïdes n'est pas toujours aisée : le 11-OH-THC et le THCCOOH sont souvent coélusés, en particulier lorsque le pH d'élution est bas. Cependant, un pH soigneusement ajusté à des valeurs plus élevées permet leur séparation. Par exemple, avec un pH de respectivement 8,6 et de 6,5, Coulter et coll. [57] et Maralikova et Weinmann [58] parviennent à séparer ces 2 métabolites du cannabis avec un intervalle de temps de 1,5 à 2 min.

5.3 Mode d'ionisation

5.3.1 Électrospray

L'ionisation par électrospray (ESI) est la méthode de choix pour le couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse en tandem. Essentiellement utilisée en mode positif pour l'analyse des cannabinoïdes, elle est parfois utilisée en mode négatif pour l'analyse d'un métabolite particulier comme le THC-A [15] ou le THCCOOH [17] qui sont des molécules acides (pK de 4,5 pour le THCCOOH) contrairement aux autres qui sont des molécules basiques (pK de 10,6 pour le THC).

Tableau V. Analyse des cannabinoïdes par LC-MS/MS.

Composés	Matrice	Quant. éch.	Préparation	Colonne	Phase mobile	Détection	LOD, LOQ, domaine	Ref.
THC	O	500 µL	SPE (Oasis HLB)	Atlantis dC18 3µm phase inverse (50 × 2,1 mm)	A : ACN B : H ₂ O + 0,1 % FA	ESI+, MRM	LOQ : 1 ng/mL Linéarité : 1–200 ng/mL	[64]
THC	O	200 mg	SPE (Bond Elut Certify)	Acquity UPLC HSS T3 C18 100 × 2,1 mm, 1,8 µm	A : NH ₄ Ac 2 mM B : MeOH	ESI+, MRM	LOQ : 0,5 µg/kg Domaine : 0,5–100 µg/kg	[62]
THC	O	500 µL	LLE acétate d'éthyle : heptane (4 : 1)	Waters Atlantis dC18 2,1 × 50 mm, 3,5 µm	A : ACN B : NH ₄ Ac 5 mM pH 5	ESI+, MRM	LOQ : <0,16 ng/mL Calibration : 1,6–16 ng/mL	[53]
THC	O	100 ou 500 µL	pH = 6–7 LLE hexane	X'Terra MS C18 150 × 2,1 mm, 3,5 µm	Isocratique : 1 mM formate d'ammonium : MeOH (10 : 90)	ESI+, MRM	LOQ : 0,1 ou 0,5 ng/mL domaine : 0,1–10 ou 0,5–100 ng/mL	[42]
THC	O	400 µL	LLE heptane : acétate d'éthyle (1 : 4)	Acquity UPLC BEH C18 100 × 2,1 mm, 1,7 µm	A : H ₂ O + 2 mM carbonate d'ammonium pH 9,3 B : MeOH	ESI+, MRM	LOQ : 1 ng/mL Linéarité : 1–200 ng/mL	[52]
THC	O	600 µL	LLE Tox tubes A	Waters Atlantis T3 100 × 2,1 mm, 3 µm	A : ACN : 2 mM formate d'ammonium (95 : 5) B : 2 mM formate d'ammonium : ACN (95 : 5)	ESI+, MRM	LOD : 0,4 ng/mL LOQ : 1,1 ng/mL Linéarité : 1–200 ng/mL	[56]
THC	O	1 mL	LLE isopropanol : DCM : heptane (10 : 25 : 65)	X'Terra MS C18 100 × 2,1 mm, 3,5 µm	A : tampon formate pH 3 B : ACN	ESI+, MRM	LOQ : 2 ng/mL ; Calibration : 2–100 ng/mL	[69]
THC, THCCOOH	O	500 µL	LLE hexane : acétate d'éthyle (9 : 1)	X'Terra C18 MS 150 × 2,1 mm, 3,5 µm	A : 10 mM Formate d'ammonium B : MeOH	ESI+	LOD : 0,05 et 0,2 ng/mL LOQ : 0,1 et 0,5 ng/mL Linéarité : LOQ-100 ng/mL	[54]
THC, THCCOOH	O, P	150 µL	LLE (MeOH)	Reversed phase C18 Alltima, 250 × 4,6 mm, 5 µm	A : ACN B : H ₂ O	ESI+, MRM	LOQ (P) : 5 et 4,3 ng/mL LOQ (O) : 3,7 et 3,5 ng/mL Linéarité : LOQ-100 ng/mL	[55]
THC, 11-OH-THC, THCCOOH, CBN, CBD	P	1 mL	SPE (Bond Elut Certify)	Synergi MAX-RP 80A C12 2 × 7,5 mm, 4 µm	A : 10 mM formate d'ammonium B : ACN : 10 mM formate d'ammonium 9 : 1	APCI+	LOQ : 0,2 ng/mL Calibration : 0,2–100 ng/mL	[21]
THC, 11-OH-THC, THCCOOH, THCCOOH-gluc	P	1 mL	SPE (Chromabond C18)	Luna phenylhexyl 50 × 2 mm, 3 µm	A : NH ₄ Ac 5 mM (pH 6,5) B : ACN	ESI+ MRM	LOQ : 0,8, 0,8 et 4,3 ng/mL Linéarité : LOQ-100 ou 500 ng/mL	[58]

Tableau V. Suite.

Composés	Matrice	Quant. éch.	Préparation	Colonne	Phase mobile	Détection	LOD, LOQ, domaine	Ref.
THC, THCCOOH	S	1 mL	SPE (Fluoro-C10)	Imtakt US C18 50 × 2 mm, 5 µm	A : H ₂ O + 0,1 % FA B : ACN + 0,1 % FA	MRM +/-	LOQ : 0,25 ng/mL Linéarité : 0,25–50 ng/mL	[14]
THC, 11-OH-THC, THCCOOH	S	1 mL	SPE (Bond Elut Certify)	Acquity UPLC BEH C18 100 × 2,1 mm, 1,7 µm	A : 0,1 % HCOOH B : ACN	ESI+, MRM	LOQ : 0,05, 0,1 et 0,2 ng/mL Linéarité : LOQ-50 ng/mL	[4]
THC, 11-OH-THC, THCCOOH	S	250 µL	LLE (hexane : acétate d'éthyle 90 : 10)	XBridge C18 150 × 2,1 mm, 3,5 µm	Isocratique : MeOH : 0,1 % FA (80 : 20)	ESI+	LOQ : 0,5, 1 et 2 ng/mL Linéarité : LOQ-40 et LOQ-160 ng/mL	[12]
THC, 11-OH-THC, THCCOOH	S	200 µL	SPE on line (Polar RP)	Luna C8 100 × 2 mm, 3 µm	A : H ₂ O 0,1 % FA B : ACN 0,2 % FA	ESI+, SRM	LOD : 0,18, 0,18, 0,85 ng/mL LOQ : 0,44, 0,45, 2,0 ng/mL Linéarité : 0,5–20 ng/mL (THC) 2,5–100 µg/ml (11-OH-THC, THCCOOH)	[13]
THC, 11-OH-THC, THCCOOH	S	1 mL	SPE (Cerex)	narrow-bore Zorbax C18 50 × 2,1 mm, 1,8 µm	A : formate d'ammonium 20 mM pH 8,6 B : MeOH	ESI+	LOQ : 0,5, 2 et 4 ng/mL Linéarité : LOQ-100 ng/mL	[57]
THC-A	U, Sérum	1 mL	SPE (Chromabond C18)	Luna phenylhexyl 50 × 2 mm, 3 µm	A : NH ₄ Ac 5 mM B : ACN	ESI-MRM	LOQ (U) : 5 ng/mL LOQ (Sérum) : 7,5 ng/mL Linéarité : LOQ-75 ou 100 ng/mL	[15]
THC, 11-OH-THC, THCCOOH, CBD, CBN	U	1 mL	SPE on line (C8-encapped)	XTerra MS C18 50 × 3 mm, 5 µm	A : H ₂ O 0,1 % FA B : ACN 0,1 % FA	ESI+ MRM	LOQ : 8, 6, 6, 9 et 12 ng/mL Quantification : LOQ-500 ng/mL	[59]
THCCOOH	U	3 mL	Automated SPE (C8 EC-SE)	Xbridge C8 50 × 2,1, 3,5 µm	A : ACN B : H ₂ O + 0,2 % FA	ESI+ MRM	LOQ : 2 ng/mL Calibration : 7–2000 ng/mL	[60]
THCCOOH	U	2 mL	SPE (Chromabond C18 encapped)	XTerra MS C18 3,9 × 20 mm, 3,5 µm	A : 1 mM formate d'ammonium, 0,1 % FA B : MeOH	APCI-	LOD : 2,0 ng/mL LOQ : 5,1 ng/mL Calibration : 0–500 ng/mL	[61]
THC, 11-OH-THC, THCCOOH, CBD, CBN	U	2,5 mL	β-glucuronidase, LLE diéthyle : acétate d'éthyle (50 : 50)	MAX-RP 80A C12 2 × 7,5 mm, 4 µm	A : 10 mM formate d'ammonium pH 3 B : ACN : 10 mM formate d'ammonium 9 : 1	APCI+	LOQ : CBN : 3 ; THC, CBD et THCCOOH : 1 ; 11-OH-THC : 2 ng/mL Calibration : 0,2–100 ng/mL	[21]
THCCOOH	U	500 µL	β-glucuronidase, dilution eau-MeOH (80 : 20)	Zorbax Eclipse XBD-C18 50 × 4,6 mm, 1,8 µm	A : H ₂ O + 0,1 % FA B : ACN + 0,1 % FA	ESI+ SRM	Cut-off : 20 ng/mL Calibration : 0–75 ng/mL	[19]

Tableau V. Suite.

Composés	Matrice	Quant. éch.	Préparation	Colonne	Phase mobile	Détection	LOD, LOQ, domaine	Réf.
THCCOOH	U	200 µL	NaOH, dilution MeOH/HAc (1 : 1)	Zorbax RX-C8 150 × 2,1 mm, 5 µm	A : H ₂ O/0,001 % acide acétique, 1 mM NH ₄ Ac B : MeOH/0,001 % acide acétique, 1 mM NH ₄ Ac	ESI+/-	LOD : <0,5 ng/mL LOQ : 7,5 ng/mL Calibration : 5-40 ng/mL	[17]
THCCOOH-gluc	U	500 µL	Dilution MeOH	Synergi polar 150 × 2 mm, 4 µm	A : H ₂ O + 0,01 % FA B : MeOH C : ACN	ESI+ MS/MS	LOD : 5 ng/mL LOQ : 10 ng/mL Calibration : 5-1000 ng/mL	[24]
THCCOOH	U	500 µL	Hydrolyse, on line-SPE (HySphere C8)	Atlantis dC18, 100 × 3 mm, 3 µm	Isocratique : 0,1 % FAH : ACN (20 : 80)	ESI+ MRM	LOD : 0,25 ng/mL LOQ : 5 ng/mL Linéarité : 5-200 ng/mL	[20]
THCCOOH-gluc	U	500 µL	LLE (éther diisopropylique)	Zorbax Eclipse XBD C8 150 × 2,1 mm, 5 µm	ACN-MeOH-NH ₄ Ac 20 mM, pH 4,0 (41 : 41 : 18)	ESI+	LOD : 1,4 ng/mL LOQ : 6,0 et 6,6 ng/mL Linéarité : 10-500 ng/mL	[10]
THCCOOH-gluc	P	500 µL	SPE (HF Bond Elut Certify)	Zorbax Eclipse XBD C8 150 × 2,1 mm, 5 µm	ACN-MeOH-NH ₄ Ac 20 mM, pH 4,0 (41 : 41 : 18)	ESI+	LOD : 0,6 et 1,1 ng/mL LOQ : 2,4 et 4,5 ng/mL Linéarité : 10-500 ng/mL	[10]
THCCOOH-gluc	Sérum	500 µL	SPE (HF Bond Elut Certify)	Zorbax Eclipse XBD C8 150 × 2,1 mm, 5 µm	ACN-MeOH-NH ₄ Ac 20 mM, pH 4,0 (41 : 41 : 18)	ESI+	LOD : 1,1 ng/mL	[16]
THCCOOH	M	2 g	LLE (MeOH) puis LLE (heptane : acétate d'éthyle)	Phenomenex Genesis C18 100 × 2,1 mm, 4 µm	A : NH ₄ Ac 10 mM pH 3,2 B : ACN	ESI+	LOD : 20 ng/g	[43]
THC	C	20 mg	SPE (Cerex Polychrom)	narrow-bore Zorbax C18 50 × 2,1 mm, 1,8 µm	A : 20 mM formate d'ammonium pH 8,6 B : MeOH	ESI+	LOQ : 10 pg/mg Linéarité : 10-1000 pg/mg	[32]
CBD, THC, 11-OH-THC, THCCOOH, CBC	B (souris)	0,35-0,47 g	LLE (acétonitrile)	Zorbax Eclipse XDB-C18 4,6 × 75 mm, 3,5 µm	Isocratique : H ₂ O : MeOH (10 : 90) 0,1 mM formate d'ammonium	ESI+ MRM	LOQ (THC, 11-OH-THC, THCCOOH) : 1 ng/g LOQ (CBD, CBC) : 0,5 ng/g Linéarité : LOQ-20 ou 200 ng/g	[44]

Matrice : O : fluide oral, P : plasma, S : sang, U : urine, C : cheveux, M : méconium, B : cerveau.
Phase mobile : DCM : dichlorométhane, FA : acide formique, ACN : acétonitrile, MeOH : méthanol, NH₄Ac : acétate d'ammonium.
Détection : ESI : ionisation par électrospray, APCT : ionisation chimique à pression atmosphérique.
Composé : CBC : cannabichromène.

De plus, l'ESI est souvent associée à une détection MRM (Multiple Reaction Monitoring) sur des appareils à triple quadripôles, ce qui permet d'augmenter la sensibilité et la sélectivité. Les LOQ obtenues sont ainsi en général inférieures ou égales à 1 ng/mL pour la salive et les échantillons sanguins. Pour l'urine, les limites de quantification varient entre 1 et 10 ng/mL.

5.3.2 Ionisation chimique à pression atmosphérique

L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) n'est pas aussi souvent utilisée que l'ESI pour l'analyse des cannabinoïdes. Pourtant, que ce soit en mode positif [21] ou négatif [61], l'APCI permet d'obtenir des résultats satisfaisants puisque les limites de quantification obtenues dans ce cas varient entre 1 et 5 ng/mL. Ces valeurs sont cependant légèrement supérieures aux valeurs que l'on peut obtenir avec l'ionisation par électrospray.

5.3.3 Autres modes d'ionisation

Certains fournisseurs proposent une source PhotoSpray® (APPI) pour l'ionisation des composés ce qui permet une meilleure ionisation des composés légèrement polaires (Poster n° 42 de ABSSci). Hughes et coll. [68] ont comparé les performances respectives de l'APCI, de l'ESI et l'APPI pour l'analyse du THC, du 11-OH-THC et du THCCOOH dans le sang. La sensibilité était améliorée lorsque l'APCI remplaçait l'ESI comme mode d'ionisation. Le THC était détecté de manière plus sensible en mode positif alors que le mode négatif était préférable pour les autres cannabinoïdes. L'APPI était 3 à 5 fois plus sensible pour les 3 cannabinoïdes. Il pourrait donc être intéressant de tester et de développer une méthode analytique pour les cannabinoïdes avec ce mode d'ionisation pour d'autres matrices biologiques que le sang.

5.4 Validation de méthode

5.4.1 Identification

Dans presque la totalité des travaux, le mode MRM est sélectionné. Deux transitions sont mesurées, l'une servant à la quantification et l'autre à l'identification. Le rapport signal sur bruit doit être supérieur ou égal à 3 (LOD), avec un critère d'acceptation pour les rapports ioniques inférieur ou égal à 30 % et une déviation du temps de rétention inférieure à 3,5 % par rapport à celle du contrôle correspondant [12].

5.4.2 Effets de matrice

Afin de mettre à jour d'éventuels effets de matrices, des échantillons blancs sont extraits, puis dopés avec les analytes et analysés par LC-MS/MS. Les résultats obtenus sont alors comparés à ceux obtenus lors d'injection directe de standards [4, 12, 55]. Les résultats obtenus sont variables : entre 6 et 25 % de réduction du signal selon les auteurs et les composés.

6 Expérience personnelle

La GC-MS en mode tandem a notre préférence quand il s'agit de déterminer les concentrations des trois cannabinoïdes majeurs (THC, 11-OH-THC, THCCOOH). Nous donnons la priorité aux dérivés halogénés combinés au mode d'ionisation chimique négative qui permet d'atteindre les limites de quantification les plus basses [11]. Pour des analyses de routine moins exigeantes, une analyse en GC-MS/MS après ionisation par impact électronique des dérivés silylés est satisfaisante (limite inférieure de quantification voisine du ng/mL). Si on veut élargir la palette des cannabinoïdes investigués aux métabolites conjugués et à d'autres dérivés polaires, la LC-MS en mode tandem est la méthode de prédilection. Toutefois, seuls les équipements les plus sensibles permettent d'atteindre les valeurs seuils les plus basses. Un choix particulier devra aussi être apporté à la sélection de la méthode d'extraction qui aura une influence déterminante sur la sensibilité du processus analytique. Pour l'heure, il faut bien avouer qu'il existe une grande variété de méthodes d'extraction proposées et qu'aucune ne semble sortir du lot. Une méthode générale s'appliquant à l'ensemble des cannabinoïdes est aussi manquante.

7 Conclusion

La spectrométrie de masse en tandem est une technique qui se popularise rapidement en raison de l'amélioration combinée des performances et de la baisse de prix. De nombreuses publications récentes ont démontré son utilité pour la détermination des cannabinoïdes dans des matrices biologiques variées. Lorsqu'elle est associée à la chromatographie en phase gazeuse ou la chromatographie liquide à haute pression, elle rend possible la mesure du THC et de ses métabolites dans des domaines de concentrations qui sont en rapport avec les effets du THC. L'augmentation de la sensibilité des appareillages permet d'injecter directement un échantillon d'urine dilué dans un LC-MS/MS, sans dérivation préalable, ce qui simplifie grandement l'analyse de cette matrice.

Dans le proche futur, des méthodes encore plus versatiles, capables d'analyser une batterie de cannabinoïdes caractérisés par des propriétés physicochimiques variées seront sans doute développées. L'effort de recherche se déplacera sans doute des cannabinoïdes naturels vers les cannabinoïdes de synthèse dont l'usage pourrait se répandre dans la population [70]. L'automatisation des phases d'extraction et leur couplage direct avec les appareillages MS/MS devrait permettre un gain de temps appréciable dans la préparation et l'analyse des cannabinoïdes. Des solutions innovantes sont de plus en plus proposées. L'une d'elles est la technique d'extraction automatisée sur pointes de pipettes jetables (DPX) contenant un gel de silice monolithique, une autre pourrait être l'extraction automatisée de microvolumes de sang séché sur buvard, ou encore la chromatographie d'affinité avec les polymères à empreinte moléculaire (MIPs) [71]. En ce qui concerne les interfaces, la photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI) devrait trouver avec les molécules apolaires que sont les cannabinoïdes de synthèse ou naturels un nouveau champ d'application [72]. La sensibilité des filtres de masses qui s'est accrue

de manière spectaculaire avec la mise à disposition des quadripôles triples récents, des systèmes hybrides, des trappes 3D et 2D comme l'Orbitrap™ ou encore les analyseurs à temps de vol (TOF) [73] devrait faciliter la détection des cannabinoïdes de synthèse les plus actifs. Enfin, il est intéressant de mentionner la mise sur le marché de colonnes HPLC avec des particules à noyau dur, mais recouverte d'une couche à faible porosité (colonnes de type Kinetex de Phenomenex ou Poroshell de Agilent). Ces colonnes permettent de réduire les effets de la diffusion d'Eddy (terme A de l'équation de Van Deemter) et ainsi d'augmenter l'efficacité de la séparation par rapport à des colonnes complètement poreuses sans avoir besoin d'un équipement de type UPLC.

Remerciements. Les auteurs remercient le Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique (FNS 320030_127507/1) et la Faculté de Biologie et Médecine de l'Université de Lausanne (projet multidisciplinaire FBM) pour leur soutien financier.

Conflit d'intérêt. Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

- Giroud C, Bollmann M, Thomas A, Mangin P, Favrat B. Cannabis: what are the risks? *Ann Toxicol Anal.* 2009; 20(4): 183-205.
- Garrett ER, Hunt CA. Physicochemical properties, solubility, and protein binding of delta9-tetrahydrocannabinol. *J Pharm Sci.* 1974; 63(7): 1056-1064.
- Spahn-Langguth H, Benet LZ. Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism? *Drug Metab Rev.* 1992; 24(1): 5-47.
- Jamey C, Szwarc E, Tracqui A, Ludes B. Determination of cannabinoids in whole blood by UPLC-MS-MS. *J Anal Toxicol.* 2008; 32(5): 349-354.
- Schwilke EW, Schwoppe DM, Karschner EL, Lowe RH, Darwin WD, Kelly DL, Goodwin RS, Gorelick DA, Huestis MA. Delta9-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC plasma pharmacokinetics during and after continuous high-dose oral THC. *Clin Chem.* 2009; 55(12): 2180-2189.
- Samyn N, Areschka A, Kintz P. Place of oral fluid and hair for workplace drug testing. *Ann Toxicol Anal.* 2002; 14(1): 33-42.
- Musshoff F, Madea B. Review of biologic matrices (urine, blood, hair) as indicators of recent or ongoing cannabis use. *Ther Drug Monit.* 2006; 28(2): 155-163.
- Toennes SW, Ramaekers JG, Theunissen EL, Moeller MR, Kauert GF. Pharmacokinetic properties of delta9-tetrahydrocannabinol in oral fluid of occasional and chronic users. *J Anal Toxicol.* 2010; 34(4): 216-221.
- Thomas A, Deglon J, Steimer T, Mangin P, Daali Y, Staub C. On-line desorption of dried blood spots coupled to hydrophilic interaction/reversed-phase LC/MS/MS system for the simultaneous analysis of drugs and their polar metabolites. *J Sep Sci.* 2010; 33(6-7): 873-879.
- Skopp G, Potsch L. Stability of 11-nor-delta(9)-carboxy-tetrahydrocannabinol glucuronide in plasma and urine assessed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2002; 48(2): 301-306.
- Thomas A, Widmer C, Hopfgartner G, Staub C. Fast gas chromatography and negative-ion chemical ionization tandem mass spectrometry for forensic analysis of cannabinoids in whole blood. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 45(3): 495-503.
- Del Mar Ramirez Fernandez M, De Boeck G, Wood M, Lopez-Rivadulla M, Samyn N. Simultaneous analysis of THC and its metabolites in blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008; 875(2): 465-470.
- König S, Aebi B, Lanz S, Gasser M, Weinmann W. On-line SPE LC-MS/MS for the quantification of Delta9-tetrahydrocannabinol (THC) and its two major metabolites in human peripheral blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 400(1): 9-16.
- Elian AA, Hackett J. Solid-phase extraction and analysis of THC and carboxy-THC from whole blood using a novel fluorinated solid-phase extraction sorbent and fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2009; 33(8): 461-468.
- Jung J, Kempf J, Mahler H, Weinmann W. Detection of Delta9-tetrahydrocannabinolic acid A in human urine and blood serum by LC-MS/MS. *J Mass Spectrom.* 2007; 42(3): 354-360.
- Skopp G, Potsch L. Cannabinoid concentrations in spot serum samples 24-48 h after discontinuation of cannabis smoking. *J Anal Toxicol.* 2008; 32(2): 160-164.
- Chebbah C, Pozo OJ, Deventer K, Van Eenoo P, Delbeke FT. Direct quantification of 11-nor-Delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry in relation to doping control analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2010; 24(8): 1133-1141.
- Chiarotti M, Costamagna L. Analysis of 11-nor-9-carboxy-delta(9)-tetrahydrocannabinol in biological samples by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC/MS-MS). *Forensic Sci Int.* 2000; 114(1): 1-6.
- Eichhorst JC, Etter ML, Rousseaux N, Lehotay DC. Drugs of abuse testing by tandem mass spectrometry: a rapid, simple method to replace immunoassays. *Clin Biochem.* 2009; 42(15): 1531-1542.
- Fernandez Mdel M, Wille SM, Samyn N, Wood M, Lopez-Rivadulla M, De Boeck G. On-line solid-phase extraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for high throughput analysis of 11-nor-Delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009; 877(22): 2153-2157.
- Grauwiler SB, Scholer A, Drewe J. Development of a LC/MS/MS method for the analysis of cannabinoids in human EDTA-plasma and urine after small doses of Cannabis sativa extracts. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007; 850(1-2): 515-522.
- Schwilke EW, Gullberg RG, Darwin WD, Chiang CN, Cadet JL, Gorelick DA, Pope HG, Huestis MA. Differentiating new cannabis use from residual urinary cannabinoid excretion in chronic, daily cannabis users. *Addiction.* 2010; 106(3): 499-506.
- Kemp P, Abukhalaf IK, Manno JE, Manno BR, Alford DD, McWilliams ME, Nixon FE, Fitzgerald MJ, Reeves RR, MJ W. Cannabinoids in humans. II. The influence of three methods of hydrolysis on the concentration of THC and two metabolites in urine. *J Anal Toxicol.* 1995; 19: 292-298.
- Felli M, Martello S, Chiarotti M. LC-MS-MS method for simultaneous determination of THCCOOH and THCCOOH-

- glucuronide in urine: Application to workplace confirmation tests. *Forensic Sci Int.* 2010; 204(1-3): 67-73.
25. Niedbala RS, Kardos KW, Fritch DF, Kardos S, Fries T, Waga J, Robb J, Cone EJ. Detection of marijuana use by oral fluid and urine analysis following single-dose administration of smoked and oral marijuana. *J Anal Toxicol.* 2001; 25(5): 289-303.
 26. Emidio ES, de Menezes Prata V, de Santana FJ, Dorea HS. Hollow fiber-based liquid phase microextraction with factorial design optimization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for determination of cannabinoids in human hair. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2010; 878(24): 2175-2183.
 27. Emidio ES, Prata V de M, Dorea HS. Validation of an analytical method for analysis of cannabinoids in hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2010; 670(1-2): 63-71.
 28. Gambelunghe C, Rossi R, Ferranti C, Bacci M. Hair analysis by GC/MS/MS to verify abuse of drugs. *J Appl Toxicol.* 2005; 25(3): 205-211.
 29. Huestis MA, Gustafson RA, Moolchan ET, Barnes A, Bourland JA, Sweeney SA, Hayes EF, Carpenter PM, Smith ML. Cannabinoid concentrations in hair from documented cannabis users. *Forensic Sci Int.* 2007; 169(2-3): 129-136.
 30. Lachenmeier DW, Kroemer L, Musshoff F, Madea B. Application of tandem mass spectrometry combined with gas chromatography and headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of drugs of abuse in hair samples. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003; 17(5): 472-478.
 31. Marsili R, Martello S, Felli M, Fiorina S, Chiarotti M. Hair testing for delta9-THC-COOH by gas chromatography/tandem mass spectrometry in negative chemical ionization mode. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005; 19(11): 1566-1568.
 32. Coulter C, Taruc M, Tuyay J, Moore C. Quantitation of tetrahydrocannabinol in hair using immunoassay and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Drug Test Anal.* 2009; 1(5): 234-239.
 33. Kim JY, In MK. Determination of 11-nor-Delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using gas chromatography/tandem mass spectrometry in negative ion chemical ionization mode. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2007; 21(7): 1339-1342.
 34. Skopp G, Strohbeck-Kuehner P, Mann K, Hermann D. Deposition of cannabinoids in hair after long-term use of cannabis. *Forensic Sci Int.* 2007; 170(1): 46-50.
 35. Langel K, Engblom C, Pehrsson A, Gunnar T, Ariniemi K, Lillsunde P. Drug testing in oral fluid-evaluation of sample collection devices. *J Anal Toxicol.* 2008; 32(6): 393-401.
 36. Moore C, Vincent M, Rana S, Coulter C, Agrawal A, Soares J. Stability of Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC) in oral fluid using the Quantisal collection device. *Forensic Sci Int.* 2006; 164(2-3): 126-130.
 37. Quintela O, Crouch DJ, Andrenyak DM. Recovery of drugs of abuse from the Immunoanalysis Quantisal oral fluid collection device. *J Anal Toxicol.* 2006; 30(8): 614-616.
 38. Document consulté le 20 décembre sur le site <http://www.alwaystestclean.com>.
 39. Grotenhermen F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokinet.* 2003; 42(4): 327-360.
 40. Prestifilippo JP, Fernandez-Solari J, Medina V, Rettori V, Elverdin JC. Role of the endocannabinoid system in ethanol-induced inhibition of salivary secretion. *Alcohol Alcohol.* 2009; 44(5): 443-448.
 41. Day D, Kuntz DJ, Feldman M, Presley L. Detection of THCA in oral fluid by GC-MS-MS. *J Anal Toxicol.* 2006; 30(9): 645-650.
 42. Laloup M, Ramirez Fernandez Mdel M, Wood M, De Boeck G, Henquet C, Maes V, Samyn N. Quantitative analysis of delta9-tetrahydrocannabinol in preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2005; 1082(1): 15-24.
 43. Ristimaa J, Gergov M, Pelander A, Halmesmaki E, Ojanpera I. Broad-spectrum drug screening of meconium by liquid chromatography with tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 398(2): 925-935.
 44. Poklis JL, Thompson CC, Lichtman AH, Poklis A. Disposition of cannabichromene, cannabidiol and delta-9-tetrahydrocannabinol and its metabolites in mouse brain following marijuana inhalation determined by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2010; 34: 516-520.
 45. Coles R, Clements TT, Nelson GJ, McMillin GA, Urry FM. Simultaneous analysis of the Delta9-THC metabolites 11-nor-9-carboxy-Delta9-THC and 11-hydroxy-Delta9-THC in meconium by GC-MS. *J Anal Toxicol.* 2005; 29(6): 522-527.
 46. ElSohly MA, Feng S. delta 9-THC metabolites in meconium: identification of 11-OH-delta 9-THC, 8 beta,11-diOH-delta 9-THC, and 11-nor-delta 9-THC-9-COOH as major metabolites of delta 9-THC. *J Anal Toxicol.* 1998; 22(4): 329-335.
 47. Feng S, ElSohly MA, Salamone S, Salem MY. Simultaneous analysis of delta9-THC and its major metabolites in urine, plasma, and meconium by GC-MS using an immunoaffinity extraction procedure. *J Anal Toxicol.* 2000; 24(6): 395-402.
 48. Marchei E, Pellegrini M, Pacifici R, Palmi I, Lozano J, Garcia-Algar O, Pichini S. Quantification of Delta9-tetrahydrocannabinol and its major metabolites in meconium by gas chromatographic-mass spectrometric assay: assay validation and preliminary results of the "meconium project". *Ther Drug Monit.* 2006; 28(5): 700-706.
 49. Moore C, Lewis D, Becker J, Leikin J. The determination of 11-nor-delta 9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCCOOH) in meconium. *J Anal Toxicol.* 1996; 20(1): 50-51.
 50. Huestis MA, Scheidweiler KB, Saito T, Fortner N, Abraham T, Gustafson RA, Smith ML. Excretion of Delta9-tetrahydrocannabinol in sweat. *Forensic Sci Int.* 2008; 174(2-3): 173-177.
 51. Lin DL, Lin RL. Distribution of 11-nor-9-carboxy-Delta9-tetrahydrocannabinol in traffic fatality cases. *J Anal Toxicol.* 2005; 29(1): 58-61.
 52. Goessaert AS, Pil K, Veramme J, Verstraete A. Analytical evaluation of a rapid on-site oral fluid drug test. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 396(7): 2461-2468.
 53. Oiestad EL, Johansen U, Christophersen AS. Drug screening of preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2007; 53(2): 300-309.
 54. Quintela O, Andrenyak DM, Hoggan AM, Crouch DJ. A validated method for the detection of Delta 9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-Delta 9-tetrahydrocannabinol in oral fluid samples by liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2007; 31(3): 157-164.
 55. Sergi M, Bafile E, Compagnone D, Curini R, D'Ascenzo G, Romolo FS. Multiclass analysis of illicit drugs in plasma and oral fluids by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2009; 393(2): 709-718.

56. Simoes SS, Ajenjo AC, Franco JM, Vieira DN, Dias MJ. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the qualitative and quantitative analysis of illicit drugs and medicines in preserved oral fluid. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2009; 23(10): 1451-1460.
57. Coulter C, Miller E, Crompton K, Moore C. Tetrahydrocannabinol and two of its metabolites in whole blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2008; 32(8): 653-658.
58. Maralikhova B, Weinmann W. Simultaneous determination of Delta9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-Delta9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-Delta9-tetrahydrocannabinol in human plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2004; 39(5): 526-531.
59. Jagerdeo E, Montgomery MA, Karas RP, Sibum M. A fast method for screening and/or quantitation of tetrahydrocannabinol and metabolites in urine by automated SPE/LC/MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 398(1): 329-338.
60. Robandt PV, Klette KL, Sibum M. Automated solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of 11-nor-Delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human urine specimens: application to a high-throughput urine analysis laboratory. *J Anal Toxicol.* 2009; 33(8): 456-460.
61. Weinmann W, Goerner M, Vogt S, Goerke R, Pollak S. Fast confirmation of 11-nor-9-carboxy-Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) in urine by LC/MS/MS using negative atmospheric-pressure chemical ionisation (APCI). *Forensic Sci Int.* 2001; 121(1-2): 103-107.
62. Badawi N, Simonsen KW, Steentoft A, Bernhoft IM, Linnet K. Simultaneous screening and quantification of 29 drugs of abuse in oral fluid by solid-phase extraction and ultraperformance LC-MS/MS. *Clin Chem.* 2009; 55(11): 2004-2018.
63. Chi E, Cole J. Detecting Marijuana in Saliva. *Forensic Magazine.* 2010; 7(5): 17-20.
64. Concheiro M, de Castro A, Quintela O, Cruz A, Lopez-Rivadulla M. Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2008; 391(6): 2329-2338.
65. Szirmai M, Beck O, Stephansson N, Halldin MM. A GC-MS study of three major acidic metabolites of delta 1-tetrahydrocannabinol. *J Anal Toxicol.* 1996; 20(7): 573-578.
66. Marquet P. LC-MS and LC-MS/MS theory and instruments applicable to toxicology. *Ann Toxicol Anal.* 2005; 17(1): 5-12.
67. Watanabe K, Itokawa Y, Yamaori S, Funahashi T, Kimura T, Kaji T, Usami N, Yamamoto I. Conversion of cannabidiol to delta-9-tetrahydrocannabinol and related cannabinoids in artificial gastric juice, and their pharmacological effects in mice. *Forensic Toxicol.* 2007; 25: 16-21.
68. Hughes J, Andrenyak D, Crouch D, Slawson M. Abstract : Comparison of LC-MS Ionization Techniques for Cannabinoid Analysis in Blood. *J Anal Toxicol.* 2003; 27: 191.
69. Simonin J, Salquebre G, Cirimele V, Kintz P. Screening for illicit drugs in oral fluid by LC-MS/MS. *Ann Toxicol Anal.* 2007; 19(2): 141-150.
70. Uchiyama N, Kikura-Hanajiri R, Ogata J, Goda Y. Chemical analysis of synthetic cannabinoids as designer drugs in herbal products. *Forensic Sci Int.* 2010; 198(1-3): 31-38.
71. Kumazawa T, Hasegawa C, Lee X, Sato K. New and unique methods of solid-phase extraction for use before instrumental analysis of xenobiotics in human specimens. *Forensic Toxicol.* 2010; 28: 61-68.
72. Robb DB, Blades MW. State-of-the-art in atmospheric pressure photoionization for LC/MS. *Anal Chim Acta.* 2008; 627(1): 34-49.
73. Hudson S, Ramsey J, King L, Timbers S, Maynard S, Dargan PI, Wood DM. Use of high-resolution accurate mass spectrometry to detect reported and previously unreported cannabinomimetics in "herbal high" products. *J Anal Toxicol.* 2010; 34(5): 252-260.

III.2.2. Littérature postérieure à l'article de revue

Depuis 2010, de nombreux articles scientifiques traitant de l'analyse des cannabinoïdes par MS/MS ont été publiés.

Il ressort de ces nouvelles publications que la LC-MS/MS est devenue une méthode de choix pour l'analyse des cannabinoïdes dans le sang [61-63], les spots de sang séché [64], le plasma [65, 66], le sérum [67] ou encore la bile [68, 69]. La quantification des cannabinoïdes dans la salive grâce à cette technique est aussi le sujet de nombreux articles [70-78]. En particulier, la détermination et la quantification du THCCOOH seul dans le fluide oral est le thème de plusieurs publications [79-81]. La LC-MS/MS est également la méthode utilisée par certains auteurs pour l'analyse de plusieurs cannabinoïdes dans l'urine [82-84] ou dans les cheveux [85-89].

La GC-MS/MS est plébiscitée lorsqu'il s'agit d'analyser le THCCOOH dans l'urine [90, 91] ou les cheveux [92-94]. Cette technique convient parfaitement pour des analyses de routine et permet d'obtenir des résultats relativement sensibles pour le THCCOOH dans ces deux matrices. Cependant, pour la détermination d'un plus grand nombre de composés, y compris le THC-A et les conjugués glucuronides, la LC-MS/MS est la méthode de prédilection.

Cette recherche bibliographique nous a permis de sélectionner la meilleure stratégie possible pour développer une méthode sensible pour le dosage des cannabinoïdes dans la salive. En effet, il ressort de la recherche bibliographique que l'analyse par LC-MS/MS est la plus largement utilisée pour la détermination des cannabinoïdes dans la salive. De plus l'ionisation par électrospray (ESI) en mode positif est largement plébiscitée par les différents auteurs répertoriés pour l'analyse du THC dans le fluide oral. Les limites de quantification obtenues sont toutes de l'ordre du ng/mL, voire encore plus basses (centaine de pg/mL), suggérant que la technique retenue est sensible pour l'analyse du THC. Enfin, il apparaît qu'au cours des années 2000-2010, la plupart des travaux sur la salive sont concentrés sur le THC, négligeant son

précurseur, ses métabolites et d'autres cannabinoïdes mineurs. Il a donc semblé intéressant de développer une méthode d'analyse pour le THC, mais englobant aussi d'autres composés comme le THCCOOH, le 11-OH-THC, le cannabinoïde (CBN), le CBD ou encore le THC-A.

III.3. Développement d'une méthode d'analyse par LC-MS/MS pour le fluide oral

Afin de quantifier les cannabinoïdes dans la salive, nous avons développé une méthode LC-MS/MS pour le THC, ses métabolites libres et conjugués, son précurseur, le CBN et le CBD. La méthode s'appuie sur la recherche bibliographique qui a montré que le THC est détectable à des concentrations importantes dans le fluide oral [95, 96]. Par contre, le THCCOOH est présent en très faibles concentrations dans cette matrice, avec des valeurs de l'ordre du ng/mL voire plus faibles [97]. La méthode développée doit donc être très sensible, en particulier pour le THCCOOH. La validation a été faite selon les lignes directrices de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) [58, 59]. Deux techniques d'extraction (liquide-liquide (LLE) ou sur phase solide (SPE)) présentant chacune ses propres avantages ont été utilisées : la LLE permet l'extraction du THCCOOH à des très faibles concentrations (inférieures à 100 pg/mL), alors que la SPE est la seule permettant l'analyse des glucuronides. Cette méthode analytique a ensuite été appliquée aux échantillons de l'étude clinique cannabis / fMRI / conduite automobile. Les résultats ont révélé que les conjugués glucuronides sont présents en trop faible concentration dans la salive pour être détectés par cette méthode. Des essais d'hydrolyse chimique et enzymatique ont alors été menés. Les résultats indiquent que les conjugués glucuronides du THC et du THCCOOH pourraient être dégradés dans le fluide oral *in situ* avant qu'il soit collecté et analysé. Une autre hypothèse avancée dans l'article suggère que les conjugués pourraient être que faiblement excrétés dans le fluide oral. La combinaison de ces deux mécanismes pourrait expliquer pourquoi ces métabolites relativement polaires ne sont pas présents dans la salive en concentrations significatives.

III.3.1. Article : Analysis of cannabinoids in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Analysis of cannabinoids in oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Marie Fabritius · Christian Staub · Patrice Mangin · Christian Giroud

Received: 9 July 2012 / Accepted: 14 October 2012 / Published online: 20 November 2012
© Japanese Association of Forensic Toxicology and Springer Japan 2012

Abstract A sensitive method was developed for quantifying a wide range of cannabinoids in oral fluid (OF) by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). These cannabinoids include Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (11-OH-THC), 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCCOOH), cannabinol (CBN), cannabidiol (CBD), Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (THC-A), 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinolic glucuronide (THCCOOH-gluc), and Δ^9 -tetrahydrocannabinolic glucuronide (THC-gluc). Samples were collected using a QuasipipTM device. The advantages of performing a liquid–liquid extraction (LLE) of KCl-saturated OF using heptane/ethyl acetate versus a solid-phase extraction (SPE) using HLB copolymer columns were determined. Chromatographic separation was achieved in 11.5 min on a KinetexTM column packed with 2.6- μ m core-shell particles. Both positive (THC, 11-OH-THC, CBN, and CBD) and negative (THCCOOH, THC-gluc, THCCOOH-gluc, and THC-A) electrospray ionization modes were employed with multiple reaction monitoring using a high-end AB Sciex API 5000TM triple quadrupole LC–MS/MS system. Unlike SPE, LLE failed to extract THC-gluc and THCCOOH-gluc. However, the LLE method was more sensitive for the detection of THCCOOH than the SPE method, wherein the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) decreased from 100 to 50 pg/ml and from 500 to 80 pg/ml,

respectively. The two extraction methods were successfully applied to OF samples collected from volunteers before and after they smoked a homemade cannabis joint. High levels of THC were measured soon after smoking, in addition to significant amounts of THC-A. Other cannabinoids were found in low concentrations. Glucuronide conjugate levels were lower than the method's LOD for most samples. Inclusion studies suggest that glucuronides could be enzymatically degraded by glucuronidase prior to OF collection.

Keywords Tetrahydrocannabinol · Cannabinoids · Oral fluid · Saliva · Tandem mass spectrometry · Beta-glucuronidase

Introduction

Cannabis is one of the most widely used illicit drugs in the world. It is often implicated in forensic cases, such as drug-addiction deaths, driving under the influence of drugs, accidents, and others. The major psychoactive constituent of cannabis smoke is Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC). THC is frequently detected in the blood of drivers involved or killed in traffic accidents or suspected of driving while impaired. Impairment can result in a loss of tracking ability, attention, reaction time, hand–eye coordination, vigilance, and perception of time and distance [1]. Therefore, sensitive and accurate methods for determining whether someone is under the influence of cannabis are necessary. One may also need to determine whether the use of cannabis occurred shortly before a legally significant event. To this end, one approach could be the detection of cannabinoids in oral fluid (OF). OF is a mixture of saliva from the salivary glands, mucosal cells, bacteria, and food debris containing several hydrolysis enzymes.

M. Fabritius · C. Staub · C. Giroud (✉)
Forensic Toxicology and Chemistry Unit,
University Center of Legal Medicine, Rue du Bugnon 21,
1011 Lausanne, Switzerland
e-mail: christian.giroud@chuv.ch

P. Mangin
Unit of Forensic Medicine, University Center of Legal Medicine,
Rue du Bugnon 21, 1011 Lausanne, Switzerland

THC is sequestered in the oral cavity during cannabis smoking. After smoking, much lower concentrations of THC are transferred from the plasma to the oral fluid [2]. Therefore, the measurement of high levels of THC in OF strongly suggests recent cannabis use and indicates that the smoker is under the influence of cannabis. This assumption can be confirmed with a second-stage blood analysis. The advantages of using OF over other matrices for monitoring cannabis consumption were recently detailed by Choo and Huestis [2]: OF offers noninvasive collection and a reduced risk of adulteration. Furthermore, collection can be performed without medical supervision and is less objectionable to patients. However, there is a significant issue with OF collection for cannabis testing because the drug is known to cause dry mouth, and for this reason, the specimen volume may be limited [3]. Several cannabinoids have been detected in OF, but apart from THC, they have always been found in low concentrations, especially the metabolites of THC. Because THC can also be detected after passive exposure, the detection of THC metabolites (e.g., 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol, THCCOOH) indicative of active smoking is of prime importance [4]. Cannabinol (CBN), the primary degradation product of THC, and cannabidiol (CBD), another component of cannabis smoke, have also been detected in OF [5–7]. The incubation of saliva with glucuronidase enzymes resulted in an increase in the concentrations of free cannabinoids, suggesting that significant levels of conjugated metabolites are also present in this matrix. The question of whether Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (THC-A), the pyrolytic precursor of THC, can be used as a marker of active and recent cannabis smoking remains to be answered [8]. Furthermore, it is useful to distinguish between a therapeutic ingestion of THC (e.g., Sativex[®], Marinol[®]) and the inhalation of a cannabis joint. In this context, it has been shown that THC was not detected in OF when capsules of Marinol[®] were rapidly swallowed [7], however it is unclear if the same applies to capsules that are chewed before being swallowed.

Several methods have been proposed for the analysis of cannabinoids in alternative matrices (bile, meconium) [9–17] as well as in oral fluid [18–28]. To our knowledge, none allows the sensitive quantification of a broad range of molecules, including the acid precursors, metabolites, and the conjugates. The aim of this study was to devise an analytical method for the rapid and unequivocal determination of THC, 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (11-OH-THC), THCCOOH, THC-A, CBN, CBD, 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol, glucuronide (THCCOOH-gluc), and Δ^9 -tetrahydrocannabinol glucuronide (THC-gluc) in OF samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). To this end, we used an unconventional Kinetex[™] [29, 30] column packed

with 2.6- μm core–shell particles coupled with a high-end and sensitive AB Sciex Triple Quadrupole API 5000[™] mass spectrometer. Two types of extraction methods—liquid–liquid (LLE) and solid-phase (SPE) extraction—were tested with the goal of measuring the free cannabinoids and glucuronide conjugates concentrations and to achieve subnanogram range detection levels. Whatever the conditions tested, the LLE method failed to extract the glucuronide conjugates from the OF collected using the Quantisal[™] device. A more versatile SPE technique was therefore developed to analyze the entire panel of cannabinoids.

Experimental

Chemicals and materials

THC, 11-OH-THC, THCCOOH, CBN, CBD, THC-A, THCCOOH-gluc, and the internal standards THC- d_3 , 11-OH-THC- d_3 , and THCCOOH- d_6 were purchased from Cerilliant (Round Rock, TX, USA). THC-gluc was obtained from ElSohly Laboratories (Oxford, MS, USA). Cannabichromene (CBC) was purchased from BGB Analytik (Boeckten, Switzerland).

Oasis HLB (3 cc/60 mg) extraction cartridges were purchased from Waters (Baden, Switzerland). Acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). All other chemicals were puriss grade. Drug-free OF was composed of a mixture of OF samples obtained by spitting from several coworkers who had fasted and did not consume cannabis.

OF was collected with the Quantisal[™] device (nal von minden GmbH, Regensburg, Germany), which consists of an absorptive cellulose pad mounted on a polypropylene stem. The volume indicator turns blue when an adequate volume ($1.0 \pm 10\%$ ml) is collected. The pad was then placed into a plastic tube containing 3 ml of buffer. As recommended by the supplier, the tube was capped and left at room temperature overnight and then stored at -80°C prior to analysis. Moore et al. [31] recommended storing the OF samples in the Quantisal[™] collection device under refrigeration to inhibit THC degradation. For better preservation, the Quantisal[™] devices were stored at -80°C prior to analysis.

Preparation of standard solutions

Individual stock solutions of 10 $\mu\text{g/ml}$ THC, THCCOOH, THC-A, CBD, and CBN and 1 $\mu\text{g/ml}$ THCCOOH-gluc, 11-OH-THC, and THC-gluc were diluted with methanol to prepare calibration standards for LLE and SPE methods. Individual intermediate stock solutions containing 200 and

10 ng/ml of each cannabinoid were prepared in methanol and stored at -20°C . A specific solution of THCCOOH was prepared at a concentration of 1 ng/ml in methanol for the LLE method. In addition, a 2 ng/ml solution of THCCOOH- d_9 and a 100 ng/ml solution of THC- d_3 and 11-OH-THC- d_3 were prepared for the LLE method. A 100- μl aliquot of the THCCOOH- d_9 solution and 50 μl of the THC- d_3 and 11-OH-THC- d_3 solution were added to the QuantisalTM buffer (final concentrations in the extraction buffer: 50 pg/ml of THCCOOH- d_9 and 1250 pg/ml of THC- d_3 and 11-OH-THC- d_3). For the SPE method, an internal standard solution containing 100 ng/ml of THC- d_3 , 11-OH-THC- d_3 , and THCCOOH- d_9 was prepared in methanol. Fifty microliters of this mix was added to the QuantisalTM collection buffer before extraction (final concentrations 1250 pg/ml). THC- d_3 was utilized for CBN, CBD, and THC-gluc determination, whereas THCCOOH- d_9 was used for the quantification of THC-A and THC-COOH-gluc. Other cannabinoids were measured in the presence of their deuterated homologs as internal standards. A specific solution of 100 ng/ml of CBC was prepared from a standard solution at a concentration of 1 $\mu\text{g/ml}$.

Sample pretreatment

The maximum volume of absorbed OF was collected by squeezing the cellulose pad from the QuantisalTM collection device onto the walls of the plastic tube. Subsequently, methanol (1.5 ml) was added to the pad to wash off any residual cannabinoids. The methanolic extract was evaporated to dryness under nitrogen at room temperature. The OF-buffer mixture was added to the methanolic residue and the resulting mixture was sonicated for 5 min. The combined extracts were then purified by liquid-liquid or solid-phase extraction.

Liquid-liquid extraction (LLE)

A 1.5-ml aliquot of OF combined extracts was mixed with 0.5 ml of ammonium formate buffer (10 mM, pH 6.5). Subsequently, potassium chloride was added until the solution became saturated. Samples were extracted with 4 ml of heptane:ethyl acetate (4:1, v/v) using a vortex shaker for 1 min, followed by 5 min on a reciprocating shaker (Edmund Bühler SM-30, Glaskeller, Basel; 180 oscillations/min). After centrifugation at 3000 rpm for 5 min, the organic phase was removed and evaporated to dryness under nitrogen at room temperature. The residue was then dissolved in 100 μl of initial mobile phase (70:30, A:B, see below), vortexed, sonicated for 5 min, and transferred to a 250- μl vial for LC-MS/MS analysis.

Solid-phase extraction (SPE)

Oasis HLB extraction columns were conditioned with 2 ml of methanol, 2 ml of deionized water, and 2 ml of ammonium formate buffer (10 mM, pH 6.5). Subsequently, 1.5 ml of combined OF extracts was added to the extraction column and loaded by gravity. The columns were washed with 4 ml of ammonium formate buffer (10 mM, pH 6.5):methanol (95:5, v/v) and dried under vacuum for 15 min. Cannabinoids were eluted with 3 ml of methanol (2×1.5 ml) and the resulting eluates were evaporated to dryness under a nitrogen stream at room temperature. The residues were reconstituted in 100 μl of initial mobile phase, vortexed, sonicated for 5 min, and transferred into 250- μl autosampler vials for LC-MS/MS analysis.

Liquid chromatography

Chromatographic analyses were carried out using a Dionex Ultimate 3000 Rapid Separation LC system equipped with two binary pumps, an autosampler, and a column oven compartment (Thermo Scientific, Olten, Switzerland). A KinetexTM C18 100A column (150 \times 2.1 mm i.d.) (Phenomenex, Bachofenstr. 1, Bohnen, Switzerland) packed with core-shell 2.6 μm particles was used for the chromatographic separation. The autosampler and column oven temperatures were set to 10 and 40 $^{\circ}\text{C}$, respectively. A 10- μl sample was injected into the LC-MS/MS. Gradient elution was performed using a mixture of (A) ammonium formate buffer (5 mM, pH 6.8) and (B) acetonitrile at a constant flow rate of 400 $\mu\text{l}/\text{min}$. The initial gradient conditions were 30 % B, held for 30 s, and then linearly increased to 90 % B over 7 min. The final B concentration was maintained for 2 min. Finally, the proportion of solvent B was reduced from 90 to 30 % over 30 s and held for 1.5 min. The maximum pressure was set to 600 bar.

Mass spectrometry

The LC system was coupled to an AB Sciex API 5000TM triple quadrupole mass spectrometer interfaced with a Turbo VTM source with a TurboIonSpray[®] probe (ESI). Both positive and negative polarities were employed: THCCOOH, THCCOOH-gluc, THC-gluc, and THC-A were monitored in the negative ionization mode, whereas THC, 11-OH-THC, CBD, and CBN were monitored in the positive ionization mode. Mass spectrometry measurements were recorded using a scheduled multiple reaction monitoring mode (MRM) with three separate time windows. The first time window (from start to 5.1 min) was operated in the negative ionization mode, whereas the second (from 5.1 to 6.4 min) and the third (from 6.4 to 7.5 min) were operated in the positive mode. The selected ions, MS/MS parameters and retention times are

Table 1 Selected ion transitions and retention times for cannabinoids in real fluid

Compound name	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ions (<i>m/z</i>)	DP (V)	CE (V)	RT (min)	TW ^a
THCCOOH-gluc	519.2	343.2	-25	-30	3.24	1
	519.2	299.2	-25	-38	3.24	1
THC-gluc	489.0	313.2	-50	-42	3.31	1
	489.0	113.2	-50	-30	3.31	1
THC-A	357.1	313.2	-35	-28	4.68	1
	357.1	245.0	-35	-36	4.68	1
THCCOOH	343.2	299.2	-50	-24	4.87	1
	343.2	191.1	-50	-42	4.87	1
11-OH-THC	331.3	313.2	36	21	5.25	2
	331.3	193.1	36	33	5.25	2
CBD	315.2	193.2	41	29	6.13	2
	315.2	259.1	41	25	6.13	2
CBN	311.2	223.2	51	27	6.68	3
	311.2	178.2	51	81	6.68	3
THC	315.2	193.1	41	29	7.02	3
	315.2	259.1	41	25	7.02	3
THC- <i>d</i> ₃	318.2	262.1	41	25	7.00	3
	318.2	196.1	41	31	7.00	3
11-OH-THC- <i>d</i> ₃	334.3	316.0	31	21	5.23	2
	334.3	196.0	31	33	5.23	2
THCCOOH- <i>d</i> ₉	352.2	308.1	-50	-24	4.84	1
	352.2	194.2	-50	-44	4.84	1

Boldface denotes quantifier transitions

DP declustering potential, CE collision energy, RT retention time, TW time window

^a TW 1 from start to 5.1 min, TW 2 from 5.1 to 6.4 min and TW 3 from 6.4 to 7.5 min

provided in Table 1. The ion spray voltage was set to -4500 V for the negative polarity and +5500 V for the positive polarity. The source temperature was set to 550 °C for both cases. Analyst[®] 1.6 software was used to control the instrument and process the data. A representative reconstructed MRM chromatogram of an OF extract spiked with 50 ng/ml of each cannabinoid is shown in Fig. 1.

Method validation

Method validation was performed by establishing linearity, intraday and intermediate precisions, trueness and bias, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), extraction recovery, and matrix effect. In addition, the stability of the cannabinoids during storage was assessed. The validation was performed according the Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) recommendations [32, 33].

Sensitivity, limits of detection and quantification

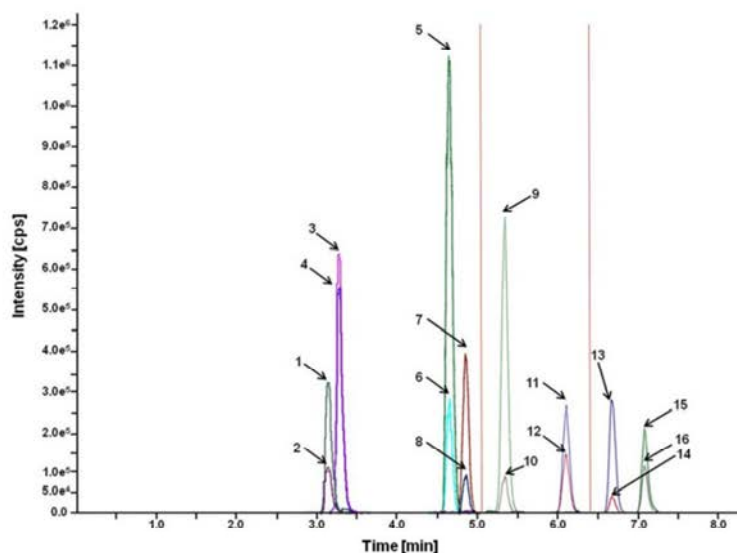
The LOD was determined in triplicate by injecting a series of drug-fortified human OF extracts in order of decreasing

concentration. The LOD was the lowest analyte concentration that exhibited a signal-to-noise (S/N) ratio of at least 3 and an acceptable chromatographic peak shape. The LOQ was the lowest concentration that exhibited acceptable accuracy and precision [relative standard deviation (RSD) within at least 20 %, $n = 4$].

Linearity, trueness and bias, intraday and intermediate precisions

The linearity of the response function was investigated in the OF concentration range of 0.5–75 ng/ml for all cannabinoids, and in the range of 50–600 pg/ml for THCCOOH with the LLE method. Calibration curves were obtained at eight calibration levels by injecting 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, and 100 ng (50, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, and 1500 pg of THCCOOH with LLE) of standards directly onto the pad before adding 1 ml of drug-free OF. Linearity was investigated by calculating the regression using the least-squares method and is expressed as the square of the correlation coefficient (R^2). A weighting factor of $1/x$ was applied for each compound. Calibration curves obtained on three different days were used to

Fig. 1 Representative reconstructed MRM chromatogram of an OF sample spiked at a concentration of 50 ng/ml for each cannabinoid: (1) THCCOOH-gluc 519.2 → 343.2, (2) THCCOOH-gluc 519.2 → 299.2, (3) THC-gluc 489.0 → 313.2, (4) THC-gluc 489.0 → 113.2, (5) THC-A 357.1 → 313.2, (6) THC-A 357.1 → 245.0, (7) THCCOOH 343.2 → 299.2, (8) THCCOOH 343.2 → 191.1, (9) 11-OH-THC 331.3 → 313.2, (10) 11-OH-THC 331.3 → 193.1, (11) CBD 315.2 → 193.2, (12) CBD 315.2 → 259.1, (13) CBN 311.2 → 223.2, (14) CBN 311.2 → 178.2, (15) THC 315.2 → 193.2, (16) THC 315.2 → 259.1. Vertical lines indicate the three time windows (TW). First TW: negative mode. Second and third TW: positive mode



calculate the mean slope, the y intercept, and their variations. Bias and precision were determined at five concentration levels across the linear dynamic range. The intraday precision was evaluated by analyzing four OF specimens spiked with 0.5, 2, 10, 30, and 75 ng/ml (50, 75, 100, 250, 500 pg/ml for THCCOOH by LLE) concentrations of cannabinoids on the same day. The intermediate precision was assessed by evaluating the same concentration on three separate days. The bias was determined by comparing the mean measured concentration of four analytes with that of the target value and was expressed as a percentage of the target concentration. Acceptable values were within 15 % of the target concentration for the bias and less than 15 % for the coefficients of variation (CVs) of the intraday and intermediate precisions.

Selectivity, interferences, extraction recovery, and matrix effects

Ten blank OF extracts of different sources were analyzed to prove the lack of response in blank matrix. Furthermore, possible interferences were tested with CBC. This cannabinoid, THC, and CBD are characterized by the same mass weight and share a few common ion transitions. It is therefore important that these cannabinoids are well separated from each other. Their unequivocal identification relies on both their ion transitions and their retention time (RT). To disclose any interference, CBC standards were either injected alone or in combination with CBD and THC

standards to compare their RT and to determine whether CBC could interfere with CBD and THC quantification.

The extraction recoveries and matrix effects were determined for each analyte at low and high concentrations according to the method proposed by Matuszewski et al. [34]. Three batches of OF samples were analyzed; batch A was composed of drug-free OF samples spiked with cannabinoids prior to SPE or LLE; batch B was composed of OF extracts spiked after SPE or LLE; batch C was composed of standard methanolic solutions of cannabinoids. Following analysis by LC-MS/MS, the cannabinoid peak areas were determined. The A/B ratio gave the extraction recovery, whereas the B/C ratio gave the matrix effect.

Stability studies and carryover

The stability of OF samples was investigated after one and three freeze–thaw cycles (23 h freezing at -80°C followed by 1 h thaw at room temperature). Extracts of OF samples ($n = 4$) at three fortified concentrations (2, 10, and 75 ng/ml of OF) were analyzed before and after one or three freeze–thaw cycles. The response (peak areas) was compared to that of the unfrozen samples (0 % loss) and calculated as a loss percentage.

The stability of cannabinoids at room temperature was also investigated. After OF collection, the collector device was left at room temperature for 1, 4, 12, or 24 h before storage at -80°C . The carryover was established by injecting one extract prepared with one OF sample

containing the highest concentration investigated followed by a blank extract. The recovery was considered insignificant when the peak area was <20 % of the lower limit of quantification.

Determination of cannabinoids in oral fluid sampled from five volunteers before and after smoking a homemade joint

Five healthy male volunteers between 18 and 30 years of age, all heavy cannabis smokers, participated in the study. Subjects were recruited through advertisements in hospitals and universities. They had no known history of neurological or psychiatric disorders. The inclusion protocol consisted of several distinct steps: during a first interview, we gave detailed explanations about the experimental protocol. Subjects then underwent a thorough medical examination and a psychiatric interview. During this inclusion visit, participants provided a detailed medical history and filled out a questionnaire about their drug use and habits. The mean consumption of cannabis for the 3 months preceding inclusion in the study was set to a minimum of ten joints per month and a maximum of two joints per day.

Subjects were asked to provide several OF specimens before and after smoking a homemade cannabis joint. The sampling of the OF specimens was carried out at home under real-life conditions. The study was approved by the Cantonal Research Ethics Committee (Vaud), and the volunteers were asked to provide their informed consent. All subjects were financially compensated for their participation. One OF sample was collected before smoking the joint, and then five or six were collected afterwards. For practical reasons, the study was terminated 4 h after the joint was smoked. After collection, the samples were brought to the laboratory and stored at -80°C prior to analysis.

Chemical and enzymatic hydrolysis of glucuronides in OF

Several publications have shown that saliva contains beta-glucuronidase enzymes [35–37]. To investigate whether these OF enzymes are able to hydrolyze cannabinoid conjugates, the degree of degradation of two glucuronides was evaluated under various conditions to discriminate between nonenzymatic (chemical) and enzymatic hydrolysis. Hydrolysis was carried out in water or OF—at the native OF pH (pH 7.0) and also at the optimal pH for beta-glucuronidase activity (pH 4.5). We also assessed the effect of heat inactivation of OF enzymes on the degradation of cannabinoid conjugates. To this end, 500 μl of water or acetate buffer (200 mM, pH 4.5) was added to 2.5 ml of water, native OF, or inactivated OF (obtained by boiling for 5 min). All experiments were repeated three times.

Samples containing THC-gluc and THCCOOH-gluc at concentrations of 5 ng/ml each were incubated at 37°C for up to 5 h. Aliquots were sampled at $t = 0, 0.5, 1,$ and 5 h. Solid-phase extraction and LC-MS/MS analysis were carried out according to the developed method.

Results and discussion

Extraction

All free unconjugated cannabinoids were detected by both the LLE and SPE methods. However, even after changing the extraction conditions, neither THC-gluc nor THCCOOH-gluc could be detected using the LLE technique. Increasing the polarity of the extracting solvent or adding different salts to the water phase did not significantly increase the recovery of the glucuronide derivatives. Although a higher sensitivity was achieved for THCCOOH using the LLE approach, the SPE method allowed for the analysis of the glucuronide conjugates. Because each method has its own advantages and limitations, both were validated.

Method validation

The main validation parameters obtained for the LLE and SPE extraction methods are provided in Tables 2 and 3, respectively.

Limits of detection and quantification

The sensitivities of the LLE and SPE methods were estimated by determining the LOD and LOQ values. The concentration that satisfied the validation criteria (CV <20 % for the bias and precision values) for the LOQ was 0.5 ng/ml for all cannabinoids using both extraction methods, except for THCCOOH, which exhibited a LOQ of 0.08 ng/ml with the LLE method. Moore et al. [4] and Day et al. [21] reported concentrations of THCCOOH in OF in the range of 5–150 pg/ml, which includes the LOQ value of the LLE method. These concentration thresholds are consistent with the values discussed by Pil and Verstraete [38] in their review of drug testing in oral fluid.

Linearity, trueness and bias, intraday and intermediate precisions

The range of the standard curves was 0.5–75 ng/ml for all cannabinoids investigated, with the exception of THCCOOH extracted by LLE, which was 0.08–500 ng/ml. The R^2 values (with 1/s weighting) were acceptable for all cannabinoids ($R^2 > 0.9943$). Variations in the slopes of all

Table 2 Validation data for trueness, intraday and intermediate precisions, and linearity for THCCOOH, THC-A, 11-OH-THC, CBD, THC, and CBN obtained using the liquid–liquid extraction method

Validation criterion	Level ^a	THCCOOH	Level ^a b	THC-A	11-OH-THC	CBD	THC	CBN
Trueness (%)	0.05	119.9	0.5	104.0	114.5	108.5	108.4	108.2
	0.075	109.7	2	103.7	107.8	106.3	105.9	104.0
	0.1	102.8	10	100.8	100.8	99.5	102.7	102.0
	0.25	101.3	30	103.2	98.5	98.9	100.1	99.7
	0.5	99.7	75	101.4	100.4	101.4	100.0	99.8
Intraday precision (CV, %)	0.05	57.6	0.5	14.6	7.4	9.0	7.1	7.1
	0.075	13.5	2	6.5	7.0	6.4	5.1	4.7
	0.1	8.3	10	6.9	3.6	4.6	2.0	2.7
	0.25	5.2	30	5.6	4.0	3.3	1.3	1.6
	0.5	4.0	75	2.0	1.9	4.7	0.4	1.4
Intermediate precision (CV, %)	0.05	45.3	0.5	14.9	9.6	10.4	7.7	14.9
	0.075	17.1	2	8.0	8.5	7.8	5.6	5.4
	0.1	8.3	10	6.9	3.6	5.7	3.1	3.5
	0.25	5.2	30	5.6	4.0	3.7	1.3	2.6
	0.5	4.2	75	2.2	2.2	4.7	0.8	1.4
Linearity								
Slope (CV)		0.9966 (0.3 %)		1.004 (0.2 %)	1.003 (0.2 %)	0.9969 (1.2 %)	1.0029 (0.7 %)	0.9993 (1.1 %)
y intercept (CV)		0.0034 (4.1 %)		0.0185 (11.1 %)	0.0051 (14.8 %)	0.0148 (10.7 %)	0.0005 (5.0 %)	0.0795 (5.6 %)
R ²		0.9943		0.9976	0.9994	0.9973	0.9998	0.9995
LOD (ng/ml)		0.05		0.3	0.2	0.3	0.3	0.3
LOQ (ng/ml)		0.08		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

CV coefficient of variation

^a Fortified OF concentration (ng/ml)

calibration curves were <10 % and the intercept value did not differ significantly from 0 ($P < 0.05$). For concentrations higher than the LOQ, the variation coefficients of intraday and intermediate precisions were ≤ 15 %. The trueness values were within 91.2 and 113 % for the SPE technique and within 98.5 and 114.5 % for the LLE method.

Selectivity, interferences, extraction recovery, and matrix effects

Oral fluid specimens collected from drug-free individuals showed no interference with the assay. For interferences with minor cannabinoids, CBC was analyzed by infusion in order to determine its ion transitions. As expected, they were identical to those selected for THC and CBD. CBC standards were then injected in the LC–MS/MS. No overlap could be observed. The RT of CBC was 7.24 min while those of THC and CBD were 7.02 and 6.13 min, respectively. This result confirms a previous study of Hazekamp et al. [39]. In 2005, they studied the chromatographic and spectroscopic data of a wide range of cannabinoids. They

found that CBC, CBD, and THC were well separated with a reversed-phase C18 column whatever the pH used, acid or basic. More recently, Poklis et al. [40] showed that the RTs of CBC, CBD, and THC were well separated by reversed-phase chromatography. Because CBC, CBD, and THC are well separated, misidentification of one of these compounds cannot occur. Furthermore, in 1984, Barni-Comparini et al. [41] studied the cannabinoid levels in 176 plants of different lots of *Cannabis sativa* L. They showed that CBC was present only in tiny amounts in the leaves; the maximum concentration was around 0.5 % based on dry weight, suggesting that chromatographic interferences are unlikely.

The extraction efficiencies and matrix effects, expressed as percentages, for each cannabinoid at two concentrations are provided in Tables 4 and 5. Each result is an average of four independent determinations; standard deviations are indicated in brackets. The recovery of cannabinoids was relatively low with the LLE method (approximately 42 %) and ranged between 39.6 % for THC and 47.1 % for CBN. The extraction yield for all cannabinoids remained relatively constant across the range of concentrations tested.

Table 2 Validation data for recovery, accuracy and intermediate precision, and linearity for THCCOOH, THCCOOH-gluc, THC-A, THC-gluc, 11-OH-THC, CBD, THC, THC, and CBN extracted using the solid-phase extraction method

Validation criterion	Level ^a	THCCOOH	THCCOOH-gluc	THC-A	THC-gluc	11-OH-THC	CBD	THC	CBN
Recovery (%)	0.5	95.7	91.3	93.3	89.0	96.9	113.1	109.4	104.7
	2	97.7	95.0	97.1	93.3	99.1	101.9	106.0	102.1
	10	100.8	98.2	98.8	97.1	101.1	98.9	102.3	100.2
	50	105.1	100.0	102.6	97.0	100.0	98.9	100.8	101.1
Accuracy (%)	0.5	95.7	91.3	93.3	89.0	96.9	113.1	109.4	104.7
	2	97.7	95.0	97.1	93.3	99.1	101.9	106.0	102.1
	10	100.8	98.2	98.8	97.1	101.1	98.9	102.3	100.2
	50	105.1	100.0	102.6	97.0	100.0	98.9	100.8	101.1
Intermediate precision (CV, %)	0.5	0.0	4.4	3.1	3.2	3.8	3.0	2.2	3.7
	2	2.2	3.0	3.1	3.6	2.7	2.8	3.4	3.9
	10	3.2	4.1	3.0	4.2	1.2	3.0	3.0	7.4
	30	1.5	5.4	3.0	3.3	0.8	3.2	1.3	2.7
Intermediate precision (CV, %)	0.5	5.2	20.5	9.4	8.0	10.1	12.3	5.9	6.8
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0
	2	1.4	6.3	6.0	1.3	0.4	3.4	3.8	4.3
	10	2.3	5.2	8.0	1.7	0.1	1.5	2.2	4.0
	30	0.5	5.6	4.1	3.8	0.5	2.6	1.1	2.1
Linearity	0.5	1.5	6.0	3.4	5.4	1.1	2.1	2.2	5.0

Table 4 Extraction efficiencies (SD) observed for the LC–MS/MS analysis of eight cannabinoids in spiked drug-free oral fluid samples at different concentrations

Analyte	SPE extraction efficiency (% , n = 4)		LLE extraction efficiency (% , n = 4)			
	2 ng/ml	75 ng/ml	100 pg/ml	400 pg/ml	2 ng/ml	75 ng/ml
THCCOOH	41.8 (5.0)	37.5 (5.8)	–	–	–	–
THCCOOH-gluc	38.3 (5.8)	29.5 (5.2)	–	–	42.8 (1.6)	42.3 (2.6)
THC-A	39.7 (8.8)	31.7 (6.0)	–	–	44.2 (1.2)	42.8 (2.9)
THC-gluc	28.8 (8.3)	26.6 (5.7)	–	–	39.8 (3.9)	39.6 (2.2)
CBD	38.3 (7.1)	28.2 (3.5)	–	–	43.4 (1.2)	47.1 (3.0)

Table 5 Matrix effects (SD) observed for eight cannabinoids in spiked drug-free oral fluid samples at different concentrations

Analyte	SPE matrix effect (bias % , n = 4)		LLE matrix effect (bias % , n = 4)			
	2 ng/ml	75 ng/ml	50 pg/ml	400 pg/ml	2 ng/ml	75 ng/ml
THCCOOH	–31.4 (5.0)	–28.8 (5.9)	–33.8 (4.7)	–31.6 (4.2)	–29.5 (3.7)	–21.2 (4.1)
THCCOOH-gluc	–32.9 (4.7)	–29.1 (3.3)	–	–	–	–
THC-A	–2.4 (3.7)	–1.6 (6.5)	–	–	–12.1 (2.6)	–9.3 (1.7)
THC-gluc	–19.1 (6.6)	–20.3 (4.3)	–	–	–	–
11-OH-THC	–42.3 (4.4)	–41.0 (4.6)	–	–	–21.1 (3.4)	–22.1 (2.9)
CBD	–43.6 (5.9)	–41.5 (5.8)	–	–	–25.5 (3.1)	–27.1 (2.8)
THC	–43.8 (6.1)	–37.1 (5.3)	–	–	–24.8 (4.3)	–25.7 (2.3)
CBN	–45.0 (4.8)	–34.2 (5.1)	–	–	–24.1 (3.9)	–21.8 (3.3)

Negative values indicate ion suppression, whereas positive values indicate ion enhancement.

storing at –80 °C. No obvious variation (<15 %) in the peak area was observed over this time period. These results demonstrate that cannabinoids are relatively stable in the extraction buffer and that it is not necessary to incubate the pad at room temperature for at least 4 h, as recommended by the manufacturer for optimal cannabinoid extraction.

The stability of the cannabinoids after one or three freeze–thaw cycles was also investigated. OF extracts were injected into the LC–MS/MS system after one or three freeze–thaw cycles, and the peak areas were compared to those of samples analyzed immediately after sampling and without any freezing. All cannabinoids were stable after one freeze–thaw cycle, with the exception of THCCOOH, THC-A and CBN (retaining 17 and 13 % maximum loss, respectively). In contrast, three freeze–thaw cycles resulted in a considerable degradation of cannabinoids, with a mean decrease of 46 % and a maximum decrease of 54 % for CBN.

Analysis of untreated oral fluid samples

Data for the appearance and disappearance of cannabinoids as a function of time in neat OF collected at home with the Quantisal™ device are provided in Table 6. The LLE

method was used for the determination of THCCOOH, whereas SPE was used for the analysis of all other cannabinoids. We detected THC at very high concentrations, up to 11,887 ng/ml for subject 5, in the first OF specimens obtained 10 min after the first inhalation of cannabis smoke. All samples tested positive for THC at concentrations in the range 2.8–128 ng/ml in the final OF specimen. THC-A was also detected at relatively high levels with peak concentrations ranging from 44 to 2031 ng/ml. As observed with THC, all OF specimens tested positive for THC-A. Interestingly, THC and THC-A exhibited the highest concentrations in the first sample obtained 10 min after inhalation. These results indicate that THC-A is not completely transformed into THC by decarboxylation during the smoking process, and it is also present in OF primarily as a result of deposition in the oral cavity. CBD and CBN were also found, but in much lower concentrations. The time to reach the maximum level for CBD and CBN was identical to that of THC and THC-A, suggesting that their presence is also mainly due to the contamination of the oral cavity during the inhalation. THCCOOH was only detected in a few OF samples, and always at very low concentrations. In contrast to the other cannabinoids, the

time to reach its maximum level was delayed in four out of five cases, from the first to the second, and even to the fourth OF specimen taken after smoking. Because THCCOOH is not known to be present in the joints and only produced by animal metabolism, and also because its kinetic in OF differs from other cannabinoids found in cannabis, its presence is thought to result exclusively from body metabolism. The low concentrations of THCCOOH could only be measured using the HPL method. The concentrations ranged from the LOQ (80 pg/ml) to 2.4 ng/ml. The LOD and LOQ of the SPE method were not high enough to detect and measure this metabolite in the majority of OF samples. Surprisingly, the more polar glucuronide conjugates were not found in the OF specimens of the five cannabis smokers, except for the first volunteer for whom traces of THCCOOH-gluc were found in three out of seven samples. Several hypotheses can be presented to explain these observations: a strong binding to plasma proteins [44], poor diffusion into OF [45], a lack of transport proteins, or the presence of degrading enzymes. In the latter case, the presence of beta-glucuronidase enzymes in OF [35–37] could explain the lack of detection of THCCOOH-gluc and THC-gluc in OF. In agreement with the assumption that glucuronide conjugates of cannabinoids are present in OF in significant amounts, a study published in 2007 by Moore et al. [4] suggests that 48.2 % of THCCOOH is glucuronidated in OF (estimated after beta-glucuronidase treatment). In the same study, the authors indicate that the concentration of THC in OF remained nearly unchanged after treatment with beta-glucuronidase. This result suggests that THC was poorly conjugated at all. Similar observations were made with the glucuronide conjugate of other drugs. For example, oxazepam glucuronide and other benzodiazepine conjugates were found only in trace levels in OF [46]. A minor but active THC metabolite, 11-OH-THC was also not detected.

Assessment of chemical and enzymatic hydrolysis of glucuronide conjugates of THC and THCCOOH in oral fluid

The extent of hydrolysis of THC and THCCOOH glucuronides and the resulting formation of free cannabinoids were investigated under various incubation conditions. These conditions were selected to distinguish between nonenzymatic and enzyme-catalyzed degradation of glucuronidated cannabinoids. To assess the nonenzymatic hydrolysis of conjugates, we incubated glucuronides in the presence of heat-inactivated OF enzymes. We also investigated the extent of total hydrolysis (both uncatalyzed and enzymatic) by incubating the glucuronides with an untreated OF mix. The reaction media were diluted with

Table 6 Cannabinoid concentrations in oral fluid as a function of time before and after smoking a homemade joint

Subject	Time (min)	THCCOOH	THC-A	EDD	THC	CBG
1	-10	0.5	2.6	0.5	290	6.7
	20	1.3	175	6.9	3120	165
	40	2.4	41	4.3	1970	98
	60	0.7	10	0.6	441	19
	120	0.5	12	n.d.	252	5.4
	210	0.4	6.6	n.d.	80	11
2	-10	n.d.	2.7	n.d.	5.9	n.d.
	20	0.17	66	3.7	971	182
	40	0.31	14	1.2	210	45
	60	<0.08	2.2	0.9	37	2.8
	120	<0.08	1.7	n.d.	93	2.7
	210	n.d.	<0.5	n.d.	22	2.0
3	-10	n.d.	1.0	n.d.	1.4	0.5
	20	0.17	44	2.8	1060	212
	40	0.14	10	2.1	627	37
	60	<0.08	6.1	1.5	123	31
	120	n.d.	1.0	<0.5	9	4.2
	210	n.d.	0.7	n.d.	7	3.9
4	-10	n.d.	15	<0.5	13	<0.5
	20	n.d.	45	7.3	196	4.3
	40	0.51	19	2.5	84	1.8
	60	0.25	6.8	<0.5	43	2.1
	120	0.08	5.1	<0.5	3.8	2.4
	210	n.d.	6.6	n.d.	2.8	<0.5
5	-10	n.d.	2.9	0.5	476	5.8
	20	n.d.	300	0.4	1027	10
	40	<0.08	2.9	0.4	252	4.8
	60	0.31	763	n.d.	1396	8.3
	120	0.18	436	n.d.	729	5.7
	300	<0.08	158	n.d.	128	0.8

Concentrations of cannabinoids in oral fluid are expressed in ng/ml

either water or an acetate buffer known to be optimal for beta-glucuronidase activity. The relative concentrations of substrates and products after 0, 0.5, 1, and 5 h are provided in Table 7. A significant hydrolysis of THCCOOH-gluc (~85 % after 5 h) was only observed with native OF. THC-gluc was only mildly degraded (<30 %), suggesting that this compound is much more resistant toward human beta-glucuronidase action. This latter result confirms a previous study of Watanabe et al. [47]. They demonstrated that Δ⁸-THC-gluc is relatively resistant to degradation with a maximum hydrolysis of 31.6 % with bacterial beta-glucuronidase. Furthermore, Scheidweiler et al. [48] demonstrated recently that in urine THC-gluc is more stable than THCCOOH-gluc. Conversely, the decrease in the substrate

Table 7 Comparison of cannabinoid glucuronide degradation in native and inactivated oral fluid (OF) as well as in aqueous and buffered (pH 4.5) solutions

Sample	Time (h)	THCCOOH	THCCOOH-gluc	THC	THC-gluc
OF + water	0	2.13	10.11	0.40	9.19
	0.5	2.43	8.37	2.27	8.34
	1	3.93	5.60	2.97	7.46
	5	7.94	1.50	–	6.71
OF + acetate buffer	0	1.45	10.48	0.55	8.88
	0.5	2.62	8.82	0.79	8.03
	1	4.05	6.43	1.94	7.78
	5	7.35	2.01	–	7.48
Inactivated OF + water	0	0.90	10.51	0.45	8.79
	0.5	0.86	10.09	0.34	8.45
	1	0.90	9.68	0.38	8.30
	5	0.92	7.00	0.39	8.24
Inactivated OF + acetate buffer	0	0.65	10.95	0.43	8.76
	0.5	0.53	10.67	0.40	7.95
	1	0.54	10.91	0.36	8.19
	5	0.42	11.20	0.39	8.17
Water + water	0	<LOQ	8.73	<LOQ	3.14
	0.5	<LOQ	7.96	<LOQ	3.03
	1	<LOQ	6.30	<LOQ	3.09
	5	<LOQ	5.86	<LOQ	3.02
Water + acetate buffer	0	<LOQ	8.49	<LOQ	3.31
	0.5	<LOQ	5.85	<LOQ	3.37
	1	<LOQ	5.48	<LOQ	3.49
	5	<LOQ	5.45	<LOQ	3.07

Concentrations of THCCOOH, THCCOOH-gluc, THC and THC-gluc are expressed in pmol/ml of reaction mixture
–, not available

concentration coincided with a substantial increase in THCCOOH and in THC. The buffering of the reaction medium significantly increased the extent of glucuronide degradation. The enzymatic degradation of THCCOOH-gluc increased from 5.1 pmol in OF + water to 8.5 pmol in OF + buffer for 1.0 ml of OF volume (i.e., a 67 % increase). Under various conditions, the absence of native OF in the reaction medium significantly diminished the hydrolysis of glucuronides. OF proteins and their conformation (native or denatured) certainly have a significant influence on the stability and extractability of cannabinoids. In addition to mucins and enzymes, OF contains many proteins including albumin. According to Wang et al. [49], human albumin exists in a wide range of concentrations in saliva (5–45 mg/l). In 2002, Skopp et al. [44] showed that the addition of albumin in protein-free samples prior to the extraction step increases the recovery of free and conjugated cannabinoids. Furthermore, this protein is known to bind with the majority of the cannabinoids [50]. The binding of cannabinoids to albumin and other proteins could stabilize and protect glucuronide conjugates from degradation. Finally, the pH of the incubation medium should also have an influence. Indeed the chemical hydrolysis of glucuronides is enhanced at pH 7 (inactivated

OF + water) compared to pH 4.5 (inactivated OF + acetate buffer). Based on the comparison of the extent of THCCOOH-gluc degradation after incubation with native or inactivated OF, we can assume that approximately 60 % of the THCCOOH-gluc was enzymatically degraded, whereas only 40 % was chemically hydrolyzed. These results confirm the presence of beta-glucuronidase activity in OF, and may partly explain the difficulty to detect glucuronide conjugates in this matrix. THC-gluc was found to be much less susceptible to enzymatic hydrolysis than THCCOOH-gluc, which contains a more labile ester bond.

Conclusions

To our knowledge, this work represents the first analytical method developed for the detection and quantification of a broad range of cannabinoids, including a THC precursor and two glucuronide conjugates, in oral fluid by LC–MS/MS. This method utilizes a new Kinetex™ core-shell column combined with an API 5000™ triple quadrupole system, and was successfully applied for the determination of cannabinoids in OF specimens collected from five different cannabis smokers. The collection of the OF was

simplified with the use of a Quantisal™ collection device. THC-gluc was not detected in real OF specimens, whereas THCCOOH-gluc was found only at trace levels in a few samples. Moreover, our experiments suggest that THC-COOH-glucuronide could be hydrolyzed by beta-glucuronidase enzymes present in the OF. Liquid–liquid extraction proved to be the most efficient method for THCCOOH detection provided that THCCOOH-glucuronide and THC-glucuronide determination is not required.

Acknowledgments The authors thank the Swiss National Science Foundation (FNS_320030_127507/1) and the Faculty of Biology and Medicine (interdisciplinary grant) at the University of Lausanne for their financial support.

References

- Kelly E, Darke S, Ross J (2004) A review of drug use and driving: epidemiology, impairment, risk factors and risk perceptions. *Drug Alcohol Rev* 23(3):319–344. doi:10.1080/09595230412331289482
- Choo RE, Huestis MA (2004) Oral fluid as a diagnostic tool. *Clin Chem Lab Med* 42(11):1273–1287. doi:10.1515/CCLM.2004.248
- Molnar A, Lewis J, Doble P, Hansen G, Prolov T, Fu S (2011) A rapid and sensitive method for the identification of delta-9-tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int*. doi:10.1016/j.forsciint.2011.01.045
- Moore C, Rana S, Coulter C, Day D, Vincent M, Soares J (2007) Detection of conjugated 11-nor-Delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in oral fluid. *J Anal Toxicol* 31(4):187–194
- Lee D, Milman G, Barnes AJ, Goodwin RS, Hirvonen J, Huestis MA (2011) Oral fluid cannabinoids in chronic, daily Cannabis smokers during sustained, monitored abstinence. *Clin Chem* 57(8):1127–1136. doi:10.1373/clinchem.2011.164822
- Milman G, Barnes AJ, Schwoppe DM, Schwilke EW, Darwin WD, Goodwin RS, Kelly DL, Gorelick DA, Huestis MA (2010) Disposition of cannabinoids in oral fluid after controlled around-the-clock oral THC administration. *Clin Chem* 56(8):1261–1269. doi:10.1373/clinchem.2009.141853
- Milman G, Schwoppe DM, Schwilke EW, Darwin WD, Kelly DL, Goodwin RS, Gorelick DA, Huestis MA (2011) Oral fluid and plasma cannabinoid ratios after around-the-clock controlled oral Delta(9)-tetrahydrocannabinol administration. *Clin Chem* 57(11):1597–1606. doi:10.1373/clinchem.2011.169490
- Moore C, Rana S, Coulter C (2007) Simultaneous identification of 2-carboxy-tetrahydrocannabinol, tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol in oral fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 852(1–2):459–464. doi:10.1016/j.jchromb.2007.02.016
- Coles R, Clements TT, Nelson GJ, McMillin GA, Urry FM (2005) Simultaneous analysis of the Delta9-THC metabolites 11-nor-9-carboxy-Delta9-THC and 11-hydroxy-Delta9-THC in meconium by GC-MS. *J Anal Toxicol* 29(6):522–527
- Bischoff MA, Peng S (1998) Delta 9-THC metabolites in meconium: identification of 11-OH-delta 9-THC, 8 beta, 11-diOH-delta 9-THC, and 11-nor-delta 9-THC-9-COOH as major metabolites of delta 9-THC. *J Anal Toxicol* 22(4):329–335
- Fabritius M, Staub C, Mangin P, Giroud C (2012) Distribution of free and conjugated cannabinoids in human bile samples. *Forensic Sci Int*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.08.013>
- Feng J, Bischoff MA, Salamone S, Salem MY (2000) Simultaneous analysis of Delta9-THC and its major metabolites in urine, plasma, and meconium by GC-MS using an immunoaffinity extraction procedure. *J Anal Toxicol* 24(6):395–402
- Gronewold A, Skopp G (2011) A preliminary investigation on the distribution of cannabinoids in man. *Forensic Sci Int* 210(1–3):e7–e11. doi:10.1016/j.forsciint.2011.04.010
- Lin DL, Lin RL (2005) Distribution of 11-nor-9-carboxy-Delta9-tetrahydrocannabinol in traffic fatality cases. *J Anal Toxicol* 29(1):58–61
- Marchei E, Pellegrini M, Pacifici R, Palmi I, Lozano J, Garcia-Algar O, Pichini S (2006) Quantification of Delta9-tetrahydrocannabinol and its major metabolites in meconium by gas chromatographic-mass spectrometric assay: assay validation and preliminary results of the “meconium project”. *Ther Drug Monit* 28(5):700–706. doi:10.1097/01.fdt.0000245380.95186.13
- Moore C, Lewis D, Becker J, Leikin J (1996) The determination of 11-nor-delta 9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH) in meconium. *J Anal Toxicol* 20(3):25–29
- Bayonche J, Bouchard P, Dunn S, Thiba C, Girardot M, Buffeteuil C, Aronowicz J (2012) A validated GC-MS method for the determination of Δ9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-Δ9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in bile samples. *Forensic Toxicol* 30(1):51–58. doi:10.1007/s11419-011-0126-1
- Badawi N, Simonsen KW, Steentoft A, Bernhoft IM, Linnet K (2009) Simultaneous screening and quantification of 29 drugs of abuse in oral fluid by solid-phase extraction and ultraperformance LC-MS/MS. *Clin Chem* 55 (11):2004–2018. doi:10.1373/clinchem.2008.122341
- Chi E, Cole J (2010) Detecting Marijuana in Saliva. *Forensic Mag* 7(5):17–20
- Concheiro M, de Castro A, Quintela O, Cruz A, Lopez-Rivadulla M (2008) Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 391(6):2329–2338. doi:10.1007/s00216-008-2135-4
- Day D, Kuntz DJ, Feldman M, Presley L (2006) Detection of THCA in oral fluid by GC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 30(9):645–650
- Laloup M, Ramirez Fernandez Mdel M, Wood M, De Boeck G, Henquet C, Maes V, Samyn N (2005) Quantitative analysis of delta9-tetrahydrocannabinol in preserved oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1082(1):15–24
- Niedbala RS, Kardos KW, Fritch DF, Kardos S, Fries T, Waga J, Robb J, Cone EJ (2001) Detection of marijuana use by oral fluid and urine analysis following single-dose administration of smoked and oral marijuana. *J Anal Toxicol* 25(5):289–303
- Oiestad EL, Johansen U, Christophersen AS (2007) Drug screening of preserved oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 53(2):300–309. doi:10.1373/clinchem.2006.074237
- Quintela O, Andrenyak DM, Hoggan AM, Crouch DJ (2007) A validated method for the detection of Delta 9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-Delta 9-tetrahydrocannabinol in oral fluid samples by liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 31(3):157–164
- Sergi M, Baffie E, Compagnone D, Curial R, D’Ascanzio G, Romolo FS (2009) Multiclass analysis of illicit drugs in plasma and oral fluids by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 393(2):709–718. doi:10.1007/s00216-008-2456-3
- Simoes SS, Ajenjo AC, Franco JM, Vieira DN, Dias MJ (2009) Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the qualitative and quantitative analysis of illicit drugs and medicines in

- preserved oral fluid. *Rapid Commun Mass Spectrom* 23(10):1451–1460. doi:10.1002/rcm.4020
28. Simonin J, Salquebre G, Cirimele V, Kintz P (2007) Screening for illicit drugs in oral fluid by LC–MS/MS. *Ann Toxicol Anal* 19(2):141–150
 29. Gritti F, Guiochon G (2010) Performance of columns packed with the new shell Kinetex-C18 particles in gradient elution chromatography. *J Chromatogr A* 1217(10):1604–1615. doi:10.1016/j.chroma.2010.01.008
 30. Gritti F, Leonardi I, Shock D, Stevenson P, Shalliker A, Guiochon G (2010) Performance of columns packed with the new shell particles, Kinetex-C18. *J Chromatogr A* 1217(10):1589–1603. doi:10.1016/j.chroma.2009.12.079
 31. Moore C, Vincent M, Rana S, Coulter C, Agrawal A, Soares J (2006) Stability of Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC) in oral fluid using the Quantal collection device. *Forensic Sci Int* 164(2–3):126–130. doi:10.1016/j.forsciint.2005.12.011
 32. Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon PA, Dewe W, Feinberg M, Lallier M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C, Valat L, Rozet E (2007) Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal—part II. *J Pharm Biomed Anal* 45(1):70–81. doi:10.1016/j.jpba.2007.06.013
 33. Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon PA, Dewe W, Feinberg M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Valat L, Rozet E (2007) Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal—part III. *J Pharm Biomed Anal* 45(1):82–96. doi:10.1016/j.jpba.2007.06.032
 34. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS. *Anal Chem* 75(13):3019–3030
 35. Chauncey HH, Lionetti F, Winer RA, Lisanti VF (1954) Enzymes of human saliva. I. The determination, distribution, and origin of whole saliva enzymes. *J Dent Res* 33(3):321–334
 36. Ghadge MS, Raste AS (2006) Place of salivary beta glucuronidase activity in head and neck cancers. *Indian J Clin Biochem* 21(1):196–198
 37. Lamster IB, Kaufman E, Grbic JT, Winston LJ, Singer RE (2003) Beta-glucuronidase activity in saliva: relationship to clinical periodontal parameters. *J Periodontol* 74(3):353–359. doi:10.1902/jop.2003.74.3.353
 38. Pil K, Verstraete A (2008) Current developments in drug testing in oral fluid. *Ther Drug Monit* 30(2):196–202. doi:10.1097/FTD.0b013e318167d563
 39. Hazekamp A, Peltenburg A, Verpoorte R, Giroud C (2005) Chromatographic and spectroscopic data of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 28(15):2361–2382
 40. Poklis JL, Thompson CC, Long KA, Lichtman AH, Poklis A (2010) Disposition of cannabichromene, cannabidiol, and Delta(9)-tetrahydrocannabinol and its metabolites in mouse brain following marijuana inhalation determined by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 34(8):516–520
 41. Barni-Comparini I, Ferri S, Centini F (1984) Cannabinoid level in the leaves as a tool for the early discrimination of cannabis chemiovariants. *Forensic Sci Int* 24(1):37–42
 42. Skopp G, Potsch L (2002) Stability of 11-nor-delta(9)-carboxy-tetrahydrocannabinol glucuronide in plasma and urine assessed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 48(2):301–306
 43. Humphrey SP, Williamson RT (2001) A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 85(2):162–169. doi:10.1067/mpr.2001.113778
 44. Skopp G, Potsch L, Mauden M, Richter B (2002) Partition coefficient, blood to plasma ratio, protein binding and short-term stability of 11-nor-Delta(9)-carboxy tetrahydrocannabinol glucuronide. *Forensic Sci Int* 126(1):17–23
 45. Cone EJ, Huestis MA (2007) Interpretation of oral fluid tests for drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci* 1098:51–103. doi:10.1196/annals.1384.037
 46. Smink BE, Hofman BJ, Dijkhuizen A, Lusthof KJ, de Gier JJ, Egberts AC, Uges DR (2008) The concentration of oxazepam and oxazepam glucuronide in oral fluid, blood and serum after controlled administration of 15 and 30 mg oxazepam. *Br J Clin Pharmacol* 66(4):556–560. doi:10.1111/j.1365-2125.2008.03252.x
 47. Watanabe K, Oguri K, Yoshimura H (1979) Synthesis of delta 8-tetrahydrocannabinol glucuronide and sulfate, and their metabolic disposition in rats. *Chem Pharm Bull* 27(12):3009–3014
 48. Scheidweiler KB, Desrosiers NA, Huestis MA (2012) Simultaneous quantification of free and glucuronidated cannabinoids in human urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 413(23–24):1839–1847. doi:10.1016/j.cca.2012.06.034
 49. Wang RE, Tian L, Chang YH (2012) A homogeneous fluorescent sensor for human serum albumin. *J Pharm Biomed Anal* 63:165–169. doi:10.1016/j.jpba.2011.12.035
 50. Fanali G, Cao Y, Ascenzi P, Trezza V, Rubino T, Parolaro D, Fasano M (2011) Binding of delta9-tetrahydrocannabinol and diazepam to human serum albumin. *IUBMB Life* 63(6):446–451. doi:10.1002/iub.466

III.3.2. Dérivatisation

III.3.2.1. Présentation de la problématique

La méthode développée au laboratoire ne permet malheureusement pas l'analyse des conjugués glucuronides dans la salive. Ceux-ci sont vraisemblablement faiblement excrétés et en partie hydrolysés par les enzymes présentes dans le fluide oral et donc en concentrations trop faibles pour pouvoir être détectés et quantifiés. Le THCCOOH est aussi présent en très faible quantité dans la salive et augmenter la sensibilité de l'analyse permettrait d'abaisser le seuil de détection et d'améliorer la limite de quantification des dosages.

Ainsi, il est intéressant de considérer la technique de dérivatisation de ces composés pour améliorer la performance de leur analyse. La dérivatisation consiste à transformer un composé par réaction chimique pour modifier ses paramètres physico-chimiques tels que la solubilité, le point d'ébullition ou de fusion ou encore sa réactivité. En chromatographie, elle est généralement utilisée pour l'analyse de composés par GC, car elle permet d'augmenter la volatilité des molécules d'intérêt. En effet, le composé a besoin d'être volatilisé pour pouvoir être conduit par le gaz vecteur jusqu'à l'analyseur. Cependant, la dérivatisation est également parfois utilisée pour la LC car elle permet d'améliorer l'ionisation des composés dans la source du spectromètre de masse et augmente ainsi la sensibilité de la méthode [98]. En effet, les cannabinoïdes sont non-polaires et ne présentent pas de groupe facilement ionisable, ce qui entraîne une faible efficacité du processus d'ionisation avec l'électrospray et réduit ainsi la sensibilité des analyses [62]. A l'aide de la dérivatisation, le poids moléculaire est déplacé vers de plus hautes masses et la fragmentation peut donner naissance à des fragments plus spécifiques et plus intenses.

Lee et al. ont développé une méthode analytique pour doser le THC et le THCCOOH dans la salive après dérivatisation avec le chlorure de dansyle [78]. Leur technique permet d'obtenir des limites de détection (LOD) très basses de l'ordre de 5 et 2 pg/mL pour le THC et le THCCOOH

dansylé, respectivement. Nous avons pu reproduire leurs résultats pour le THC et le THCCOOH. Nous avons également testé cette méthode de dérivation pour les autres cannabinoïdes d'intérêt, en particulier les conjugués glucuronides et le THC-A. Les résultats obtenus sont présentés dans le paragraphe suivant. D'autres techniques impliquant différents réactifs ont été testées pour la dérivation des cannabinoïdes et sont également présentées dans le paragraphe suivant.

III.3.2.2. Evaluation de différents réactifs de dérivation

Nous avons essayé de reproduire les résultats obtenus par Lee et al. avec la dérivation avec le chlorure de dansyle. Les résultats obtenus et nos conclusions font l'objet d'une lettre à l'éditeur présentée en Annexe 1 [99]. La réaction de dérivation avec le chlorure de dansyle est présentée dans la Figure 9.

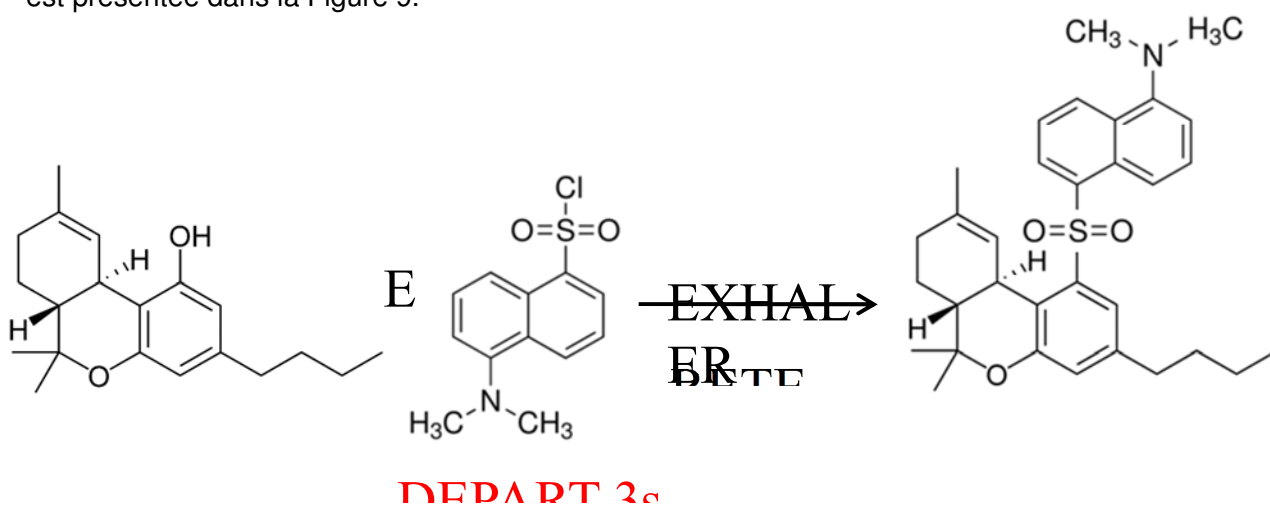


Figure 9. Dérivation chimique du THC par le chlorure de dansyle

La méthode présentée par Lee et al. est très prometteuse pour l'analyse de certains cannabinoïdes libres. En effet, comme l'indiquent les auteurs, nos analyses montrent que les LOD sont sensiblement réduites pour cinq composés : la LOD du THCCOOH, du 11-OH-THC et

du CBN passe de 100 à 5 pg/mL, celle du THC diminue de 50 à 25 pg/mL tandis que la LOD du CBD devient 50 pg/mL, alors qu'elle était de 300 pg/mL sans dérivation. Cependant, d'autres tests qui ont été menés avec le THC-A, le THC-gluc et le THCCOOH-gluc mettent quelques bémols sur le bienfondé de cette approche analytique. En effet, il n'a pas été possible de détecter les dérivés dansylés de ces trois cannabinoïdes. L'une des principales raisons qui pourrait expliquer cette non-détection concerne les conditions de dérivation : les composés doivent être incubés plusieurs minutes à 70°C en présence de chlorure de dansyle et la réaction se fait en milieu basique avec l'ajout de tampon de bicarbonate de sodium pour obtenir un pH de 10.5. Or, il a été démontré que le THC-A se dégrade au moins partiellement en THC sous l'effet de la chaleur [17]. De plus, des conditions basiques sont suffisantes pour hydrolyser le THCCOOH-glucuronide [29]. On peut également suggérer que ces conditions sont suffisantes pour hydrolyser au moins partiellement le THC-gluc. Ceci pourrait alors expliquer la non-détection de ces trois composés. Des analyses supplémentaires ont été menées dans les conditions indiquées par Lee et al. Plus de 30% du THCCOOH-gluc a été hydrolysé en THCCOOH, 10% de THC-A a été dégradé en THC et 4% de THC-gluc ont aussi mené à la formation de THC. Nous suggérons que le THC-A et le THC-gluc se dégradent aussi en d'autres composés non identifiés qui ne sont pas détectés par notre méthode. Même si ces molécules sont partiellement dégradées, des analyses d'échantillons réels de salive ont montré que le THC-A est présent en concentrations importantes dans le fluide oral [73]. Une méthode comme celle de Lee et al. peut donc introduire des biais dans la mesure quantitative des cannabinoïdes. Cette méthode est cependant recommandée dans le cadre d'une analyse purement qualitative, surtout si une sensibilité très élevée est requise.

D'autres essais ont été menés avec le chlorure de diméthyl-amino-benzoyle (DMABC, Figure 10). Ce composé est utilisé pour la dérivation des groupements alcools (-OH) dont on retrouve un groupe sur le cycle aromatique du THC et des autres cannabinoïdes investigués.

Les infusions (injections du standard analytique du composé directement dans la source du spectromètre de masse à un faible débit) montrent que le DMABC réagit très bien avec le THC, mais aucun ion spécifique n'est détecté pour le THC-A et les glucuronides. Le but étant d'augmenter la sensibilité de la méthode pour le THCCOOH et les glucuronides, la dérivatisation avec le DMABC n'a pas été retenue pour notre étude.

La picolylamine (PA, Figure 10) est un réactif de dérivatisation spécifique pour les acides carboxyliques utilisé par Coulter et al. [71]. Elle ne réagit donc pas avec le THC, mais devrait être active pour le THCCOOH, le THC-A et les glucuronides, qui tous contiennent une fonction carboxylique libre. La dérivatisation réalisée par Coulter se fait à 60°C. Les essais réalisés au laboratoire montrent que pour la dérivatisation, un chauffage à 40°C est suffisant pour détecter les dérivés picolylés du THCCOOH et du THC-A. Cependant, à 40°C, comme à 60°C, les infusions de THC-gluc et de THCCOOH-gluc ne présentent pas les ions spécifiques attendus pour ces composés. Ils ne peuvent donc pas être analysés par cette technique.

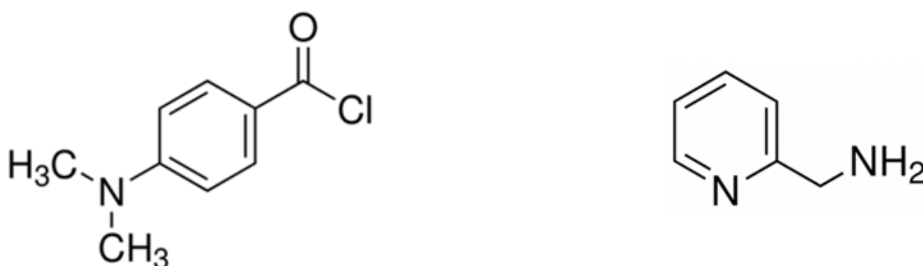


Figure 10. Structure chimique du chlorure de diméthylaminobenzoyl et de la picolylamine.

Les divers essais menés pour dériveriser les cannabinoïdes en vue d'augmenter la sensibilité de la détection du THCCOOH et des glucuronides n'ont pas permis d'identifier une réaction de dérivatisation efficace pour tous ces composés. Les conjugués glucuronidés ne peuvent donc

pas être quantifiés avec les différentes méthodes publiées et à ce jour, aucune méthode n'a permis des gains dans la détection de ces composés dans le fluide oral.

III.4. Description des analyses dans le sang

III.4.1. Analyses par GC-MS/MS

Les analyses des cannabinoïdes dans le sang des fumeurs occasionnels ont été effectuées avec une technique GC-MS/MS. Le THC, le-11-OH-THC et le THCCOOH ont été mesurés selon la méthode développée au laboratoire de Genève par le Dr. Aurélien Thomas [100] et utilisée en routine jusqu'au développement d'une méthode LC-MS/MS alternative. Les cannabinoïdes sont extraits du sang complet par un mélange hexane : acétate d'éthyle (9 : 1, v/v) puis dérivatisés avec de l'anhydride trifluoroacétique et de l'hexafluoro-2-propanol. La séparation chromatographique des dérivés fluorés des cannabinoïdes est effectuée sur un chromatographe Varian CP 3800 et la détection en spectrométrie de masse est réalisée sur un triple quadrupole Varian 1200 L MS/MS après ionisation chimique négative. Les limites de quantification (LOQ) obtenues sont de 0.5 ng/mL pour le THC et le 11-OH-THC et de 2.5 ng/mL pour le THCCOOH.

III.4.2. Analyses par LC-MS/MS

Les échantillons de sang des fumeurs réguliers ont été analysés par LC-MS/MS. La méthode a été validée sur une journée avec des contrôles de qualités (QC) communs aux analyses par LC-MS/MS et par GC-MS/MS. Ces QC ont donné des résultats statistiquement semblables avec les deux techniques. L'extraction du sang complet reste une extraction liquide-liquide avec le même mélange de solvants. L'étape de dérivatisation est supprimée. La séparation chromatographique est effectuée sur une colonne core-shell Kinetex™ C18 100A (50 x 2.1 mm) à l'aide d'un chromatographe Dionex UltiMate 3000 Rapid Separation LC. L'analyse en spectrométrie de

masse est effectuée à l'aide d'un triple quadrupole AB Sciex API 5000™ avec une ionisation par électrospray négative et positive, inspirée la méthode développée pour la salive [73] présentée dans le paragraphe III.3.1. Les LOQ du THC, du 11-OH-THC et du THCCOOH sont respectivement de 0.5, 1 et 2.5 ng/mL.

III.5. Adaptation et validation de la méthode pour la salive à l'analyse de la bile

Les glucuronides n'étant pas détectés dans la salive et difficiles à dériver, nous avons voulu étudier une autre matrice biologique pour démontrer l'utilité de la méthode développée. La bile est apparue comme la matrice biologique par excellence pour les glucuronides car l'excrétion biliaire est un moyen important pour l'élimination des métabolites de type II. De plus, il existe un cycle entéro-hépatique qui recycle ces métabolites après déconjugaison par des enzymes bactériennes de type glucuronidase. L'élimination complexe de ces métabolites a des impacts sur leur pharmacocinétique.

La méthode analytique développée pour la bile s'inspire fortement et reprend les principaux paramètres de la méthode dédiée à la salive et présentée plus haut (voir paragraphe III.3.1). L'extraction sur phase solide a été retenue car d'après les analyses précédentes, l'extraction liquide-liquide ne permet pas d'isoler les glucuronides. Bien qu'il s'agisse d'une adaptation de la méthode développée pour la salive et appliquée à la bile, la nouvelle méthode a été entièrement validée selon les recommandations de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP), comme s'il s'agissait d'une méthode créée *de novo*. Malgré un effet matrice relativement élevé, la méthode s'est révélée être suffisamment sensible pour le THC, le 11-OH-THC, le CBN, le CBD et surtout pour le THCCOOH, le THC-gluc et le THCCOOH-gluc. En effet, ces trois derniers composés ont été mesurés, comme on pouvait s'y attendre, en concentrations importantes dans les dix échantillons biliaires examinés. Les résultats obtenus

sont présentés dans le tableau 5 de l'article « Distribution of free and conjugated cannabinoids in human bile samples ».

III.5.1. Article 3 : Distribution of free and conjugated cannabinoids in human bile samples



Distribution of free and conjugated cannabinoids in human bile samples

Marie Fabritius, Christian Staub, Patrice Mangin, Christian Giroud*

Forensic Toxicology and Chemistry Unit, University Center of Legal Medicine Lausanne-Geneva, Rue du Bugnon 21, 1011 Lausanne, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 April 2012

Received in revised form 6 August 2012

Accepted 10 August 2012

Available online 11 September 2012

Keywords:

Tetrahydrocannabinol

THC

Glucuronides

Bile

Enterohepatic recirculation

LC-MS/MS

ABSTRACT

The metabolism of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) is relatively complex, and over 80 metabolites have been identified [1]. However, much less is known about the formation and fate of cannabinoid conjugates. Bile excretion is known to be an important route for the elimination of phase II metabolites. A liquid chromatography–tandem mass spectrometry LC-MS/MS procedure for measuring cannabinoids in oral fluid was adapted, validated and applied to 10 bile samples. THC, 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (11-OH-THC), 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCCOOH), cannabidiol (CBD), Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (THC-A), 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol glucuronide (THCCOOH-gluc) and Δ^9 -tetrahydrocannabinol glucuronide (THC-gluc) were determined following solid-phase extraction and LC-MS/MS. High concentrations of THCCOOH-gluc were found in bile samples (range: 139–21,275 ng/mL). Relatively high levels of THCCOOH (7.7–1548 ng/mL) and THC-gluc (38–1366 ng/mL) were also measured. THC-A, the plant precursor of THC, was the only cannabinoid that was not detected. These results show that biliary excretion is an important route of elimination for cannabinoids conjugates and that their enterohepatic recirculation is a significant factor to consider when analyzing blood elimination profiles of cannabinoids. Furthermore, we suggest that the bile is the matrix of choice for the screening of phase II cannabinoid metabolites.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Blood and urine are the matrices habitually used in forensic toxicology to demonstrate intoxication, a recent consumption of drugs or to determine causes of death. However, in the absence of these samples, analysis of bile could be helpful because a wide spectrum and significant amount of metabolites can be found in this matrix. The metabolism of cannabinoids is complex, with more than 80 metabolites thus far identified for Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) [1]. Phase-II metabolites are less well characterized, and data regarding the identity and excretion of conjugated metabolites of THC into bile is scarce. Metabolite recycling between the intestinal tract and liver via the biliary tract affects the pharmacokinetic parameters by extending the elimination half-life of the metabolites, and produces multiple peaks in subsequently analyzed blood time-profiles [2]. In 2005, Lin and Lin analyzed postmortem urine, heart blood, vitreous humor and bile specimens from 50 traffic fatality cases suspected of marijuana use [3]. The measured 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCCOOH) levels ranged from 1.03 to 43.7 $\mu\text{g/mL}$ in bile, whereas their concentrations in urine and heart blood were much lower (maximum were 2.28 $\mu\text{g/mL}$ and 1.36 $\mu\text{g/mL}$, respectively, in

2011. Gronewold and Skopp presented a case report on the study of the distribution of cannabinoids in man [4]. They found high concentrations of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol glucuronide (THCCOOH-gluc) and THCCOOH in bile, with a maximum of 11,160 and 990 ng/mL, respectively. They could also measure THC, cannabidiol (CBD), cannabidiol (CBD) and 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (11-OH-THC) in bile, while their detection and quantification methods were not always sensitive enough to detect the lower level of these cannabinoids in heart blood, femoral blood and urine. The same trends in bodily fluid distribution were observed for morphine and morphine-glucuronide conjugates. It is known that morphine is metabolized to morphine-3-glucuronide (M3G) and morphine-6-glucuronide (M6G). In 2010, Hasegawa et al. studied the pharmacokinetics of morphine and its glucuronide conjugates after intravenous administration of morphine [5]. They showed that morphine is excreted in tiny amounts in the bile, at percentage of 1.3% of the total body burden. Conversely, biliary excretion for M3G was significantly higher, at 13.3%. The presence of benzodiazepine glucuronide in bile was also investigated. St-Pierre and Pang [6] determined the concentration of diazepam and its metabolites, including their glucuronide conjugates, in bile after a dose of diazepam (20 $\mu\text{g/mL}$) was constant (average 10 $\mu\text{g/mL}$) over 12 h in man. They demonstrated that the enzyme hydrolysis in bile increases the concentrations of 4'-hydroxydiazepam and 4'-hydroxynordiazepam. This augmentation in the concentration

* Corresponding author.

E-mail address: christian.giroud@chuv.ch (C. Giroud).

after glucuronidase treatment indicated the presence of glucuronide conjugates in significant amounts in the bile. More recently, Roberts et al. published a review about the enterohepatic circulation [2], explaining how drugs could undergo enterohepatic recycling. According to their work, many drugs formed in the liver are excreted in human bile as conjugated metabolites, including morphine, diazepam or lorazepam and their hydrolysis by intestinal beta-glucuronidase is involved in their enterohepatic recirculation.

Studying metabolites that are present in bile may explain the long terminal half-life of many xenobiotics [4]. In this respect, it has been shown that THC and its major metabolites are characterized by a day-long terminal elimination half-life [7].

Recently, we developed an LC–MS/MS method for the analysis of a broad range of cannabinoids in oral fluid [8]. This method was adapted and validated to analyze bile samples. Bile is an aqueous compartment, slightly basic, capable of dissolving hydrophobic substances due to its bile salts which act as surfactants. Because of these mixed polar and nonpolar properties, we expected to find high quantities of THCCOOH-glyc and THC-glycuronide (THC-glyc) in bile. The aim of this study was to measure bile concentrations of CBN, CBD, THC and its free and conjugated main metabolites. In this regard, we selected bile samples from autopsy cases that are known to be positive for THC and/or THCCOOH in blood or urine.

2. Materials and methods

A comprehensive drug screening in urine and blood followed by the quantification of relevant toxic substances in blood had been performed during our routine procedure of postmortem toxicology investigations. Ten cases for which bile was available, and blood and/or urine specimens analysis revealed the presence of significant amounts of cannabinoids were selected for this study. Bile samples were collected at autopsy and stored at -20°C before analysis. The concentrations of the main cannabinoids in blood and urine determined by GC–MS after liquid/liquid extraction are listed in Table 1. THCCOOH was detected in all blood and/or urine samples, except for sample I. In this latter case, previous routine analysis indicated a THCCOOH level of 90 ng/mL in bile.

THC, 11-OH-THC, THCCOOH, CBN, CBD, Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (THC-A) and THCCOOH-glyc were used as the internal standards (THC- d_3 , 11-OH-THC- d_3 and THCCOOH- d_3 were purchased from Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA). THC-glyc was obtained from Biosity Laboratories, Inc. (Oxford MS, USA), extraction cartridges (Oasis HLB[®], 3 cc (60 mg)) were obtained from Waters (Baden-Dättwil, Switzerland). Acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany).

Calibration curves were prepared with drug-free bile samples that were spiked with a stock solution of cannabinoids (1, 5, 10, 50, 100 and 200 ng/mL for THCCOOH-glyc and THC-glyc, 1, 5, 10, 50, 100 and 100 ng/mL for THCCOOH, THC-A, 11-OH-THC, CBD and CBN). THC- d_3 was used as the CBN, CBD and THC-glyc and THCCOOH- d_3 was used for the quantification of THC-A and THCCOOH-glyc. The main cannabinoids were quantified with their structural homolog as the internal standard.

Table 1
Concentrations of THC, 11-OH-THC and THCCOOH in forensic blood and urine specimens determined by GC–MS after LLE during routine investigations. Concentrations are expressed in ng/mL (n.d., not detected; –, not analyzed).

Sample	Blood			Urine
	THC	11-OH-THC	THCCOOH	THCCOOH
A	20	10	21	420
B	–	–	–	1500
C	n.d.	n.d.	89	100
D	2.7	2.7	8	46
E	n.d.	n.d.	<5	–
F	29	16	49	>500
G	3.6	3.5	<5	170
H	–	–	–	470
I ^a	n.d.	n.d.	n.d.	–
J	1.9	n.d.	<5	152
Median	3.6	6.8	13.6	161

^a Previous routine analysis indicates a THCCOOH level of 90 ng/mL in bile.

For the analysis, 100 μL bile was mixed with 100 μL of an internal standard solution of 100 ng/mL THC- d_3 , 11-OH-THC- d_3 and THCCOOH- d_3 was added to each sample. An extraction cartridge (Oasis HLB[®], 3 cc (60 mg)) was added to each sample to 1 mL. The samples were vortexed for 5 s and sonicated for 5 additional minutes. Oasis HLB extraction columns were conditioned with 2 mL of MeOH, 2 mL of deionized water and 2 mL of ammonium formate buffer (10 mM, pH 6.5). The samples were loaded by gravity. The columns were washed with 4 mL of ammonium formate buffer (10 mM, pH 6.5):methanol (95:5, v/v) and dried under vacuum for 15 min. Cannabinoids were eluted with 3 mL of methanol. The eluates were evaporated to dryness and reconstituted in 100 μL of ammonium formate buffer (5 mM, pH 6.8):ACN (70:30). Chromatographic analyses were carried out using a Dionex UltiMate 3000 Rapid Separation LC system equipped with two binary pumps, an autosampler and a column oven compartment (Thermo Scientific, Olten, Switzerland). A Kinetex[™] C18 100A column (150 mm \times 2.1 mm i.d., 2.6 μm), (Phenomenex, Brechbühler, Echallens, Switzerland) was used for the chromatographic separation. The autosampler and column oven temperatures were set to 10°C and 40°C , respectively. A volume of 10 μL of sample was injected on the LC–MS/MS system. Gradient elution was performed using a mixture of ammonium formate buffer at 5 mM, pH 6.8 (A) and acetonitrile (B) at a flow rate of 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. The initial gradient conditions were 30% B, hold for 30 s, and then linearly increased to reach 90% B at 7 min. Conditions using 90% B were maintained for 2 min. Then, the gradient was decreased to 30% B over 30 s and held for 2.5 min. The LC system was coupled to an AB Sciex API 5000[™] triple quadrupole mass spectrometer interfaced with a Turbo V[™] source with a TurboIonSpray[®] probe (ESI). Both positive and negative polarities were employed: THCCOOH, THCCOOH-glyc, THC-glyc and THC-A were monitored in the negative ionization mode, whereas THC, 11-OH-THC, CBD and CBN were monitored in the positive ionization mode. Mass spectrometry transitions were recorded using a scheduled multiple reaction monitoring mode (MRM) with 3 separate time windows. The first time window (from start to 5.1 min) was operated in the negative ionization mode, whereas the second (from 5.1 to 6.4 min) and the third (from 6.4 to 7.5 min) were operated in the positive mode. The ion spray voltage was set to -4500 V for the negative polarity and $+5500\text{ V}$ for the positive polarity. The source temperature was set to 550°C for both cases. Analyst[®] 1.6 software was used to control the instrument and process the data. The selected ions and transitions used for quantification and confirmation, the corresponding internal standards and retention times are given in Table 2. The analyses were performed in duplicate. One of the two aliquots was diluted 100 times after extraction. The extracts were diluted appropriately in order to measure the cannabinoids levels within the calibration range.

The method was validated and tested according to the "Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques" (SFSTP) recommendations [9,10]. Limits of detection (LOD) and of quantification (LOQ), linearity, trueness, intra-day and intermediate precisions, extraction recovery and matrix effects were established.

Table 2
Cannabinoids and their internal standards, selected precursor and product ions, transitions, and retention times. Boldface type denotes quantifier transitions.

Compound name	Internal standard	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Tr (min)
THCCOOH-glyc	THCCOOH- d_3	519.2 518.2	343.2 342.2	3.24 3.26
THC-glyc	THC- d_3	313.2 312.2	313.2 312.2	3.32 3.34
THC-A	THCCOOH- d_3	357.1 357.1	313.2 345.0	4.68 4.68
THCCOOH	THCCOOH- d_3	343.2 343.2	209.2 191.1	4.87 4.87
11-OH-THC	11-OH-THC- d_3	331.3 331.3	313.2 193.1	5.25 5.25
CBD	THC- d_3	315.2 315.2	193.2 259.1	6.13 6.13
CBN	THC- d_3	311.2 311.2	203.2 179.2	6.68 6.68
THC	THC- d_3	313.2 315.2	193.2 259.1	7.02 7.02
THC- d_3		318.2 318.2	262.1 196.1	7.00 7.00
11-OH-THC- d_3		334.3 334.3	316.0 196.0	5.23 5.23
THCCOOH- d_3		352.2 352.2	308.1 194.2	4.84 4.84

Table 3
Limits of detection and quantification, calibration results for 8 cannabinoids in bile by SPE LC-MS/MS.

Analyte	Concentration range (ng/mL)	Slope (%RSD)	y-Intercept (%RSD)	R ² (n=3)	LOD	LOQ
THCCOOH-gluc	1.0–200	1.02 (5.4)	0.086 (2.5)	0.9991	0.5	0.8
THC-gluc	1.0–200	0.51 (4.5)	0.056 (2.1)	0.9982	0.5	0.8
THC-A	0.5–100	0.31 (5.1)	0.032 (6.9)	0.9975	0.1	0.5
THCCOOH	0.5–100	1.66 (6.8)	0.057 (1.1)	0.9986	0.1	0.5
11-OH-THC	0.5–100	0.12 (5.8)	0.016 (6.2)	0.9998	0.07	0.3
CBD	0.5–100	2.51 (3.4)	0.037 (3.2)	0.9996	0.1	0.4
THC	0.5–100	1.18 (4.7)	0.014 (1.8)	0.9995	0.05	0.4
CBN	0.5–100	2.62 (6.3)	0.029 (0.9)	0.9992	0.1	0.3

The LOD and LOQ values for each analyte were determined as the lowest and second lowest concentrations, respectively, that could be detected with an acceptable chromatographic peak shape.

The linearity of the response function was investigated in the concentration range of 1.0–200 ng/mL of bile for glucuronide conjugates and in the range of 0.5–100 ng/mL of bile for all other cannabinoids. Linearity was determined by calculation of the regression line by the method of least squares (1/x weighting factor) and expressed as the square of the correlation coefficient (R²). Calibration curves obtained on 3 different days were used to calculate the mean slope, the mean y-intercept and their coefficients of variation.

Four replicates at three different quality control sample concentrations (1.0, 75.0 and 200.0 ng/mL for THCCOOH-gluc and THC-gluc, 5.0, 40.0 and 100.0 ng/mL for the other cannabinoids) were added to drug-free bile samples and extracted as mentioned above on one day for the determination of intra-day precision and trueness parameters. The intermediate precision was assessed by evaluating the same concentration on three separate days.

Extraction recovery and matrix effects due to ion suppression or enhancement during the LC-MS/MS analysis of target molecules were determined according to the method proposed by Matuszewski et al. [11]. To determine the recovery, drug-free bile samples were spiked prior to and following SPE. Recovery was expressed as the mean analyte area of samples, for which the control solution was added before SPE (n = 4) divided by the mean analyte area of samples. Matrix effects were defined as the ratio between the mean analyte area of samples spiked after SPE and the mean analyte area of methanolic standard solution of cannabinoids.

3. Results

The sensitivity of the method was estimated by determining the LOD and LOQ values. The concentrations that satisfied the

wellness criteria for the LC-MS/MS method were between 0.3 and 0.8 ng/mL for all analytes. The LOD values were between 0.05 and 0.5 ng/mL (Table 3). The range of the calibration curves was 0.5–100 ng/mL for all free cannabinoids and 1.0–200 ng/mL for the glucuronides conjugates. As shown in Table 3, the correlation coefficients (R²) exceeded 0.9975 for all analytes.

Extraction recovery, matrix effects, trueness and intra-day and intermediate precisions experiments were performed at three concentrations covering the calibration range (Table 4). The bias between the average result (n = 4) and the spike value (trueness) was between –4.0% and 3.3% for all investigated cannabinoids. The intra-day and intermediate precisions did not exceed 5.8%. The extraction recoveries were greater than 80%, indicating an efficient extraction procedure. Although the matrix effect was relatively important (ion suppression between 20 and 80%), the LOQ values were low (between 0.3 and 0.8 ng/mL).

Blood concentrations of THC and 11-OH-THC and blood and urine levels of THCCOOH are shown in Table 1. THC concentrations ranged from below the limit of quantification (1.0 ng/mL whole blood) up to 29 ng/mL. THCCOOH levels ranged up to 49 ng/mL in blood and 1300 ng/mL in urine. Then, 10 bile samples were analyzed by SPE and LC-MS/MS. The results are given in Table 5. As expected, important concentrations of THCCOOH-gluc were found in bile samples. THCCOOH-gluc concentrations ranged between 100 and 2100 ng/mL with values that exceeded 10000 ng/mL

Table 4
Extraction recovery, matrix effects and intermediate precision of the LC-MS/MS method for cannabinoids.

Analyte	Spike level (ng/mL) (n=3)	Recovery (% mean ± SD)	Matrix effect (% ± SD)	Trueness (% bias)	Intra-day precision (% RSD)	Intermediate precision (% RSD)
THCCOOH-gluc	1.0	92 ± 5	-69 ± 2	0.1	2.5	2.5
	75.0	95 ± 4	-70 ± 3	-0.6	1.0	2.3
	200.0	96 ± 3	-68 ± 2	0.3	1.2	1.2
THC-gluc	1.0	90 ± 2	-65 ± 2	3.2	4.1	4.1
	75.0	92 ± 3	-68 ± 3	0.9	1.0	2.3
	200.0	92 ± 7	-67 ± 2	0.5	1.4	1.4
THC-A	5.0	97 ± 9	-21 ± 6	2.8	3.9	5.2
	40.0	93 ± 5	-20 ± 5	-1.7	2.8	3.0
	100.0	92 ± 5	-22 ± 3	-0.6	1.5	1.5
THCCOOH	5.0	84 ± 4	-38 ± 9	-4.0	5.8	5.8
	40.0	87 ± 4	-38 ± 7	3.3	1.8	2.1
	100.0	92 ± 5	-40 ± 6	1.5	1.1	1.4
11-OH-THC	5.0	95 ± 6	-57 ± 4	1.2	4.7	4.7
	40.0	97 ± 3	-65 ± 6	-0.8	2.3	2.4
	100.0	98 ± 3	-64 ± 3	0.6	1.6	1.1
CBD	5.0	92 ± 8	-41 ± 2	-0.3	5.1	5.2
	40.0	90 ± 5	-47 ± 2	1.6	1.5	1.7
	100.0	87 ± 8	-44 ± 5	0.5	1.8	1.8
THC	5.0	97 ± 4	-80 ± 1	1.7	4.7	4.7
	40.0	96 ± 4	-76 ± 3	-1.2	1.6	1.8
	100.0	96 ± 6	-75 ± 2	0.3	1.8	1.6
CBN	5.0	89 ± 6	-64 ± 2	-2.9	4.2	5.0
	40.0	94 ± 6	-65 ± 3	1.5	1.2	1.9
	100.0	96 ± 4	-63 ± 3	0.1	1.5	1.3

Table 5

Cannabinoid concentrations in bile determined by LC-MS/MS after SPE. Concentrations are expressed in ng/mL (n.d., not detected).

Sample	THCCOOH	THCCOOH-gluc	11-OH-THC	CBD	THC	CBN	THC-gluc
A	1432	19,312	42	2.5	8.9	4.2	324
B	318	14,812	20	4.9	12	14	1366
C	118	7178	15	<0.5	7.5	1.4	84
D	288	2607	13	7.3	2.8	1.5	35
E	7.7	139	<0.5	34	<0.5	n.d.	72
F	1548	19,431	67	32	11	25	377
G	149	5550	6.1	17	3.9	3.4	38
H	792	21,275	23	74	30	3.6	47
I	172	5420	10	80	11	1.5	33
J	272	12,132	10	29	20	0.6	86
Median	202	8655	15	22	7.5	3.4	78

mL. Similarly, THCCOOH and THC-gluc were found in relatively high concentrations. The median concentrations of THCCOOH and THC-gluc were 303 ng/mL and 78 ng/mL, respectively. 11-OH-THC, CBD, CBN and THC were detected in all samples (with an exception for CBN), but at a much lower concentration. THC-A, the precursor of THC in the cannabis plant, was the only cannabinoid that was not detected in bile samples.

4. Discussion

One of the key advantages of LC-MS/MS is that it allows the determination of relatively high-molecular weight conjugated metabolites without any prior derivatization or hydrolysis. In this respect, our method has proved to be quite suitable for the analysis in bile of a broad range of cannabinoids, i.e. THC, its free and conjugated metabolites, its parent compound (THC-A), its degradation product (CBN) and a related other plant cannabinoid (CBD). All validation parameters were within usual accepted ranges. The extraction recovery was excellent (more than 84%) as well as the intra-day and intermediate precisions (less than 6%). As the slopes of the calibration curves does not vary a lot between separate experiments (Table 3), we can assume that the sensitivity of the method remains unchanged for different batches of bile. These slopes remain the same regardless of the type of internal standard used, either a deuterated homolog or a structural analog. This observation indicates that accurate quantification of cannabinoids in bile can be achieved despite the absence of commercially available deuterated-labeled homologs. However, for precise determination of elimination time-curves and pharmacokinetic parameters, it is advocated to use in-house synthesized deuterated internal standards as shown by Wohlforth and coworkers for THC-A [12]. CBN and CBD were determined and found in relatively low concentrations in bile (Table 5). Compared to THC, a high concentration of CBN may indicate that the cannabis stuff used for rolling the joints was partly degraded with THC oxidized into CBN. On the other hand, a high CBD/THC ratio could indicate that medicinal cannabis had been taken because CBD shows interesting therapeutic properties. For instance, the cannabis medical type supplied by the Dutch Cannabis Bureau (BMC) has a relatively low THC content, and a high CBD content. In its recommendations on sample collection and systematic toxicological analysis, The International Association for Forensic Toxicology (IAFT) advocates the use of bile analysis in postmortem cases in which urine samples are not available. Actually, many drugs and poisons have been shown to concentrate in bile (e.g. narcotics, benzodiazepines, heavy metals). However, bile is more than an alternative specimen to urine, bile plays an important role in the excretion of xenobiotics, including drugs, and more specifically THC and their metabolites. Because of its mixed polar and lipophilic properties, charged and neutral molecules with relatively high molecular

weights (up to 500–600) can be excreted through the hepatobiliary route (e.g. THC-gluc molecular weight is 490). Small molecules are better excreted into the urine. Furthermore, ATP-binding cassette (ABC) transporters located in the hepatocyte canalicular membrane of mammalian liver are critical players in bile formation, detoxification, and excretion of phase-II metabolites [13]. Recently, Holland and coworkers have identified plant cannabinoids as novel modulators of the ABC transporters, P-glycoprotein (ABCB1 or P-gp) and ABCG2 [14]. Inhibition of the ABC11 transporter may have important clinical consequences because of its involvement in drug conjugates transport, and multidrug resistance, including anticancer drugs. The second mechanism which is of clinical and forensic importance is enterohepatic recycling. Intestinal reabsorption of deconjugated metabolites of THC may partly explain the long terminal half-life of the cannabinoids. In this regard, the elimination half-life in serum for THCCOOH was calculated to be 18 h by Glaz-Sandberg et al. [15]. Similarly, a terminal half-life of 4.1 days could be measured in plasma for THC [16]. Drugs excreted through the hepatobiliary route often show multiple peaks in their plasma elimination time-curves. This has been shown especially for THC [17]. Therefore, the determination of the distribution of cannabinoids in bile has forensic and clinical interest.

As mentioned before, bile may also contain high amounts of cannabinoids conjugates. In this respect, Gronewold and Skopp [4] found high concentrations of THCCOOH-gluc in a limited series of bile specimens taken from 4 postmortem cases. In this preliminary study, the presence of THC-gluc was not investigated. Our analyses revealed that, as predicted, high amounts of glucuronide conjugates of THC and THCCOOH were found in bile samples. It should be noted that Mazur et al. [18], using in vitro studies conducted with 12 human recombinant UDP-glucuronosyltransferase enzymes, failed to detect any formation of THC glucuronides. The detection of THC-gluc in bile partly refutes the hypothesis of Mazur et al. that THC is not a direct substrate for the human UGTs. Very likely, other UGTs than those investigated by Mazur and coworkers must be involved.

Although there is no cut-off value established with bile concentrations to distinguish between active and passive smoking, the high concentrations of cannabinoids strongly suggest active cannabis consumption. These analyses confirm the findings of THC and THCCOOH in blood. Therefore, bile samples can be easily used to demonstrate marijuana exposure, especially if post-mortem urine and/or blood samples are not available. Interestingly, for case I, we found a THCCOOH concentration slightly higher than the value determined earlier (122 ng/mL versus 90 ng/mL). This difference could be explained by hydrolysis of THCCOOH-gluc into THCCOOH in bile.

The presence in high quantities of metabolites in bile suggests the need to search for other conjugated cannabinoids, such as sulfate, glutathione, amino acids, and fatty acid [19,20] and

derivatives. Little is known about these less common cannabinoids metabolites, and bile could be an interesting biological matrix to detect such conjugates to study their bodily distribution.

THC-A was the only undetected cannabinoid in bile, whereas it was detected in oral fluid, reflecting buccal contamination during the smoking process [21]. It had also been detected at relatively low concentrations in the urine and serum by Jung *et al.* [22] and up to 1000 ng/mL in serum by Wohlfarth *et al.* [12]. It is thus likely that THC-A is either extensively oxidized and glucuronidated before excretion in bile occurs, and/or is present at concentrations lower than the LOD value of our method (0.5 ng/mL).

The study of metabolites of THC and CBD and CBN in bile could also help to understand the enterohepatic recirculation of cannabinoids. In a pharmacokinetic study, Garrett and Hunt [23] administered ^{14}C -THC intravenously to dogs and determined the levels of radiolabeled metabolites in plasma, urine, bile and feces. They showed that the data obtained were consistent with an enterohepatic recirculation of 10–15% of the THC metabolites. New investigations could now be conducted by mass spectrometry to study the metabolism, distribution and enterohepatic recirculation of THC metabolites. Other cannabinoids, such as CBD, and its 7-*ohc* acid metabolite, and their mutual glucuronide conjugates, could also be investigated in the same way. In this respect, it has been shown recently that cannabidiol is the cannabinoid that interacts most strongly with the ABC11 transporter which contribute to phase II metabolism and glucuronides transport [14].

5. Conclusion

This work describes the direct quantification of cannabinoids in bile samples. A broad range of compounds was investigated, including the glucuronide conjugates of THC and THCCOOH. All evaluated cannabinoids were found in the samples, except THC-A. As expected, high concentrations of glucuronide metabolites were determined, and significant levels of 11-OH-THC, CBD, CBN and THC were quantified in bile samples. As important quantities of conjugates were detected in bile, investigations on other conjugates, such as sulfates, could be considered in future studies. The results presented herein suggest that enterohepatic recirculation of THC and THC metabolites is of clinical and forensic importance. This mechanism may partly explain the complex kinetics of these molecules, the appearance of secondary peaks in blood time profiles, and their long elimination half-life.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Unit of Forensic Medicine at the University Center of Legal Medicine (CURML) and especially to Tania Da Costa, Marcin Slemasko and Alain Bouvet for providing the bile samples. They are grateful to the entire Unit of Forensic Toxicology of CURML and especially to Dr. Vincent Varlet for providing the autopsy cases and their results from blood and urine analyses. The authors would also like to thank the Swiss National Science Foundation (grant 31-1988.122407.1) and the Faculty of Biology and Medicine of the Lausanne University for their financial support.

References

- [1] T. Yoshimoto, K. Watanabe, S. Furumitsu, F. Yoshitama, Recent advances in the metabolism of cannabinoids, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27 (1995) 741–746.
- [2] M.S. Roberts, B.M. Magnusson, F.J. Burczynski, M. Weiss, Enterohepatic circulation: physiological, pharmacokinetic and clinical implications, *Clin. Pharmacokinet.* 41 (2002) 751–790.
- [3] D.L. Lin, R.L. Lin, Distribution of 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol in traffic fatality cases, *J. Anal. Toxicol.* 29 (2005) 58–61.
- [4] A. Gronewold, G. Skopp, A preliminary investigation on the distribution of cannabinoids in man, *Forensic Sci. Int.* 210 (2011) e7–e11.
- [5] Y. Hasegawa, S. Kishimoto, N. Shibata, H. Nomura, Y. Ishii, M. Onishi, N. Inotsume, Y. Takeuchi, S. Fukushima, The pharmacokinetics of morphine and its glucuronide conjugate in a rat model of streptozotocin-induced diabetes and the expression of MRP2, MRP3 and UGT2B1 in the liver, *J. Pharm. Pharmacol.* 62 (2010) 310–314.
- [6] M.V. St-Pierre, K.S. Pang, Determination of diazepam and its metabolites by high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography, *J. Chromatogr.* 421 (1987) 291–307.
- [7] S.W. Toennes, J.G. Ramaekers, E.L. Theunissen, M.R. Moeller, G.F. Kauer, Comparison of cannabinoid pharmacokinetic properties in occasional and heavy users smoking a marijuana or placebo joint, *J. Anal. Toxicol.* 32 (2008) 470–477.
- [8] M. Fabrisius, C. Staub, F. Idanagic, C. Glaser, Analysis of cannabinoids in oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Forensic Toxicol.*, accepted for publication.
- [9] P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chlap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Laurentie, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal – part II, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 70–81.
- [10] P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal – part III, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 82–96.
- [11] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019–3030.
- [12] A. Wohlfarth, N. Roth, V. Auwärter, LC-MS/MS analysis of delta-9-tetrahydrocannabinolic acid A in serum after protein precipitation using an in-house synthesized deuterated internal standard, *J. Mass Spectrom.* 47 (2012) 778–785.
- [13] H. Kipp, I.M. Arias, Trafficking of canalicular ABC transporters in hepatocytes, *Annu. Rev. Physiol.* 64 (2002) 595–608.
- [14] M.L. Holland, J.D. Allen, J.C. Arnold, Interaction of plant cannabinoids with the multidrug transporter ABC11 (MRP1), *Eur. J. Pharmacol.* 591 (2008) 128–131.
- [15] A. Glas-Sandberg, L. Dietz, H. Nguyen, H. Oberwittler, B. Aderjan, G. Mikus, Pharmacokinetics of 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) after intravenous administration of THC in healthy human subjects, *Chin. Pharmacol. Ther.* 28 (2007) 82–88.
- [16] R. Yamamoto, S. Aoyagi, J.R. Hollister, HPLC-MS/MS study of conjugates in the urine of chronic marijuana users, *J. Pharm. Pharmacol.* 49 (1997) 979–979.
- [17] M.A. Huestic, Pharmacokinetics and metabolism of the plant cannabinoids delta-9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabivarin, *Handb. Exp. Pharmacol.* (2005) 637–680.
- [18] A. Sliemers, C.P. Licht, P.L. Frutcher, A.R. Zelikovic, S.M. Brinson, A. Galles-Zetwiler, M. Stoeckli, G.J. Miller, A. Redentinos-Pedraza, J.J. Brown, Characterization of human hepatic and extrahepatic UDP-glucosyltransferase enzymes involved in the metabolism of plant cannabinoids, *Drug Metab. Dispos.* 37 (2009) 1466–1474.
- [19] S.E. Huestic, Human cannabinoid pharmacokinetics, *Chem. Biol.* 4 (2007) 1770–1804.
- [20] R.G. Lehigh, A.E. Pentimosa Jr., R.L. Folts, Long-retained metabolites of delta-9- and delta-9-tetrahydrocannabinol identified as novel fatty acid conjugates, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 14 (1976) 13–28.
- [21] G. Moore, S. Rana, C. Couder, Simultaneous identification of 9-carboxy-tetrahydrocannabinol, tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabivarin in oral fluid, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Appl.* 832 (2007) 439–464.
- [22] J. Jung, Y. Kemp, B. Meilzer, W. Weinmann, Detection of delta-9-tetrahydrocannabinolic acid A in human urine and blood serum by LC-MS/MS, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 2854–2859.
- [23] R.E. Garrett, C.A. Hunt, Pharmacokinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in dogs, *J. Pharm. Sci.* 66 (1977) 395–407.

III.6. Description des analyses dans l'urine

Les échantillons urinaires fournis par les volontaires dans le cadre de l'étude ont été analysés au laboratoire de Genève.

Une première analyse a d'abord été réalisée avec la méthode utilisée en routine. Au THCCOOH analysé dans la méthode, nous avons ajouté l'acide tétrahydrocannabivarique (THCVCOOH). Dans l'urine, les cannabinoïdes sont souvent conjugués avec l'acide glucuronique ou éventuellement avec des sulfates. Une étape d'hydrolyse avec du KOH concentré permet de convertir les glucuronides en leurs métabolites libres. Ensuite, après acidification, les cannabinoïdes sont extraits avec un mélange hexane : acétate d'éthyle (9 : 1, v/v). Le solvant organique est évaporé à sec sous flux d'azote. Les échantillons sont repris et injectés dans le système LC-MS/MS. Les résultats obtenus reflètent théoriquement la somme des concentrations des métabolites libres et conjugués hydrolysables en conditions basiques. Pour le THCVCOOH, cette méthode a été partiellement validée. Le domaine de linéarité a été testé de 1 à 100 µg/L. Le coefficient de corrélation est de 0.9947. La justesse, les coefficients de variation (CV) de répétabilité ont été déterminés sur une journée à l'aide de contrôles qualités fortifiés (QC) à 4 niveaux de concentration (1, 20, 60 et 100 µg/L) répartis le long du domaine de linéarité. La justesse est comprise entre 92 et 111 % et les CV de répétabilité sont compris entre 3 et 14 % pour les 4 niveaux de concentration.

Une deuxième analyse en mode « dilute and shoot » est également effectuée. Dans ce cas, 100 µL d'urine sont mélangés à 900 µL de méthanol. On ajoute 10 µL d'une solution de standards internes de THCCOOH-d9 et THCCOOH-glucuronide-d3 afin d'obtenir une concentration de 10 µg/L. Enfin, 10 µL du mélange sont injectés en LC-MS/MS. Cette méthode a été validée sur trois jours selon les recommandations de la SFSTP. Le domaine de linéarité a été testé de 5 à 250 µg/L pour le THCCOOH et le THCCOOH-gluc, et de 1 à 100 µg/L pour le THCVCOOH et le THC-gluc. Le coefficient de corrélation est supérieur à 0.999 pour les quatre cannabinoïdes. La

justesse a été évaluée avec des QC à 4 niveaux de concentrations (5, 20, 75 et 200 µg/L pour le THCCOOH et le THCCOOH-gluc et 1, 20, 60 et 100 µg/L pour le THCVCOOH et le THC-gluc). Chaque niveau est analysé à quadruple. La justesse obtenue est comprise entre 95 et 104% pour tous les composés. Les CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont compris entre 0.5 et 12 % pour chaque analyte et chaque niveau de concentration. Les limites de quantification sont de 5 µg/L pour le THCCOOH et le THCCOOH-gluc et 1 µg/L pour le THCVCOOH et le THC-gluc. Cette méthode permet l'analyse rapide des conjugués glucuronides puisqu'aucune étape d'hydrolyse n'est effectuée. Contrairement à la méthode par extraction après hydrolyse, les résultats obtenus dans ce cas représentent les concentrations individuelles des molécules libres et conjugués.

IV. Résultats de l'étude cannabis / IRMf / conduite automobile

IV.1. Présentation et interprétation des résultats d'analyses dans les fluides biologiques

Les échantillons de sang et de fluide oral de l'étude cannabis / IRMf / conduite automobile ont été analysés par les méthodes décrites dans le chapitre précédent. Ils ont permis d'obtenir les profils cinétiques et de déterminer les paramètres pharmacocinétiques du THC, du 11-OH-THC et du THCCOOH dans le sang, ainsi que du THC, du THC-A, du CBN et du THCCOOH dans la salive. Il ressort de ces résultats que la concentration maximale médiane en THC mesurée dans le sang n'est pas significativement différente entre les deux groupes de fumeurs, probablement parce qu'une quantité similaire de THC a été inhalée. L'aire sous la courbe du THC reflétant essentiellement l'inhalation de l'étude (et n'inclut pas les inhalations antérieures) n'est que marginalement différente entre les deux groupes. Les résultats montrent aussi que le THC et, dans une moindre mesure, le THC-A sont mesurés en concentrations importantes dans la salive, confirmant une contamination de la cavité buccale au moment de l'inhalation du joint. Comme le THC-A n'est pas présent dans de nombreuses préparations thérapeutiques de cannabis (Sativex®¹ ou dronabinol™), nous suggérons qu'il pourrait être utilisé comme marqueur de consommation de cannabis illégal. De plus, que ce soit dans le sang ou le fluide oral, les concentrations en THCCOOH avant l'inhalation du joint sont significativement différentes entre les fumeurs réguliers et occasionnels. Enfin, les analyses des questionnaires subjectifs évaluant les effets du cannabis ont montré que les fumeurs réguliers se sentent nettement moins confus après l'inhalation d'un joint que les fumeurs occasionnels. Ceci est en accord avec une tolérance vis-à-vis des effets négatifs du cannabis qui s'est développée en raison d'un usage chronique. Il convient de souligner que les deux groupes se sont sentis

¹ Communication d'Ethan Russo, Senior Medical Advisor chez GW Pharmaceuticals

intoxiqués après avoir fumé et que l'effet de tolérance s'est manifesté pour le sentiment de confusion uniquement.

IV.1.1. Article 4 : Comparison of cannabinoid concentrations in oral fluid and whole blood between occasional and regular cannabis smokers prior to and after smoking a cannabis joint

Comparison of cannabinoid concentrations in oral fluid and whole blood between occasional and regular cannabis smokers prior to and after smoking a cannabis joint

Marc Fabritius · Matthew Chubb · Giovanni Battistella · Jean-Marie Azzou · Kim Dao · Bernard Favrat · Eleonora Fornari · Estelle Lauer · Philippe Maeder · Christian Giroud

Received: 18 July 2013 / Revised: 26 September 2013 / Accepted: 2 October 2013 / Published online: 8 November 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract A cross-over controlled administration study of smoked cannabis was carried out on occasional and heavy smokers. The participants smoked a joint (11 % Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC)) or a matching placebo on two different occasions. Whole blood (WB) and oral fluid (OF) samples were collected before and up to 3.5 h after smoking the joints. Pharmacokinetic analyses were obtained from these data. Questionnaires assessing the subjective effects were

administered to the subjects during each session before and after the smoking time period. THC, 11-hydroxy-THC (11-OH-THC) and 11-*nor*-9-carboxy-THC (THCCOOH) were analyzed in the blood by gas chromatography or liquid chromatography (LC)-tandem mass spectrometry (MS/MS). The determination of THC, THCCOOH, cannabinol (CBN), and Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (THC-A) was carried out on OF only using LC-MS/MS. In line with the widely accepted assumption that cannabis smoking results in a strong contamination of the oral cavity, we found that THC, and also THC-A, shows a sharp, high concentration peak just after smoking, with a rapid decrease in these levels within 3 h. No obvious differences were found between both groups concerning THC median maximum concentrations measured either in blood or in OF; these levels were equal to 1,338 and 1,041 $\mu\text{g/L}$ in OF and to 82 and 94 $\mu\text{g/L}$ in WB for occasional and heavy smokers, respectively. The initial WB THCCOOH concentration was much higher in regular smokers than in occasional users. Compared with the occasional smokers, the sensation of confusion felt by the regular smokers was much less while the feeling of intoxication remained almost unchanged.

M. Fabritius · C. Giroud (✉)
UTCF (Forensic Toxicology and Chemistry Unit), CURML
(University Center of Legal Medicine), Rue du Bugnon 21,
1011 Lausanne, Switzerland
e-mail: christian.giroud@chuv.ch

H. Chubb · K. Dao
Division of Clinical Pharmacology and Toxicology, Centre
Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), Av. de Beaumont 29,
1011 Lausanne, Switzerland

G. Battistella · E. Fornari · P. Maeder
Department of Medicine, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois
(CHUV), Rue du Bugnon 26, 1011 Lausanne, Switzerland

J.-M. Azzou
Neurology Unit, Department of Medicine, University of Fribourg,
Chemin de l'Écluse 2, 1700 Fribourg, Switzerland

B. Favrat
UMPT (Unit of Psychology and Traffic Medicine), CURML
(University Center of Legal Medicine), 1011 Lausanne, Switzerland

E. Fornari
CIBM Centre d'Imagerie BioMédicale, Centre Hospitalier
Universitaire Vaudois unit, 1015 Lausanne, Switzerland

E. Lauer
UTCF (Forensic Toxicology and Chemistry Unit), CURML
(University Center of Legal Medicine), 1211 Geneva, Switzerland

Keywords Cannabis · Pharmacokinetic · Oral fluid · Whole blood · Heavy use · Occasional use

Introduction

Cannabis is the most widely used illegal drug in the world, and Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) is frequently detected in the blood or oral fluid (OF) of impaired drivers arrested for erratic driving or involved in road accidents [1, 2]. Accurate measurements and proper interpretation of cannabinoid concentrations

are therefore important in order to reconstruct the accident scene, to evaluate the exact time of consumption, and to assess the level of driving impairment. In this regard, the ability (short-term) and fitness (long-term) to drive can be influenced by many parameters. One of them is the frequency of cannabis use. Several studies suggest that heavy cannabis smokers are less likely to feel the desired effects, as well as the adverse symptoms, of acute cannabis smoking when compared with light users [3]. One key issue is therefore to find identification criteria that allow the distinction between these two groups of consumers. In this respect, questionnaires and brief medical examinations have a limited reliability. In general, it is preferable to rely on objective data which complement the aforementioned subjective observations. Chronic use can be assessed by measuring cannabinoid concentrations in hair. However, this matrix is not always available, or can be contaminated by cannabis smoke [4] or by contact with dirty hands, thus making its interpretation quite challenging. Furthermore, in comparative studies, discrepancies were found between "positive" urine specimens and hair tested as "negative" [5, 6]. Thus, measurement of cannabinoids in biofluids offers another strategy. To this end, Daldrup et al. [7] have shown that, if the serum concentration of THCCOOH is lower than 5 µg/L, the consumption is assumed to be occasional while levels above 75 µg/L are associated with regular use. This criterion could be applied in routine forensic examinations provided serum samples are taken within a prescribed 8-day period following the last cannabis use [6].

To demonstrate that the defendant or the car driver was under the influence of cannabis during a relevant event, one would demonstrate that blood levels of active cannabinoids at the time of the event were compatible with the impending effects of cannabis. Another possibility is to show that the time lapse between exposure to cannabis and the event was less than a few hours. In this respect, OF and blood determination of cannabinoids can be helpful. Detection of THC in OF has been associated with a strong contamination of the oral cavity during smoking and to a recent cannabis use. On the other hand, THC and its metabolites are only poorly excreted from the blood and tissues into this matrix. In line with these observations, analysis of OF revealed very high concentrations of THC in OF just after cannabis smoking, while 11-hydroxy-THC (11-OH-THC) was not detected and only trace amounts of 11-nor-9-carboxy-THC (THCCOOH) were measured [8]. Studies that used intravenous administration of THC have suggested that the transfer of THC from the blood into OF is limited [9]. Since THCCOOH is not known to be present in cannabis smoke, its detection in OF could only result from active cannabis consumption.

Knowledge of the pharmacokinetic (PK) parameters of cannabinoids in blood and saliva and of their mutual relationship with drug effects should also help to assess the level of impairment of the driver. On the other hand, the determination

of cannabinoids in urine can be used to demonstrate a cannabis exposure. In 2001, in a study on the detection of THC in OF, Niedbala et al. [10] showed that, during the elimination phase, THC levels in OF follow a similar decrease to those observed in plasma after cannabis smoking. In 2004, Huestis and Cone [11] obtained the same results using a controlled administration of smoked cannabis. More recently, Laloup et al. studied the correlation of THC concentrations in OF and plasma [12]. Their results indicated a good correlation between OF and plasma concentrations and were in concordance with studies of Toennes et al. [13, 14]. However, although THC is now commonly detected in OF, there is still little information about other cannabinoids and the determination of their PK parameters in simultaneously, or near-simultaneously, collected blood and OF specimens. Recently, Lee et al. investigated the change in the OF/plasma cannabinoid ratios following controlled oral THC and smoked cannabis administration [15]. They suggest that a direct prediction of plasma THC concentrations based on OF levels is not appropriate. On the other hand, OF THCCOOH could estimate plasma THCCOOH levels. Throughout the last decade, several studies have been carried out to determine PK parameters of cannabinoids in blood, plasma, or serum [16–21] in humans. Some other studies were performed with oral fluid only [22] or in tandem with serum [23] or plasma [11, 24] with a limited number of ten participants in each study. Two, three, and more compartment PK and kinetic models have been applied with varying degrees of success to describe the cannabinoid time profiles [25]. Non-compartmental and PK/pharmacodynamic approaches were also used. No general consensus could be reached from any of these studies.

In this study, 20 heavy and 25 occasional cannabis users smoked cannabis or a placebo joint during two separate sessions. Whole blood (WB) and OF samples were collected before and up to 3.5 h after smoking a joint or a placebo. PK parameters of THC, 11-OH-THC, THCCOOH in WB, and of THC, THCCOOH, cannabinol (CBN) and THC acid A (THC-A) in OF were determined. The most salient features that distinguish the kinetic profiles of the two consumer groups are presented. The kinetic profiles are correlated to two typical subjective effects of cannabis. We also outline the usefulness of THC-A as a possible marker of cannabis smoking.

Experimental

Study design

The overall design of the study has been described in a previous publication and its supportive information [26]. The study was expanded in order to include regular cannabis smokers. The methods are briefly described below. Forty-

eight healthy male volunteers between 18 and 30 years old, 23 heavy smokers, and 25 occasional smokers, who completed the sessions successfully, are included in this study. All participants underwent a structured interview conducted by a medical staff (psychiatrist, clinician, and research technician). The mean consumption of cannabis during the 3 months preceding inclusion in the study was set to a minimum of one joint per month and a maximum of one joint per week for occasional smokers, while it was set to a minimum of ten joints per month (i.e., 2.3 joints/week) and possibly less than three joints per day for heavy smokers. These criteria were in accordance with those of Toennes et al. [21], who considered a use higher than four times per week for heavy smokers and a weekly use or less for the occasional cannabis users. Very heavy cannabis smokers (up to several dozen joints per day) were excluded because we considered them unable to refrain from smoking during a full day and, above all, the day they had to smoke the placebo. Volunteers who used any illegal drug (cocaine, amphetamines, and opiates) other than cannabis were also excluded from the study. The urine test for THC metabolites was required to be positive for subjects enrolled in the group of regular smokers, but it could either be positive or negative in occasional users. Subjects recruited for the study participated in two independent cross-over experimental sessions where they smoked either a joint of pure cannabis (Bedrobinol, 11 % total THC (less than 0.5 % free THC [27]), <1 % CBD, obtained from Bedrocan, Vceendam, The Netherlands) or a placebo (Santhica variety, no THC, < 0.1 % CBD, provided by the French National Federation of Hemp Growers, ENPC, Le Mans, France). Throughout the day, WB and OF samples were collected. OF samples from occasional smokers were collected a few minutes before inhalation ($t=0$ h) and afterwards at 0.65 and 2.75 h. OF samples from heavy smokers were collected a few minutes before inhalation ($t=0$ h) and at 0.35, 0.65, 1.9, 2.75, and 3.5 h after inhalation. Specimens were stored for a few hours at room temperature before freezing and storage at -80 °C. WB samples were taken a few minutes before inhalation ($t=0$ h) and at 0.2, 0.3, 0.4, 0.65, 1.9, 2.5, and 3.5 h after smoking the joint. Samples were immediately frozen and kept at -80 °C before analysis. For occasional smokers, the last blood sample was omitted because experimental sessions should not last more than 3 h after inhalation. On six occasions during the experimental day, volunteers were also asked to fill out questionnaires on the subjectively experienced effects of smoking a joint. Subjective effects were assessed by asking participants to indicate the intensity of their feeling on a 100-mm visual analog scale (VAS) between 0 (no effect) and 100 (most intense effect ever felt). The questionnaires were administered at regular time intervals before and after smoking the cannabis joint or its matching placebo.

This study was approved by the Cantonal Research Ethics Committee (Vaud). The subjects gave written informed

consent and received financial compensation for their participation.

Joint masking and inhalation protocol

The cannabis plant material (0.7 g Bedrobinol or 0.8 g Santhica variety) was chopped, and the pure ground-up buds were added to a pre-rolled king-size joint with a roach. The joints were of identical size and were visually indistinguishable. The enrolled subjects smoked the joints according to a fixed paced procedure. Each inhalation cycle was composed of four steps: getting ready and start signal, 3 s; inhalation, 2 s; breath-holding, 5 s; exhalation and rest, 50 s. This sequence was repeated until two thirds of the joint was consumed, up to a line drawn 3 cm above the cardboard filter.

Estimation of the usual and actual smoked amount of cannabis

So as to create the most realistic conditions for the subjects, the volunteers were asked about their smoking habits and ways of preparing joints. To estimate the amount of cannabis used to prepare a self-made joint, a picture showing a joint and increasing amounts of cannabis and tobacco, and a metric scale, was shown to each participant. The self-reported amount of cannabis used to make a joint was divided by the number of participants sharing the same joint in a joint session. The quantity actually smoked during this experiment was determined by weighing the initial amount of cannabis put into the joint and subtracting the residual amount found in the left part and in the butt. In contrast to the usual habits of smokers, the marijuana was not mixed with tobacco in order to eliminate any nicotine effects.

Materials

THC, 11-OH-THC, THCCOOH, CBN, CBD, THC-A, and internal standards THC- d_3 , 11-OH-THC- d_3 , THCCOOH- d_3 were purchased from Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA). Oral fluid samples were collected with a Quantisal™ (nal von minden GmbH, Regensburg, Germany) device for heavy smokers and with Salivette® (Sarstedt AG, Sevelen, Switzerland) for occasional users. When the study began with the occasional consumers, the Quantisal™ collection device was still uncommon and the data relating to its use were very incomplete. In recent years, published results have demonstrated the superiority of the Quantisal™ over the Salivette® sampling device [28], which is why it was selected for the heavy smokers.

Methods of analysis

Analyses of OF samples were performed according to a previously published procedure [8]. The collection devices were weighed before and after OF sampling to determine the quantity of OF collected. The concentrations were then expressed in nanograms per milliliter of undiluted OF. OF was extracted from the collection device by centrifugation (Salivette®) or by squeezing the pad onto the walls of the plastic tube (Quantisal™). Subsequently, methanol (1.5 mL) was added to the saliva collector to wash off the residual cannabinoids. The methanolic extracts were evaporated to dryness under N₂ before adding the OF samples. The cannabinoids were then extracted by a LLE with heptane/ethyl acetate (4:1, v/v). Chromatographic separation was achieved using a Dionex UltiMate 3000 Rapid Separation LC system equipped with a Kinetex C18 100A column (150×2.1 mm). Tandem mass spectrometry (MS/MS) operated either in negative or positive electrospray ionization mode was carried out on an ABSciex API 5000™ triple quadrupole system. Limits of quantification (LOQs) were 0.5 µg/L for THC, THC-Δ₈, CBN, and CBG and 0.5 µg/L for THCCOOH.

The blood samples of the occasional smokers were analyzed according to the procedure described by Thomas et al. [29]. The cannabinoids were extracted from 500 µL of WB by a simple liquid–liquid extraction with hexane/ethyl acetate (9:1, v/v) and then derivatized with a mixture of trifluoroacetic anhydride and hexafluoro-2-propanol as fluorinated agents. Mass spectrometric detection of the analytes was performed in the selected reaction-monitoring mode on a Varian 1200 L MS/MS triple quadrupole instrument after negative-ion chemical ionization. The LOQs of the method were 0.5 µg/L for THC and 11-OH-THC and 2.5 µg/L for THCCOOH.

WB samples of the regular smokers were extracted using the same procedure but analyzed by LC-MS/MS without a derivatization step. The ion transitions, MS parameters, and LC-MS/MS equipment were the same as those described in the method used for the analysis of OF samples. The LC-MS/MS method used for the analysis of blood specimens was validated according to the recommendations of the “Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques”. The same quality control (QC) specimens were used to cross-validate the gas chromatography-MS/MS and the LC-MS/MS methods. The two techniques gave the same results for the analysis of the QCs; no significant difference was therefore observed between both methods. The LC-MS/MS method was linear for THC and 11-OH-THC from 0.5 to 20 µg/L and for THCCOOH from 2.5 to 100 µg/L. The trueness was determined with four QC (0.5, 1, 10, 20 µg/L for THC and 11-OH-THC and 2.5, 10, 50, 100 µg/L for THCCOOH) analyzed four times on the same day. The results ranged between 86 and 115 %. The coefficients

of variation (CV) of interday and intermediate precisions were lower than 15 % in all cases, except for 11-OH-THC at a concentration of 0.5 µg/L (25.8 %). LOQ values were determined at the lower QC with trueness higher than 85 % and CVs lower than 20 %. LOQs were 0.5, 1, and 2.5 µg/L for THC, 11-OH-THC, and THCCOOH, respectively.

Evaluation of the data

The concentration–time profiles were analyzed with a non-compartmental PK approach, using Microsoft Excel 2007. The maximum concentrations (C_{max}) and their corresponding times (T_{max}) were obtained from the kinetics. The elimination half-lives (T_{1/2}) were calculated by log-linear regression of the concentration–time curves (from the result of exponential regression of the data). The areas under the curves (AUC) were estimated using the trapezoidal rule.

Results and discussion

Sociodemographic comparison of occasional and heavy cannabis smokers

The sociodemographic characteristics are presented in Table 1. The mean (SD) age was 23.9 (3.0) for occasional and 22.7 (2.4) years for heavy smokers. Paper-wrapped joints filled with a half-half mixture of marijuana and tobacco was the preferred way of consumption as reported in the self-administered questionnaires. On average, the cannabis joints were smoked from 3.5 to 77.9 occasions per month over the past 3 months preceding the study, depending on whether they were occasional or heavy smokers. When taking into account the fact that joints are shared by several smokers, all participants included in the group of occasional users smoked one or less joint per week. Weekly consumption in heavy cannabis smokers was more evenly distributed between 2 and 13 joints per week. One smoker admitted to consuming 25 joints per week. Consequently, all the occasional users met the inclusion criterion set for the frequency of use (between one joint per month and one joint per week). The heavy smokers met the minimum frequency of use considered as mandatory for inclusion in this group (between ten joints per month and two joints per day). The subjects of both groups started to smoke cannabis at a median age of 16.3 years. Their way of smoking differed considerably. The heavy smokers reported inhaling more deeply and preferring higher-dose joints than the occasional subjects. Finally, it is interesting to note that almost all the occasional smokers (22 out of 25) had a driving license, whereas only 14 heavy cannabis users (out of 23) had one.

Table 1 Sociodemographic characteristics and self-rated patterns of cannabis use in occasional and heavy smokers

	Number	Mean	SD	Median	Maximum	Minimum
Occasional smokers						
Age		23.9	3.0	24	29	19
Ethnicity	Caucasian (23), Asian (1), Eurafrikan (1)					
Driving license	22 (21 car, 1 motorbike)					
Age at first cannabis use		16.3	2.9	16	23	9
Total years of lifetime cannabis use		7.6	3.2	7	15	4
Preferred forms of cannabis	Marijuana (21), hashish (11), hashish oil (5), pollen (2)					
Preferred methods of consumption	Joint (25), water pipe (bong, bhang) (7), pipe (chillum, sebsi) (10), cigar (blunt) (3), vaporizer (1)					
Assessment of the usual size of a joint (grams)		0.4	0.3	0.3	1.0	0.1
Estimation of the [%] of cannabis in the cannabis/tobacco mix		47	18	50	70	20
Frequency of use (occasions/month, last 3 months)		3.5	2.3	3.5	10	1
Number of people with whom the joint is shared		3.3	1.0	3.5	5	2
Prefer light (L) or strong (S) cannabis	15 L, 9 S					
Usually inhale deeply (yes/no)	7 Y, 20 N					
Heavy smokers						
Age		22.7	2.4	22	28	19
Ethnicity	Caucasian (20), Asian (1), Eurafrikan (2)					
Driving license	14					
Age at first cannabis use		16.3	2.3	16	20	12
Total years of lifetime cannabis use		6.3	2.9	6	13	2
Preferred forms of cannabis	Marijuana (23), hashish (14), pollen (4)					
Preferred methods of consumption	Joint (23), water pipe (bong, bhang) (18), pipe (chillum, sebsi) (17), cigar (blunt) (2), vaporizer (2)					
Assessment of the usual size of a joint (grams)		0.4	0.1	0.4	1.0	0.1
Estimation of the [%] of cannabis in the cannabis/tobacco mix		52	15	50	70	15
Frequency of use (occasions/month, last 3 months)		7.2	3.1	5.5	25	2
Number of people with whom the joint is shared		2.5	0.9	2.5	4	0
Prefer light (L) or strong (S) cannabis	8 L, 15 S					
Usually inhale deeply (yes/no)	19 Y, 4 N					

Comparison of the usual and actual smoked amounts of cannabis

The usual amount smoked varied considerably between individuals and frequency of use, with a median quantity of 0.3 g for occasional smokers and 0.4 g for regular users. The actual quantity of cannabis smoked was equal to 0.39 g for both groups, with little variance for heavy smokers and a slightly wider variance for occasional users. Taking into consideration a mean concentration of 11 % THC in the Bedrobinol head tops, the total quantity of THC used during each smoking session was estimated at around 43 mg. By way of comparison, Mariani et al. [30] reported that an amount of 0.66 g is used in making joints in the USA (generally uncut with tobacco) while typical European joints contain 0.33–0.40 g of plant material and 20–50 mg of THC. The typical THC concentration was reported to be around 8 % for marijuana and 10 % for hashish in France in 2010 (OFDT report, 2012);

corresponding results reported by the Swiss Society of Forensic Toxicology were 11 % THC for marijuana and 16.8 % for hashish for the second semester of 2012.

Kinetic profiles and pharmacokinetic parameters of THC, 11-OH-THC, and THCCOOH in whole blood

Figure 1 shows the individual time profiles of THC, 11-OH-THC, and THCCOOH for heavy and occasional smokers. Occasional and heavy smokers presented similar kinetics, except for the THC, 11-OH-THC, and THCCOOH C_0 . As indicated in Table 2, C_0 were 2.1 and 0.3 $\mu\text{g/L}$ for THC; 0.9 and 0 $\mu\text{g/L}$ for 11-OH-THC; and 20 and 0 $\mu\text{g/L}$ for THCCOOH for heavy and occasional cannabis users, respectively. Heavy smokers' C_0 were significantly higher ($p < 0.0001$) than those of occasional ones for each of the three cannabinoids.

Maximal concentration (C_{max}), time to the maximal concentration (T_{max}), elimination half-life ($T_{1/2}$), and area under

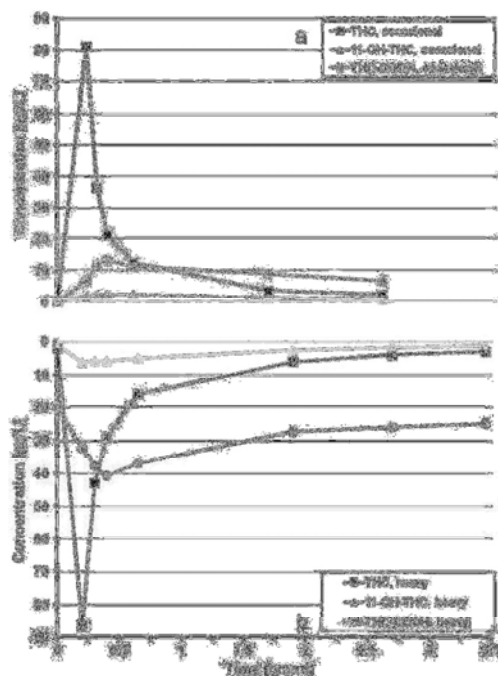


Fig. 1 Time profiles of THC, 11-OH-THC, and THCCOOH in whole blood. *Upper* subfigure **a** occasional smokers; *bottom* subfigure **b** heavy smokers

the curve ($AUC_{2.5h}$ and $AUC_{3.5h}$) are presented in Table 2. $T_{1/2}$ and $AUC_{2.5h}$ were determined by blood samples collected until 2.5 h after inhalation for both occasional and heavy smokers in order to compare their individual PK parameters. As blood samples were collected till 3.5 h after inhalation for heavy smokers, $AUC_{3.5h}$ was also determined for this group. THC, 11-OH-THC, and THCCOOH presented all a median C_{max} in blood that was higher for heavy users than for occasional smokers: Median THC C_{max} were 87 and 75 $\mu\text{g/L}$, median 11-OH-THC C_{max} were 6.5 and 2.6 $\mu\text{g/L}$, and median THCCOOH C_{max} were 41 and 13 $\mu\text{g/L}$ for heavy and occasional smokers, respectively. Unexpectedly, the difference in THC between the groups was not significant. Before carrying out this study, we suspected that experienced smokers should have a more efficient inhalation technique resulting in higher blood concentrations than occasional smokers with less experience and a poor puffing method. Indeed, it is known that the bioavailability of THC is variable and is influenced by individual techniques and smoking experience [25, 31]. Since no obvious difference was found, we hypothesized that the inhaled dose was less influenced by frequency and

previous experience/use since all smokers inhaled following a fixed paced protocol and also because the experienced cannabis smokers would be more able to titrate the effects than the inexperienced ones. The observation that occasional and heavy smokers consumed approximately the same quantity of cannabis (0.4 g) is in line with this hypothesis. Furthermore, the occasional subjects who smoked without inhaling (i.e., those who "crapote") were excluded. The fact that the regular smokers felt the effects of confusion less than the occasional users (see next paragraph) can be explained by the development of tolerance, but also by a better ability to titrate the effects, especially those perceived as negative (confusion). On the other hand, the differences between both groups were highly significant for 11-OH-THC and THCCOOH ($p < 0.0001$). For these two metabolites, the differences could be explained by the frequency of consumption and their long terminal half-life.

The three cannabinoids remained detectable in all blood specimens until the end of the investigation day. THC, 11-OH-THC, and THCCOOH levels were higher than the LOQ in all the heavy smokers' samples. Median THC concentrations measured 2.5 h after smoking were 4.2 and 2.1 $\mu\text{g/L}$ for the heavy and occasional smokers, respectively, while median THCCOOH concentrations at the same time were 36 and 7.1 $\mu\text{g/L}$. Thus, THCCOOH concentrations in the heavy smokers were significantly higher than those of the occasional cannabis users ($p < 0.0001$).

As expected and presented in previous studies [11, 21, 23], THC reached its highest concentration first, followed by 11-OH-THC and by THCCOOH. Median THC T_{max} were 0.20 and 0.23 h for the heavy and occasional groups, respectively, while median 11-OH-THC T_{max} were slightly delayed to 0.28 and 0.32 h and median THCCOOH T_{max} even more to 0.38 and 0.40 h. The differences between both groups for the THC and THCCOOH were not significant. It was marginally significant for 11-OH-THC ($p < 0.05$). THCCOOH T_{max} values were slightly different from those reported by Kauert et al. [23] (mean of 0.25 h) and by Toennes et al. [21] (0.75 h for heavy and 0.25 h for occasional smokers).

Median THC, 11-OH-THC, and THCCOOH $AUC_{2.5h}$ in blood were higher for the heavy than for the occasional smokers. THC $AUC_{2.5h}$ were 43 and 33 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$; 11-OH-THC $AUC_{2.5h}$ were 10 and 4.2 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, and THCCOOH $AUC_{2.5h}$ were 79 and 23 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ for the heavy and occasional smokers, respectively. THC $AUC_{2.5h}$ values were marginally different between both groups ($p < 0.05$). This could be explained by the fact that THC C_{max} of the heavy smokers was slightly higher than THC C_{max} of the occasional smokers (without being significantly different). On the other hand, differences were highly significant for 11-OH-THC and THCCOOH $AUC_{2.5h}$ ($p < 0.0001$). These differences could be explained as follows: AUC measured for the heavy smokers included both past and recent inhalations, while those

Table 2 Pharmacokinetic parameters of THC, 11-OH-THC, and THCCOOH in whole blood for heavy and occasional smokers

	C_0 ($\mu\text{g/L}$)	C_{max} ($\mu\text{g/L}$)	T_{max} (h)	$AUC_{0-2.5}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$)	AUC_{0-6} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$)	$T_{1/2}$ (h)
THC heavy						
Median	2.1	87	0.2	43	45	1.0
Mean	2.4	95	0.2	47	50	1.0
SD	1.6	47	0.1	20	21	0.3
Min	0.8	37	0.1	19	20	0.5
Max	7.1	192	0.4	86	91	1.9
THC occasional						
Median	0.3	75	0.2	33	–	0.8
Mean	0.3	76	0.2	31	–	0.9
SD	0.4	46	0.1	18	–	0.2
Min	0	8.2	0.2	4.1	–	0.7
Max	1.4	168	0.4	68	–	1.4
11-OH-THC heavy						
Median	0.9	6.5	0.3	10	12	1.7
Mean	1.2	6.9	0.3	10	11	1.8
SD	0.8	3.4	0.1	4.1	5.0	0.5
Min	0.4	2.8	0.2	3.7	4.1	1.0
Max	3.0	16	0.4	17	20	3.1
11-OH-THC occasional						
Median	0	2.6	0.3	4.2	–	1.6
Mean	0.1	3.4	0.4	4.7	–	2.7
SD	0.2	3.3	0.3	4.4	–	2.3
Min	0	0.6	0.2	0.7	–	1.0
Max	0.6	18	1.6	23	–	11
THCCOOH heavy						
Median	20	41	0.4	79	99	3.9
Mean	22	45	0.4	90	113	3.8
SD	16	24	0.1	53	70	1.7
Min	2.5	17	0.2	28	35	1.7
Max	51	106	0.7	227	304	9.2
THCCOOH occasional						
Median	0	13	0.4	23	–	3.33
Mean	1.3	15	0.4	27	–	4.45
SD	3.7	8.9	0.1	19	–	3.69
Min	0	2.0	0.2	3.7	–	1.59
Max	17	38	0.7	86	–	17.3

calculated for the occasional users reflected current inhalation only. To better compare the $AUC_{2.5h}$, those of regular smokers were corrected by baseline subtraction. To this end, a trapezoid area was calculated by multiplying the investigated time-period (2.5 h) by the THCCOOH C_0 level. This value was weighted by the terminal half-life of THCCOOH [6]. The median corrected $AUC_{2.5h}$ for heavy smokers was then $16.1 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ and not significantly different from the THCCOOH $AUC_{2.5h}$ of occasional smokers.

The THC $T_{1/2}$ in blood was shorter than 11-OH-THC $T_{1/2}$ which was also shorter than THCCOOH $T_{1/2}$. Similar

observations were drawn by Kauert et al. in a study carried out with recreational cannabis users [23]. In our study, median THC $T_{1/2}$ were 0.8 and 1.0 h for the occasional and heavy smokers, respectively, while the corresponding value reported by Kauert et al. was 1.4 ± 0.1 h. Our calculated 11-OH-THC $T_{1/2}$ were 1.7 h for the heavy and 1.6 h for the occasional smokers versus 1.9 h, as reported by Kauert. The same authors indicated a THCCOOH half-life of 3.0 h while we found respectively 3.3 and 3.9 h for the occasional and heavy cannabis users. These differences can be explained by the longer observation time in the Kauert study (6 vs. 2.5 and 3.5 h in our case). The investigation time period has a great influence on

the determination of the half-life; for instance, Wall et al. [32] calculated a terminal half-life between 25 and 36 h for THC, with a study lasting 72 h.

Pharmacokinetic parameters of THC, THC-A, CBN, and THCCOOH for heavy and occasional cannabis smokers in oral fluid

Median time profiles of THC, THC-A, CBN, and THCCOOH are presented for the heavy smokers using a double y-axis plot in Fig. 2. The right axis is used for THCCOOH concentrations with a magnitude extending from 0 to 0.7 $\mu\text{g/L}$, and the other data subset (THC, THC-A and CBN) used the left axis with a 1,000 times higher range scaled from 0 to 700 $\mu\text{g/L}$. THC concentrations reached very high values and significantly exceeded those of THC-A and CBN which were quite similar. THCCOOH concentrations were lower with a median peak value below 400 ng/L. THCCOOH levels remained higher than the LOQ value up to 2.5 h after inhalation. In all but one sample of the heavy smokers, THC remained detectable in oral fluid until 3.5 h after smoking. The median THC concentration at the end of the investigation day was 22 $\mu\text{g/L}$. THC-A was still detectable in 18 out of 23 samples with a median concentration of 1.9 $\mu\text{g/L}$. As for THC, CBN remained detectable to the end of the investigation period in all but one sample, although its median concentration after 3.5 h was much lower, 2.4 $\mu\text{g/L}$. Median THC concentrations measured 3.5 h after smoking were higher in OF than in blood (22 vs. 4.2 $\mu\text{g/L}$). This confirms that THC can be detected slightly longer in oral fluid than in blood, as already reported by Drummer [33] and Verstraete [34]. Consequently, oral fluid could be an interesting matrix, offering a greater likelihood of recent cannabis use detection. The presence of THC-A in OF

was likely to be due to its incomplete decarboxylation while the presence of CBN was the consequence of THC oxidation and pyrolysis occurring during the smoking of the joint [35, 36]. As THC-A remained detectable throughout the experiment, its use as a marker of recent exposure is questionable. However, since most THC/CBD-based medicines do not contain THC-A, this molecule could be used as a marker to detect crude cannabis use. The plant cannabinoid THC-A was also detected in serum samples and was recently suggested as a possible marker to differentiate an intake of illegal cannabis products from an administration of therapeutic THC (dronabinol, MarinolTM) [37].

Pharmacokinetic parameters, such as C_0 , C_{max} , C_t , T_{max} , AUC, and elimination $T_{1/2}$ are listed in Table 3. The heavy smokers presented C_0 values significantly higher than those measured for the occasional users for THC ($p < 0.0001$), THC-A ($p < 0.001$), and CBN ($p < 0.001$). The median THC C_0 for regular smokers was relatively high (9.7 $\mu\text{g/L}$). A null median value was found for the initial THCCOOH concentration which was determined prior to smoking. If THCCOOH could be occasionally detected in heavy smokers, it remained undetectable in occasional users.

Among all participants, THC C_{max} ranged from 19 to 3,130 $\mu\text{g/L}$, with median C_{max} values of the occasional smokers reaching 1,320 $\mu\text{g/L}$ and exceeding those of the heavy users (636 $\mu\text{g/L}$). Similar differences were observed with THC-A and CBN C_{max} : THC-A C_{max} were 130 and 59 $\mu\text{g/L}$ and CBN C_{max} were 125 and 81 $\mu\text{g/L}$ for the occasional and heavy smokers, respectively. THC-A peak concentrations differed significantly between both groups ($p < 0.01$). The higher buccal contamination observed among the occasional smokers could be explained by differences in smoking and inhalation techniques. It is known that the bioavailability of these cannabinoids can be influenced by many

Fig. 2 Time profiles of THC, THC-A, CBN, and THCCOOH in oral fluid for heavy smokers

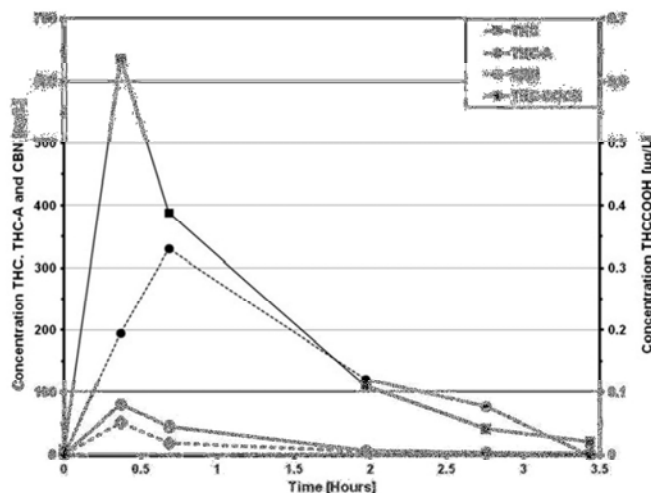


Table 3 Pharmacokinetic parameters of THC, THC-A, CBN, and THCCOOH in oral fluid for occasional and heavy smokers

	C ₀ (µg/L)	C _{max} (µg/L)	C _{2.5h} (µg/L)	C _{3.5h} (µg/L)	T _{max} (h)	AUC _{2.5h} (µg.h/L)	T _{1/2} (h)
THC heavy							
Median	9.7	636	42	22	0.4	745	0.9
Mean	24	1047	70	60	0.5	1120	1.3
SD	59	967	77	103	0.6	1179	1.0
Min	0	18	1.1	0	0.2	25	0.3
Max	299	3170	232	140	3.5	4226	3.4
THC occasional							
Median	0	1320	216	—	0.3	—	—
Mean	0.6	1388	258	—	0.3	—	—
SD	2.5	782	286	—	0.1	—	—
Min	0	367	9	—	0.2	—	—
Max	12	3110	1400	—	0.6	—	—
THC-A heavy							
Median	1.2	59	2.5	1.9	0.4	48	1.3
Mean	4.1	73	4.3	13	0.5	39	1.5
SD	7.2	66	6.1	30	0.7	41	1.1
Min	0	3.9	0	0	0	0.3	0.3
Max	32	593	29	3.6	3.3	162	4.4
THC-A occasional							
Median	0	130	11	—	0.3	—	—
Mean	0	334	37	—	0.3	—	—
SD	0.1	610	84	—	0.1	—	—
Min	0	4.8	0	—	0.2	—	—
Max	0.5	2910	412	—	0.6	—	—
CBN heavy							
Median	0.5	81	4.0	2.4	0.4	83	1.0
Mean	1.2	107	5.4	3.8	0.4	101	1.1
SD	1.9	87	5.3	4.4	0.1	82	0.6
Min	0	6.0	0	0	0.2	5.5	0.4
Max	6.7	310	25	22	0.5	297	2.7
CBN occasional							
Median	0	125	19	—	0.3	—	—
Mean	0	192	29	—	0.3	—	—
SD	0	198	23	—	0.1	—	—
Min	0	17	0	—	0.2	—	—
Max	0	756	79	—	0.6	—	—
THCCOOH heavy							
Median	0	0.3	0.1	0	0.6	0.6	1.3 ^a
Mean	0.1	0.6	0.1	0.1	0.7	0.8	1.9 ^a
SD	0.1	0.6	0.1	0.1	0.5	0.8	1.9 ^a
Min	0	0.1	0	0	0.3	0.1	0.8 ^a
Max	0.5	2.4	0.3	0.4	2.0	3.7	7.2 ^a

^a Parameters determined with ten values only

factors, e.g., how deep the smoke is inhaled in the lungs, the number of puffs and puff volume, the strength of inhalation, the size of smoked particles and the distribution between the

gas phase, and the particle phase and the residence time in the mouth [9]. Heavy and occasional users smoked the same quantity of cannabis (0.39 g). However, the cannabinoid concentrations in blood were slightly higher for the heavy than for the occasional smokers, but not significantly different. We suggest that, during inhalation, the occasional smokers kept the cannabis smoke a little longer in their mouths than the heavy users before its inhalation into the lungs. The mouths of the occasional cannabis smokers could have been more contaminated, resulting in higher levels of THC, THC-A, and CBN. Furthermore, extraction efficiency could have been influenced by the type of saliva collector used for each group of smokers, although both extraction methods were cross-validated. Indeed, the interaction of the cotton roll of the Salivette® or of the pad of the Quantisal™ with the oral cavity may have been different. A strong decrease in median concentrations of THC, THC-A, and CBN was observed for both groups of smokers within 2.5 h. The magnitude of the decrease was significantly higher for heavy smokers with *p* values (Mann–Whitney *U* test) lower than 0.05.

Almost no difference was observed for the time period separating the first puff from the observed C_{max}. THC, THC-A, and CBN C_{max} happened consecutively a short time after inhalation of the cannabis joint (T_{max}=0.3–0.4 h). A similar observation has been already reported in several other studies [11, 23, 38, 39]. For instance, the C_{max} determined by Kauert et al. [23] for THC was already measured in the first OF sample taken just 0.25 h after starting inhalation. The concentrations were poorly related to the administered dose: 900±589 or 1,041±652 µg/L after smoking a joint containing 250 µg/kg body weight (BW) or 500 µg/kg BW, respectively. Broad variations in the THC concentrations measured in OF were observed between studies. For example, Milman et al. [39] reported a median THC highest concentration of 2,629 µg/L at 0.25 h after smoking. Huestis and Cone [11] indicated an OF THC C_{max} of 5,800 µg/L 0.2 h after inhalation. Several parameters could explain these large variations of THC C_{max} in OF. First, the devices used for collecting OF differ and may influence the THC levels recovered from the saliva. The expectoration [39] provided undiluted OF. However, it presents some limitations, such as low specimen volume, high viscosity, and decreased drug stability. Expectoration after stimulation with citric acid [11] enhances sample volume, but also changes salivary composition, and could affect cannabinoid concentrations in OF [40]. Collecting OF with Quantisal or Intercept devices [23, 41] results in diluted OF mixed with extracting buffer containing potential analytical interferences (detergent, coloring agent, preservative substances). Langel et al. [28] studied nine different collection devices. Their conclusions were that the extraction buffer of the collection devices may help to increase the recovery of drugs and improve the stability of the samples. Secondly, the type of joint, the concentration of THC in the cannabis plant

material, and the quantity of THC inhaled are also influential. In our study, volunteers smoked half a cannabis joint containing 11 % THC, which corresponds to a median value of 43 mg of THC. Subjects enrolled in the study of Kaur et al. smoked either 13.8–22.8 or 27.9–44.5 mg THC. Huestis and Cone administered cannabis cigarettes with 3.55 % THC, which corresponds to 33.8 mg THC. Milman et al. provided the participants with joints containing 6.8 % THC. Thirdly, the bioavailability of THC after cannabis smoking is variable and influenced by individual techniques of inhalation and previous history of use, as already mentioned [25, 31].

THCCOOH C_{max} ranged between 0.3 and 2.4 $\mu\text{g/L}$ in the heavy smokers. This metabolite was not detected in OF samples of the occasional smokers. Since THCCOOH is not found in cannabis plants, neither in joints nor in cannabis smoke, its presence in OF could result only from human metabolism. THCCOOH is very likely poorly excreted from the plasma into the saliva as a free molecule [8]. Its concentration in OF is related to that found in plasma. Our study has shown that THCCOOH levels were significantly higher in the blood of the heavy smokers than in the light users. Therefore, a lower concentration was to be suspected and was subsequently found to be below the detection value limit in the OF of the occasional smokers compared with the heavy users. In contrast to THC, THC-A, and CBN peaks, THCCOOH highest concentration level was time-delayed. The median (range) OF THCCOOH T_{max} occurred 0.6 (0.3–2.0 h) after inhalation. These values correspond to those of Milman et al. [39]. They determined cannabinoids in oral fluid and obtained a median T_{max} for THCCOOH of 1 h (range was between 0.25 and 2.0 h). The observed delay is in line with the assumption that THCCOOH in OF originates from THC metabolism. Oral fluid AUC and $T_{1/2}$ for the occasional smokers could not be determined because only two samples could be collected after inhalation. Median $AUC_{0-3.5h}$ of THC was much higher in OF than in blood (745 versus 45 $\mu\text{g/L}\cdot\text{h}$) because THC concentrations in OF widely exceeded those measured in blood. On the other hand, THCCOOH was found in much lower concentrations in OF than in blood, explaining why the $AUC_{0-3.5h}$ in OF was inferior to that in blood.

The samples of the ten volunteers who remained positive until the end of the investigation day were used to calculate the THCCOOH $T_{1/2}$. The three final OF samples collected between 1.9 and 3.5 h were used. The median elimination $T_{1/2}$ were respectively 0.9, 1.3, 1.0, and 1.3 h for THC, THC-A, CBN, and THCCOOH. These values were not significantly different from each other. Surprisingly, THC OF $T_{1/2}$ was not significantly different from THC blood $T_{1/2}$. On the other hand, the difference between THCCOOH $T_{1/2}$ in OF and blood was very significant ($p < 0.001$). In a study lasting 4 h, Huestis and Cone [11] estimated the OF terminal half-life of THC to be 0.8 h, in line with the value obtained in our study (0.9 h). In a longer study lasting 8 h, Toennes et al. [21] found

an identical $T_{1/2}$ value of 1.6 h for occasional and chronic users.

THC-A and CBN OF concentrations were correlated to THC with a significant Spearman correlation coefficient ($r = 0.71$ and 0.59 , $p < 0.001$). Elimination half-lives of these two cannabinoids were not significantly different from THC $T_{1/2}$, suggesting that the elimination of these three compounds follows approximately the same course. The molar ratios of THC-A/THC were determined during the day of experiment for heavy and occasional smokers. In occasional smokers, before smoking, THC was detected in only two OF samples and THC-A in only one. Consequently, their molar ratios could not be determined. The median THC-A/THC molar ratios were 0.08, 0.07, and 0.05 at 0.35, 0.65, and 2.75 h after inhalation, respectively. For heavy smokers, these median ratios varied between 0.03 and 0.09 during the day of experiment. For each group, the ratios were not significantly different between each time points. Furthermore, we found no significant differences between occasional and heavy smokers.

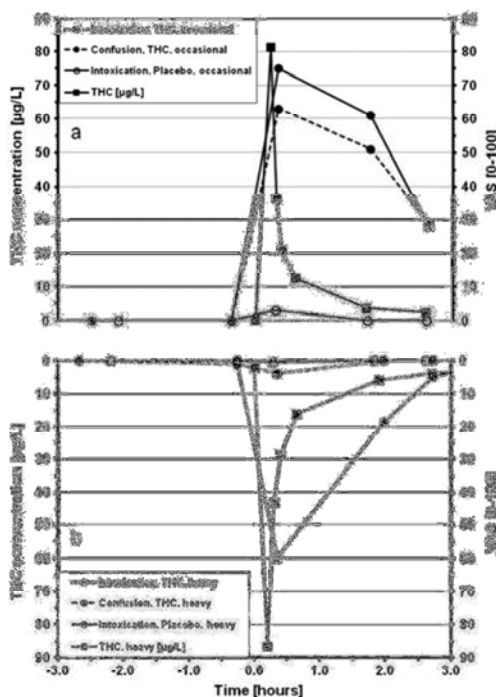


Fig. 3 VAS scores for the feeling of intoxication and confusion and THC time profile in whole blood after smoking a cannabis joint or a matching placebo. *Upper* subfigure **a** occasional smokers; *bottom* subfigure **b** heavy smokers

Assessment of subjective effects with questionnaires

The median results for feelings of intoxication and confusion are presented in Fig. 3a and b. One effect (intoxication) is expected and can be considered as desired and rewarding, while the second (confusion) is an unwanted side effect [42, 43]. The sensations felt by the occasional smokers are plotted in the upper right side subfigure (a), while those experienced by the heavy users are displayed in the lower subfigure (b). The two subfigures are mirrored with inverted y-axes. The placebo effects were very low and are only shown for the sensation of intoxication. The feeling of intoxication after placebo smoking was slightly more intense among the occasional than the heavy smokers. The kinetic profiles of THC are shown on the same graphs to correlate the blood concentrations with the subjective effects. It is clear that cannabis inhalation by the occasional smokers (Fig. 3a) induced a strong feeling of intoxication and confusion immediately after smoking, with a VAS score of 75 and 63, respectively. Then, these effects decreased slowly but did not completely disappear after 2.5 h (VAS score of 28 and 29). As to the heavy smokers (Fig. 3b), the feeling of confusion (discontinuous line) remained low (VAS score equal or lower than 4), whereas the feeling of intoxication (straight line) reached significant values immediately after inhalation (VAS 60). This effect decreased rapidly and disappeared almost completely after 2.5 h (VAS score of 2). These results suggest that, in comparison to occasional smokers, heavy smokers remain able to feel the intoxication effects, but with less intensity, while the negative symptoms (confusion) become strongly attenuated. These differences between occasional and heavy smokers could be explained by the specific habits of consumption (frequency and dose) of each group. Heavy smokers are more accustomed to the effects of cannabis than occasional users and could therefore better manage the way they feel intoxicated or confused. The weakened feeling of confusion among heavy smokers reflects a greater tolerance to negative symptoms. These effects as felt by occasional smokers are discussed in depth by Battistella et al. [26]. Similar effects involving a tolerance mechanism have been found by others and are presented in a recent paper of Theunissen et al. [44].

Limitations of the study

For each clinical trial, compromises and choices must be made. In this broad cannabis administration study, two parameters have greatly influenced the time-schedule of the day of experiment. First, we choose to keep the volunteers under close supervision for several hours before administration of the joint. The second parameter was the timing of the fMRI sessions. Finally, the infrastructure of the clinical research center, the ethical committee, as well as the volunteers'

availability were not compatible with a multi-day experiment. The drawback was that a long investigation after inhalation was not possible. Because two different OF collecting devices were used, the comparison of the magnitude of cannabinoid concentrations was difficult. However, our opinion is that the concentration ratios and the variations in cannabinoid levels can be profitably compared.

Conclusion

Pharmacokinetic analyses revealed that initial cannabinoid concentrations in whole blood and oral fluid were different between occasional and heavy smokers, especially in the case of THCCOOH. However, occasional and heavy smokers presented a similar median THC maximal concentration in WB. In OF, THC and to a lesser extent THC-A were found in high concentrations for both groups. The molar ratios of THC-A over THC in OF remained the same during the day of experiment and did not significantly differ between both groups of consumers. The presence of THC-A in OF indicated that it is only partially decarboxylated during the smoking of the joint. Since THC-A is not known to be present in THC/CBD-based medicines, it could be used as a marker of cannabis smoking. Compared with occasional smokers, the intensity of the feeling of confusion was much lower in heavy users while the sensation of intoxication was only slightly lower.

Acknowledgements The authors would like to thank the Swiss National Science Foundation (FNS 320030_127507/1), the Centre d'Imagerie BioMédicale (CIBM), and the Faculty of Biology and Medicine (interdisciplinary grant) at the University of Lausanne for their financial support. We thank Dr. Marc Augsburg, Dr. Christian Staub, and Prof. Patrice Mangin of the University Center of Legal Medicine Lausanne-Geneva; Dr. Jean-Frédéric Mall of the Department of Psychiatry at CHUV; Prof. Thierry Buchin; and the staff of the division of Clinical Pharmacology and Toxicology at CHUV. The authors would also like to thank Ms. Ann Travis and Fiona Smith for reviewing the English version of the text.

References

1. Augsburg M, Donze N, Menetrey A, Brossard C, Sporkert F, Giroud C, Mangin P (2005) Concentration of drugs in blood of suspected impaired drivers. *Forensic Sci Int* 153(1):11–15. doi:10.1016/j.forsciint.2005.04.025
2. Menetrey A, Augsburg M, Giroud C, Mangin P (2001) Cannabis and automobile driving. *Praxis* 90(34):1398–1407
3. Ramaekers JG, Kauert G, Theunissen EL, Toennes SW, Moeller MR (2009) Neurocognitive performance during acute THC intoxication in heavy and occasional cannabis users. *J Psychopharmacol* 23(3):266–277. doi:10.1177/0269881108092393
4. Moosmann B, Roth N, Auwärter V (2013) Hair analysis for THCA-A THC and CBN after passive in vivo exposure to marijuana smoke. *Drug Test Anal*. doi:10.1002/dta.1474

5. Huestis MA, Gustafson RA, Moolchan ET, Barnes A, Bourland JA, Sweeney SA, Hayes EF, Carpenter PM, Smith ML (2007) Cannabinoid concentrations in hair from documented cannabis users. *Forensic Sci Int* 169(2–3):129–136. doi:10.1016/j.forsciint.2006.08.005
6. Musshoff F, Madea B (2006) Review of biologic matrices (urine, blood, hair) as indicators of recent or ongoing cannabis use. *Ther Drug Monit* 28(2):155–163. doi:10.1097/01.fid.0000197091.07807.22
7. Daldrup T, Käferstein H, Köhler H, Maier R, Musshoff F (2000) Deciding between one off/occasional and regular cannabis consumption. *Blutalkohol* 37(1):39–47
8. Fabritius M, Staub C, Mangin P, Giroud C (2013) Analysis of cannabinoids in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicol* 31(1):151–163
9. Perez-Reyes M (1990) Marijuana smoking: factors that influence the bioavailability of tetrahydrocannabinol. *NIDA Res Monogr* 99:62–65
10. Niedbahn RS, Karkos KW, Hirsch DE, Karkos S, Fries T, Waga J, Robb J, Cone EJ (2001) Detection of marijuana use by oral fluid and urine analysis following single-dose administration of smoked and oral marijuana. *J Anal Toxicol* 25(5):289–303
11. Huestis MA, Cone EJ (2004) Relationship of Delta 9-tetrahydrocannabinol concentrations in oral fluid and plasma after controlled administration of smoked cannabis. *J Anal Toxicol* 28(6):394–399
12. Laloup M, Del Mar Ramirez Fernandez M, Wood M, De Boeck G, Maes V, Samyn N (2006) Correlation of Delta9-tetrahydrocannabinol concentrations determined by LC-MS-MS in oral fluid and plasma from impaired drivers and evaluation of the on-site Drager DrugTest. *Forensic Sci Int* 161(2–3):175–179. doi:10.1016/j.forsciint.2006.03.033
13. Toennes SW, Kauert GF, Steinmeyer S, Moeller MR (2005) Driving under the influence of drugs—evaluation of analytical data of drugs in oral fluid, serum and urine, and correlation with impairment symptoms. *Forensic Sci Int* 152(2–3):149–155. doi:10.1016/j.forsciint.2004.08.002
14. Toennes SW, Steinmeyer S, Maurer HJ, Moeller MR, Kauert GF (2005) Screening for drugs of abuse in oral fluid—correlation of analysis results with serum in forensic cases. *J Anal Toxicol* 29(1):22–27
15. Lee D, Vandrey R, Milman G, Bergamaschi M, Mendu DR, Murray JA, Barnes AJ, Huestis MA (2013) Oral fluid/plasma cannabinoid ratios following controlled oral THC and smoked cannabis administration. *Anal Bioanal Chem*. doi:10.1007/s00216-013-7159-8
16. Brenneisen R, Meyer P, Chtioui H, Saugy M, Kamber M (2010) Plasma and urine profiles of Delta9-tetrahydrocannabinol and its metabolites 11-hydroxy-Delta9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-Delta9-tetrahydrocannabinol after cannabis smoking by male volunteers to estimate recent consumption by athletes. *Anal Bioanal Chem* 396(7):2493–2502. doi:10.1007/s00216-009-3431-3
17. Deiana S, Watanabe A, Yamasaki Y, Amada N, Arthur M, Fleming S, Woodcock H, Dorward P, Pigliacampo B, Close S, Platt B, Riedel G (2012) Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV), Delta(9)-tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive-compulsive behaviour. *Psychopharmacology* 219(3):859–873. doi:10.1007/s00213-011-2415-0
18. Karschner EL, Darwin WD, Goodwin RS, Wright S, Huestis MA (2011) Plasma cannabinoid pharmacokinetics following controlled oral delta9-tetrahydrocannabinol and oromucosal cannabis extract administration. *Clin Chem* 57(1):66–75. doi:10.1373/clinchem.2010.152439
19. Schwilke EW, Schwoppe DM, Karschner EL, Lowe RH, Darwin WD, Kelly DL, Goodwin RS, Gorelick DA, Huestis MA (2009) Delta9-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC plasma pharmacokinetics during and after continuous high-dose oral THC. *Clin Chem* 55(12):2180–2189. doi:10.1373/clinchem.2008.122119
20. Schwoppe DM, Karschner EL, Gorelick DA, Huestis MA (2011) Identification of recent cannabis use: whole-blood and plasma free and glucuronidated cannabinoid pharmacokinetics following controlled smoked cannabis administration. *Clin Chem* 57(10):1406–1414. doi:10.1373/clinchem.2011.171777
21. Toennes SW, Ramaekers JG, Theunissen EL, Moeller MR, Kauert GF (2008) Comparison of cannabinoid pharmacokinetic properties in occasional and heavy users smoking a marijuana or placebo joint. *J Anal Toxicol* 32(7):470–477
22. Toennes SW, Ramaekers JG, Theunissen EL, Moeller MR, Kauert GF (2010) Pharmacokinetic properties of delta9-tetrahydrocannabinol in oral fluid of occasional and chronic users. *J Anal Toxicol* 34(4):216–221
23. Knaert GF, Ramaekers JG, Schneider H, Moeller MR, Toennes SW (2007) Pharmacokinetic properties of delta9-tetrahydrocannabinol in serum and oral fluid. *J Anal Toxicol* 31(5):288–293
24. Milman G, Schwoppe DM, Schwilke EW, Darwin WD, Kelly DL, Goodwin RS, Gorelick DA, Huestis MA (2011) Oral fluid and plasma cannabinoid ratios after around-the-clock controlled oral Delta(9)-tetrahydrocannabinol administration. *Clin Chem* 57(11):1597–1606. doi:10.1373/clinchem.2011.169490
25. Grotenhermen F (2003) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clinical pharmacokinetics* 42(4):327–360
26. Battistella G, Fomari E, Thomas A, Mall JF, Chtioui H, Appenzeller M, Annoni JM, Favrat B, Maeder P, Giroud C (2013) Weed or wheel! FMRI, behavioural, and toxicological investigations of how cannabis smoking affects skills necessary for driving. *PLoS one* 8(1):e52545. doi:10.1371/journal.pone.0052545
27. Muntendam R, Happyana N, Erkelens T, Bruining F, Kayser O (2012) Time dependant metabolomics and transcriptional analysis of cannabinoid biosynthesis in *Cannabis sativa* var Bedrobinol and Bediol grown under standardized condition and with genetic homogeneity. *Online Int J Med Plants Res* 1(2):31–40
28. Langel K, Engblom C, Pehrsson A, Gunnar T, Ariniemi K, Lillsunde P (2008) Drug testing in oral fluid—evaluation of sample collection devices. *J Anal Toxicol* 32(6):393–401
29. Thomas A, Widmer C, Hopfgartner G, Staub C (2007) Fast gas chromatography and negative-ion chemical ionization tandem mass spectrometry for forensic analysis of cannabinoids in whole blood. *J Pharm Biomed Anal* 45(3):495–503. doi:10.1016/j.jpba.2007.08.019
30. Mariani JJ, Brooks D, Haney M, Levin FR (2011) Quantification and comparison of marijuana smoking practices: blunts, joints, and pipes. *Drug Alcohol Depend* 113(2–3):249–251. doi:10.1016/j.drugaldep.2010.08.008
31. Lindgren JE, Ohlsson A, Agurell S, Hollister L, Gillespie H (1981) Clinical effects and plasma levels of delta 9-tetrahydrocannabinol (delta 9-THC) in heavy and light users of cannabis. *Psychopharmacology* 74(3):208–212
32. Wall ME, Sadler BM, Brine D, Taylor H, Perez-Reyes M (1983) Metabolism, disposition, and kinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in men and women. *Clin Pharmacol Ther* 34(3):352–363
33. Drummer OH (2005) Review: pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. *Forensic Sci Int* 150(2–3):133–142. doi:10.1016/j.forsciint.2004.11.022
34. Verstraete AG (2004) Detection times of drugs of abuse in blood, urine, and oral fluid. *Ther Drug Monit* 26(2):200–205
35. Jung J, Kempf J, Mahler H, Weinmann W (2007) Detection of Delta9-tetrahydrocannabinolic acid A in human urine and blood serum by LC-MS/MS. *J Mass Spectrom* 42(3):354–360. doi:10.1002/jms.1167
36. Mikes F, Waser PG (1971) Marijuana components: effects of smoking on delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Science* 172(3988):1158–1159

37. Radunz L, Westphal F, Maser E, Rochholz G (2012) THCVA-A—a new additional marker for illegal cannabis consumption. *Forensic Sci Int* 215(1–3):171–174. doi:10.1016/j.forsciint.2011.03.001
38. Huestis MA, Henningfield JE, Cone EJ (1992) Blood cannabinoids. I. Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THCCOOH during and after smoking marijuana. *J Anal Toxicol* 16(5):276–282
39. Milman G, Schwoppe DM, Gorelick DA, Huestis MA (2012) Cannabinoids and metabolites in expectorated oral fluid following controlled smoked cannabis. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 413(7–8):765–770. doi:10.1016/j.cca.2012.01.011
40. Crouch DJ (2005) Oral fluid collection: the neglected variable in oral fluid testing. *Forensic Sci Int* 150(2–3):165–173. doi:10.1016/j.forsciint.2005.02.028
41. Kauert GF, Iwersen-Bergmann S, Toennes SW (2006) Assay of Delta9-tetrahydrocannabinol (THC) in oral fluid—evaluation of the OraSure oral specimen collection device. *J Anal Toxicol* 30(4):274–277
42. Green B, Kavanagh D, Young R (2003) Being stoned: a review of self-reported cannabis effects. *Drug Alcohol Rev* 22(4):453–460. doi:10.1080/09595230310001613976
43. Hall W, Solowij N (1998) Adverse effects of cannabis. *Lancet* 352(9140):1611–1616. doi:10.1016/S0140-6736(98)05021-1
44. Theunissen EL, Kauert GF, Toennes SW, Moeller MR, Sambeth A, Blanchard MM, Ramaekers JG (2012) Neurophysiological functioning of occasional and heavy cannabis users during THC intoxication. *Psychopharmacology* 220(2):341–350. doi:10.1007/s00213-011-2479-x

IV.1.2. Concentrations en THCCOOH dans le sang

Un test simple permettant de détecter une consommation chronique de cannabis est très utile dans le contexte de la sécurité routière. Un conducteur soupçonné d'usage répété de cannabis est généralement considéré comme inapte à la conduite. Une incapacité à conduire à long terme conduit à plusieurs mesures administratives coûteuses et à des investigations toxicologiques poussées. Actuellement, il existe une grande controverse concernant l'utilisation des concentrations sanguines en THCCOOH 1) comme marqueur de l'étendue et de la fréquence de l'exposition au cannabis, mais aussi 2) sur le choix du seuil au dessus duquel une utilisation répétée doit être fortement soupçonnée, et enfin 3) sur l'utilité respective des analyses de sang et de cheveux concernant l'évaluation de l'étendue de la consommation de cannabis. À notre connaissance, seuls Daldrup et al. [36] ont proposé différents seuils de concentrations sériques pour le THCCOOH afin de distinguer une consommation occasionnelle de cannabis d'un usage régulier. Plus récemment, la Société Française de Toxicologie Analytique a recommandé un seuil de 50 µg/L de THCCOOH dans le sang total pour la limite inférieure au-dessus de laquelle une consommation régulière de cannabis (1 joint / jour, tous les jours) peut être fortement suspectée [37]. Relevons qu'actuellement, il n'existe pas de consensus permettant de classer les fumeurs selon leur fréquence de consommation. Par exemple, selon l'étude Escapad menée en 2002 par l'Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies (OFDT), les fumeurs occasionnels font un usage du cannabis entre 1 et 9 fois par an, ce qui correspond à 0.02 et 0.17 fois par semaine. En comparaison, deux articles publiés en 2013 décrivent un usage occasionnel comme une consommation inférieure à deux fois par semaine [101, 102]. Les Figures 11a et 11b représentent les définitions des fréquences de consommation « occasionnelle » et « régulière » dans diverses références.

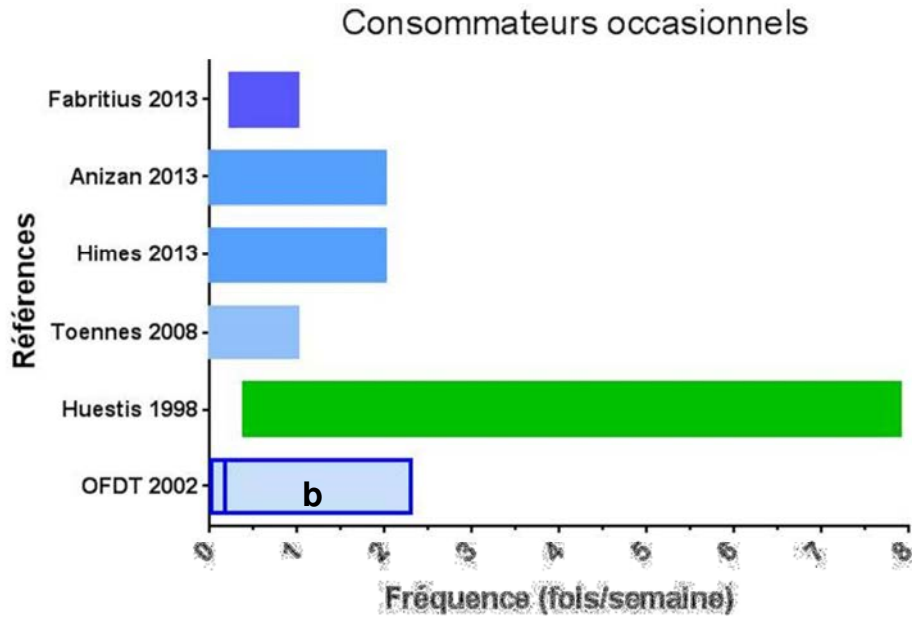


Figure 11a. Description de la consommation occasionnelle de cannabis selon six références différentes. Pour l'OFDT 2002, l'usage répété (*) a été ajouté à l'usage occasionnel.

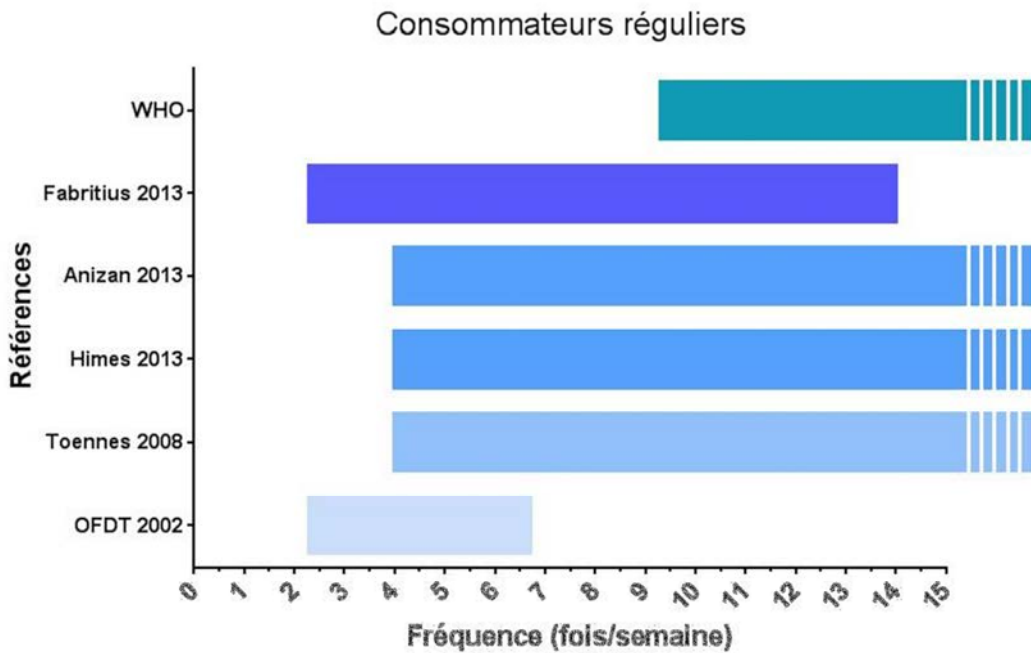


Figure 11b. Description de la consommation régulière de cannabis selon six références différentes.

Parfois, on considère le nombre de joints, d'autres fois les occasions pour définir les fréquences de consommation, ce qui apporte une ambiguïté supplémentaire.

Dans l'article présenté ci-dessous, nous proposons deux seuils calculés à partir de valeurs expérimentales obtenues avant et après avoir fumé un joint au cours de l'étude contrôlée d'administration de cannabis déjà décrite. Les analyses statistiques de nos résultats (boîtes à moustaches et courbes ROC) suggèrent une valeur seuil de 40 µg/L de THCCOOH dans le sang total au-dessus de laquelle on peut conclure à une consommation forte et répétée de cannabis. D'autre part, une concentration inférieure au seuil de 3 µg/L suggère fortement une utilisation occasionnelle.

Les résultats présentés doivent être considérés comme une aide permettant d'évaluer l'importance de la consommation de cannabis. Au cours d'un entretien avec un fumeur de cannabis, l'expert peut confronter les indications du consommateur quant à son usage au quotidien et les résultats quantitatifs obtenus pour le THCCOOH sanguin. Lorsque l'expert juge peu crédible la consommation déclarée par rapport à la concentration élevée du THCCOOH dans le sang, les consommateurs modifient souvent leur appréciation de consommateur à la hausse. C'est rare qu'ils maintiennent leur première version de fumeur léger.

IV.1.2.1. Article 5: THCCOOH concentrations in whole blood: Are they useful in discriminating occasional from heavy smokers?

THCCOOH concentrations in whole blood: Are they useful in discriminating occasional from heavy smokers?

Marie Fabritius,^a Bernard Favrat,^b Haithem Chtioui,^c Giovanni Battistella,^d Jean-Marie Annoni,^e Monique Appenzeller,^c Kim Dao,^c Eleonora Fornari,^{d,f} Estelle Lauer,^a Jean-Frédéric Mall,^g Philippe Maeder,^d Patrice Mangin,^a Christian Staub^a and Christian Giroud^{a*}

Some forensic and clinical circumstances require knowledge of the frequency of drug use. Care of the patient, administrative, and legal consequences will be different if the subject is a regular or an occasional cannabis smoker. To this end, 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCCOOH) has been proposed as a criterion to help to distinguish between these two groups of users. However, to date this indicator has not been adequately assessed under experimental conditions. We carried out a controlled administration study of smoked cannabis with a placebo. Cannabinoid levels were determined in whole blood using tandem mass spectrometry. Significantly high differences in THCCOOH concentrations were found between the two groups when measured during the screening visit, prior to the smoking session, and throughout the day of the experiment. Receiver operating characteristic (ROC) curves were determined and two threshold criteria were proposed in order to distinguish between these groups: a free THCCOOH concentration below 3 $\mu\text{g/L}$ suggested an occasional consumption (≤ 1 joint/week) while a concentration higher than 40 $\mu\text{g/L}$ corresponded to a heavy use (≥ 10 joints/month). These thresholds were tested and found to be consistent with previously published experimental data. The decision threshold of 40 $\mu\text{g/L}$ could be a cut-off for possible disqualification for driving while under the influence of cannabis. A further medical assessment and follow-up would be necessary for the reissuing of a driving license once abstinence from cannabis has been demonstrated. A THCCOOH level below 3 $\mu\text{g/L}$ would indicate that no medical assessment is required. Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: THCCOOH; cannabis; whole blood; heavy use; occasional use

Introduction

Cannabis is the most widely used illegal drug in Switzerland and in the western world. According to *Addiction Monitoring Switzerland 2012*,^[1] 5.1% of the Swiss population aged 15 or older has used cannabis at least once during the last 12 months (7.5% of men, 2.8% of women). The first nationwide study on driving while under the influence of drugs in Switzerland confirmed that the most frequently encountered drugs in whole blood (WB) were cannabinoids (48% of total number of cases).^[2] Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), together with its inactive metabolite 11-nor-9-carboxy-THC (THCCOOH), was frequently detected in the blood of impaired drivers arrested for careless driving or involved in road accidents.^[3,4] Accurate measurement and interpretation of cannabinoid concentrations can contribute to the reconstruction of the accident scene, determining the time lapse between the last cannabis use and the accident and the assessment of driving impairment level. In this regard, the ability to drive can be affected in the short term, long term, or permanently. The fitness to drive (long term) can be influenced by many parameters. One of them is frequency of cannabis use. Several recent studies suggest that, compared to occasional users, regular smokers experience the typical desired and adverse effects of cannabis less intensely. In the few controlled administration studies carried out so far with heavy cannabis smokers,^[5,6]

blunted acute psychological and psychomotor disturbances have been reported. Therefore, the development of a specific test and criterion to distinguish regular cannabis use (≥ 10 joints per

* Correspondence to: Christian Giroud, CURML (University Center of Legal Medicine), UTFC (Forensic Toxicology and Chemistry Unit), Lausanne and Geneva, Switzerland. E-mail: christian.giroud@chuv.ch

^a CURML (University Center of Legal Medicine), UTFC (Forensic Toxicology and Chemistry Unit), Lausanne and Geneva, Switzerland

^b CURML (University Center of Legal Medicine), UMPT (Unit of Psychology and Traffic Medicine), Lausanne and Geneva, Switzerland

^c Division of Clinical Pharmacology and Toxicology, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), Lausanne, Switzerland

^d Department of Toxicology, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), Lausanne, Switzerland

^e Neurology Unit, Department of Medicine, University of Erlangen, Erlangen, Switzerland

^f CIMB (Centre d'imagerie BioMédicale), Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV) unit, Lausanne, Switzerland

^g Department of Psychiatry, SUPAA (Service Universitaire de Psychiatrie de l'Age Avancé), Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), Lausanne, Switzerland

month) from occasional consumption (≤ 1 joint per week) is required to perform relevant driving ability evaluations. The suspicion of chronic consumption triggers a cascade of heavy and expensive administrative measures, but also of toxicological investigations to confirm a long-term alteration of the fitness to drive. If the assumption of regular cannabis use is refuted, the driver could reclaim his confiscated driving licence. The subject's medical history combined with a medical examination is only of limited use in detecting chronic cannabis use. In general, it is preferable to rely on objective data. Regular consumption can be assessed by measuring drug concentrations in hair. However, this matrix is not always available, or can be contaminated by cannabis smoke,^[7] or by contact with contaminated body parts (e.g. urine contaminated dirty hands) and materials, which makes the interpretation of analytical results difficult. Furthermore, in comparative studies, discrepancies have been found between 'positive' urine specimens and hair tested as 'negative'^(8,9) More recently, Han et al. failed to detect a significant correlation between self-reported doses and frequency of use and low, medium, and high hair THCCOOH concentration range groups.^[10,11] If hair analysis is of limited value in estimating the frequency of cannabis consumption, it is, however, widely used in the context of abstinence control. Thus, the measurement of cannabinoids in blood offers another strategy to assess the frequency of cannabis use. In this context, Daldrup et al.^[12] have suggested that if the serum concentration of THCCOOH is lower than 5 $\mu\text{g/L}$ the consumption is assumed to be occasional, while levels above 75 $\mu\text{g/L}$ are associated with regular use. This criterion could be applied in routine forensic examinations on the condition that serum samples are taken within an eight-day period following the last cannabis use.^[9] Assuming that the smoker would have stopped smoking during the eight days prior to blood sampling, the concentration of THCCOOH at the relevant time should be doubled to 150 $\mu\text{g/L}$. In 2008, Toennes et al.^[13] compared the pharmacokinetic properties of the three main cannabinoids in occasional and heavy cannabis users. They reported much higher concentrations in the serum collected from heavy users than from occasional smokers. These authors also indicated that the concentration ranges for these two consumer groups greatly overlapped. In 2013, the French Society of Analytical Toxicology (SFTA) advocated the use of hair analysis to discriminate between occasional and regular cannabis use.^[14] On the other hand, the SFTA recommended a cut-off of 50 ng/mL of THCCOOH WB for the inferior limit, over which a regular consumption of cannabis (1 joint/day, each day, or more) could be strongly suspected. In this study, we report on THCCOOH concentrations measured in 797 WB specimens collected during a placebo-controlled

smoking administration study of cannabis in which heavy and occasional subjects were enrolled. WB samples were collected during the screening visit, before and after smoking a joint or a placebo, and up to 3.5 h after the first puff. THCCOOH levels in WB were determined by gas chromatography (GC) or liquid chromatography (LC) combined with tandem mass spectrometry (MS/MS).

The purpose of this study is to show that significant differences between these two populations of smokers exist. The second goal is to propose two THCCOOH threshold concentrations to help determine whether they are occasional or regular cannabis consumers.

Materials and methods

Study design

The overall design of the study that included various clinical, neuroimaging, and psychomotor investigations has been described in a previous publication and its supporting information.^[15] The imaging sessions determined the timeframe of the one-day experiment. The study was extended to include a similar-sized group of young male heavy cannabis smokers. Twenty-three heavy smokers and 25 occasional smokers, between 18 and 30 years of age, participated in this study. For the occasional smokers, the mean consumption of cannabis during the three months preceding inclusion in the study was set at a minimum of one joint per month and a maximum of one joint per week. It was set at a minimum of ten joints per month and less than three joints per day for the heavy users. Heavy smokers who were multi-daily users (> 3 joints/day) were excluded from the study because they were unlikely to remain drug-free during the experimental day, mostly after placebo smoking. Main socio-demographic characteristics and habits of cannabis consumption reported by the volunteers are presented in Table 1. Consumption of any illegal drug other than cannabis was an exclusion criterion from the study. Subjects recruited for the study participated in two independent cross-over experimental sessions in which they smoked either a joint of pure cannabis (0.7 g Bedrobinol, 11% THC, $< 1\%$ CBD, purchased from Bedrocan, Veendam, the Netherlands) or a placebo (0.8 g Santhica variety, no THC, $< 0.1\%$ CBD, provided by the French National Federation of Hemp Growers, FNPC, Le Mans, France). The fixed-paced smoking procedure consisted of 3 s of preparation, 2 s of inhalation, 5 s of breath holding and 50 s of exhalation and rest. This sequence was repeated until two-thirds of the joint was consumed, up to a line drawn 3 cm above the cardboard filter. The residue was weighed to estimate the smoked dose.^[15] The investigation period began

Table 1. Sociodemographic characteristics and self-rated patterns of cannabis use in occasional and heavy smokers

	Number	Mean	SD	Median	Maximum	Minimum
Occasional smokers						
Age		23.9	3.0	24	29	19
Age at first cannabis use		16.3	2.9	16	23	9
Frequency of use (occasions/month, last three months)		3.5	2.3	3.5	10	1
Driving license	22/25 (88 %)					
Heavy smokers						
Age		22.7	2.4	22	28	19
Age at first cannabis use		16.3	2.3	16	20	12
Frequency of use (occasions/month, last three months)		77.9	51.7	62.5	250	20
Driving license	14/23 (61 %)					

in the late morning (11 a.m.) and ended in the evening when the symptoms of intoxication were almost imperceptible (up to 9 p.m.). The volunteers were kept under close watch throughout the day of the experiment. Blood samples were collected several hours (5 h) and a few minutes before smoking the joint ($t=0$ h) (C_0) and at 0.2, 0.3, 0.4, 0.65, 1.0, 2.5, and 3.5 h after inhalation. Samples were immediately frozen and kept at -80°C before analysis. For time schedule reasons, the last blood sample was omitted for the occasional smokers.

This study was conducted in accordance with good clinical practices and was approved by the Cantonal Research Ethics Committee (Vaud). The subjects gave written informed consent and received financial compensation for their participation.

Materials

THC, THCCOOH, and corresponding internal standards (THC- d_3 and THCCOOH- d_9) were obtained from Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA). Trifluoroacetic anhydride (TFAA) and hexafluoro-2-propanol (HFIP) were purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA) and Fluka (Buchs, Switzerland), respectively. Hexane, acetonitrile and ethyl acetate were of high-performance chromatographic grade from Merck (Darmstadt, Germany).

Methods

Analyses of the occasional smokers' blood specimens were carried out according to the procedure described by Thomas *et al.*^[16] Five hundred μL of WB were extracted using a liquid-liquid extraction (LLE) with hexane: ethyl acetate (9:1, v/v) and then derivatized with a mixture of TFAA and HFIP as fluorinated agents. The analysis by MS was performed in the selected reaction-monitoring mode with a Varian 1200 L MS/MS triple quadrupole instrument after negative-ion chemical ionization. The limits of quantification (LOQ) of the method were 0.5 $\mu\text{g/L}$ and 2.5 $\mu\text{g/L}$ for THC and THCCOOH, respectively.

The same extraction procedure was used for the blood samples of the heavy smokers, but the analysis was carried out by LC-MS/MS without a derivatization step. The ion transitions, MS parameters and LC-MS/MS equipment were the same as those described in a previously published procedure for oral fluid.^[17] The recommendations of the French Society of Pharmaceutical Sciences and Techniques (SFSTP) were followed to validate this LC-MS/MS method. Linearity of this method was from 0.5 to 20 $\mu\text{g/L}$ and from 2.5 to 100 $\mu\text{g/L}$ for THC and THCCOOH, respectively. Four quality control specimens (QC) (0.5, 1, 10, 20 $\mu\text{g/L}$ for THC and 2.5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/L}$ for THCCOOH) were analyzed four times on the same day and on three non-consecutive days to determine the trueness and precision parameters.^[16] The trueness results ranged between 86% and 113%. The coefficients of variation (CV) of intra-day and intermediate precisions were lower than 15% in all cases. Intraday precision results ranged between 3.5 and 11% for THC and between 5.8 and 9.8% for THCCOOH. Intermediate precision values ranged between 3.8 and 9.8% and 3.9 and 13.8% for THC and THCCOOH, respectively. LOQ values were determined at the lower QC with a trueness higher than 85% and CVs lower than 20%. LOQs were 0.5 and 2.5 $\mu\text{g/L}$ for THC and THCCOOH, respectively. To facilitate the reading of the results, concentrations lower than the LOQ were reported as zero. To cross-validate GC-MS/MS and LC-MS/MS methods, the same QC were analyzed. No significant difference was observed

between these methods. Furthermore, ten authentic blood specimens were analyzed with both methods yielding almost identical results.

Statistical analysis

Data, receiver operating characteristics (ROC) curves, box and whisker graphs were processed and plotted using Excel 2007 and GraphPad Prism 6.02 softwares. True positives (TP) were correctly identified smokers, i.e. heavy smokers with THCCOOH concentrations higher than the threshold. False positives (FP) were incorrectly identified heavy smokers, i.e. occasional smokers with THCCOOH concentrations higher than the threshold. True negatives (TN) were correctly rejected consumers, i.e. occasional smokers with THCCOOH concentrations lower than the threshold. False negatives (FN) were incorrectly rejected users, i.e. heavy smokers with THCCOOH levels lower than the threshold. Sensitivity was the proportion of true positives in heavy smokers who presented sample values exceeding the threshold and was calculated as $\text{TP} / (\text{TP} + \text{FN})$. Specificity was estimated by the ratio: $\text{TN} / (\text{TN} + \text{FP})$. The positive likelihood ratio (LR+) was calculated as follows: sensitivity divided by $1 - \text{specificity}$.^[18,19] The ROC curve is a graphical plot of true positive rate (sensitivity) versus false positive rate ($1 - \text{specificity}$) for each THCCOOH threshold. The maximum specificity cut-off to rule in the heavy users was set close to the lower left corner of the ROC curve while the maximum sensitivity cut-off to rule out the heavy smokers was set close to the upper right corner.

Results

Sociodemographic characteristics of the volunteers

The two groups of young men were very similar: 25 were occasional smokers and 23 were heavy cannabis users. Their mean age were almost the same (23.9 and 22.7, respectively). Surprisingly, they had the same age of first cannabis use (16.3), but they differed in their frequency of consumption (3.5 and 77.9 occasions per month for occasional and heavy smokers, respectively). A higher proportion of occasional consumers had a valid driving license (88 versus 61%).

Kinetic profiles of THC and THCCOOH

Figure 1 shows the median time profiles of THC and THCCOOH for the heavy and occasional smokers, before and after smoking a cannabis joint. These consumers presented similar profiles with parallel kinetic curves. When considering each curve separately, the inter-quartile range indicates a broad but relatively constant dispersion of THCCOOH values throughout the experiment timeframe. Median C_0 were 2.1 (range 0.8 to 7.1) and 0 (0–1.4) $\mu\text{g/L}$ for THC and 20 (2.5–51) and 0 (0–17) $\mu\text{g/L}$ for THCCOOH for the heavy and occasional cannabis users, respectively. This latter difference of about 20 $\mu\text{g/L}$ between the two THCCOOH C_0 levels remained more or less constant throughout the experience: for example, median THCCOOH concentrations measured 2.5 h after smoking the joint were 26 (9.4–78) and 7.1 (0–29) $\mu\text{g/L}$ for the heavy and occasional smokers respectively. Cannabinoid levels were also determined before and after smoking the placebo joint (results not shown). The median THC levels remained lower than 2 $\mu\text{g/L}$ throughout the experiment, while THCCOOH concentrations in the heavy smokers were

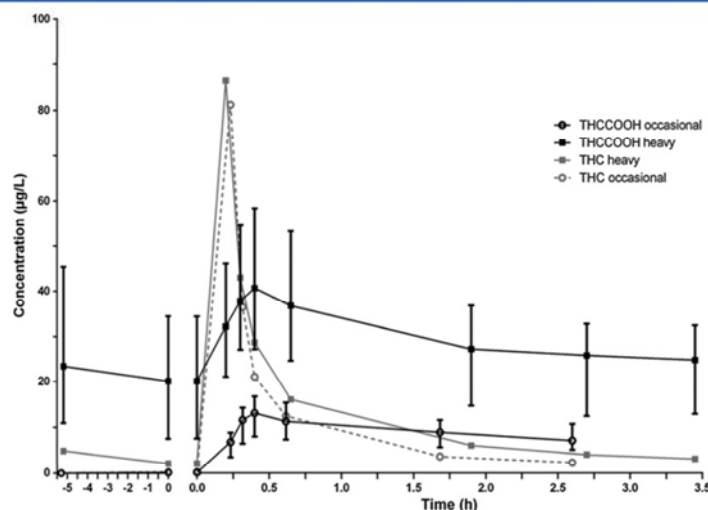


Figure 1. Median THC and median (interquartile) THCCOOH time profiles in whole blood of occasional and heavy users before and after smoking a cannabis joint.

almost all significantly higher than the LOQ value. The median THCCOOH concentrations in the heavy smokers decreased slowly from 17 (4.3–48) to 10 (0–32) $\mu\text{g/L}$ between 5 h before and 3 h after smoking the placebo joint. The corresponding C_0 median level was 12 (2.9–38) $\mu\text{g/L}$. THC could not be quantified in any sample of occasional users after smoking the placebo. THCCOOH was detected in only 14 samples out of 393, i.e. the median value at each time point remains 0 during the placebo experimental session.

Concentration differences for THCCOOH between occasional and regular cannabis smokers

The results for THCCOOH levels are presented as box and whisker plots in Figure 2. Statistical comparisons (Mann–Whitney test) were made between the occasional and heavy smokers at each time point. The heavy smokers' THCCOOH concentrations were also compared to the C_{max} values of the occasional smokers. Median (range) THCCOOH concentrations determined at inclusion were 24 (4.6–70) and 0 (0–<2.5) $\mu\text{g/L}$ for the heavy and occasional smokers, respectively. This difference between groups was highly significant ($p < 0.0001$). The highest THCCOOH concentration for the occasional smokers was below the LOQ value while the lowest concentration for the heavy smokers was 4.6 $\mu\text{g/L}$. Similar results were obtained for THCCOOH levels just before smoking the placebo or the cannabis joint: the median THCCOOH C_0 were 12 and 20 $\mu\text{g/L}$ for the heavy smokers and 0 and 0 $\mu\text{g/L}$ for the occasional smokers, respectively. As described in the previous paragraph, THCCOOH concentrations measured 2.5 h after inhalation of the cannabis joint were 28 and 7.1 $\mu\text{g/L}$ for the heavy and occasional smokers respectively. These values were also significantly different ($p < 0.0001$). Likewise, the difference between the THCCOOH C_{max} of the two groups was significant, with median values of 41 and 13 $\mu\text{g/L}$ for heavy and occasional smokers, respectively. However, THCCOOH C_{max} determined in the blood of the occasional

cannabis users were not significantly different from those measured in the heavy smokers' group before smoking the cannabis or the placebo joint. When we made the same comparison with the ranges of values measured at inclusion and at the end of the day of the experiment, significant differences were noticed between the heavy and occasional smokers ($p < 0.0017$ and < 0.0023).

ROC curves before inhalation and after smoking

In the ROC curves shown in Figure 3, the true positive rate (Sensitivity) is plotted as a function of the false positive rate (100–Specificity) for different cut-off points of the THCCOOH concentration. Each point on the ROC curve represents a sensitivity/specificity pair corresponding to a particular decision threshold. The main contribution of the ROC graph is to find out which THCCOOH concentration is the best decision threshold for differentiating occasional smokers from heavy users. Figure 3a and 3b present the ROC curves obtained with THCCOOH concentrations at $t=0$, at $t=2.5$ h while Figure 3c displays the compilation of all time data, including those of the smoking session with placebo. The ROC curves of other sampling times are also calculated and show the same trends as those measured before smoking and at the end of the experiment (results not shown). The group of occasional smokers was selected as the control group while the heavy smokers were considered as the group being studied. The area under the ROC curve is a measure of how well a parameter can distinguish between the two groups of cannabis users (occasional/heavy). Areas of the ROC curves calculated for each sampling time are very similar, ranging from 0.90 to 0.96, and thus can be considered as very informative.^[19] The same conclusion can be drawn from the compilation of all the time points (area equal to 0.88). Before inhalation, a sensitivity of 100 % (i.e. including all the heavy users) was obtained for a THCCOOH concentration higher than 2.3 $\mu\text{g/L}$. A THCCOOH level higher than 18.3 $\mu\text{g/L}$ was associated with a

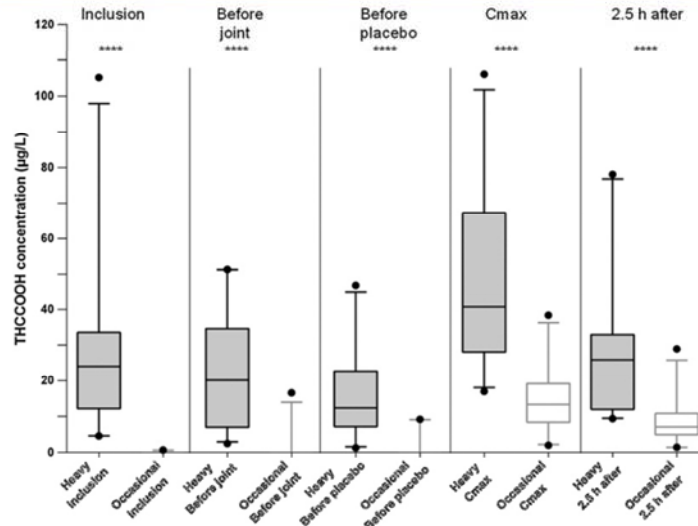


Figure 2. Box and whisker plots (5/95 percentile) comparing the distribution of THCCOOH concentrations in whole blood of occasional and heavy smokers at different times before and after smoking a cannabis or a placebo joint.

specificity of 100 % (i.e. excluding all the occasional smokers). At $t=2.5$ h, these cut-offs were $8.6 \mu\text{g/L}$ and $29.5 \mu\text{g/L}$ for a sensitivity and a specificity of 100%, respectively. The two best decision thresholds (points 1 and 2, empty circles) were determined using the ROC curve that compiles all THCCOOH concentrations. Point 1 (lower left corner; $40 \mu\text{g/L}$) corresponds to the threshold with a specificity of 100% that is associated with the greatest sensitivity. This threshold ($> 40 \mu\text{g/L}$) is used to rule in the heavy smokers. Point 2 (towards the upper right corner; $3 \mu\text{g/L}$) is the threshold value that shows the closest sensitivity to 100% that is associated with the highest specificity. This threshold is used to rule out the heavy smokers.

To validate and confirm the choice of these two decision thresholds, their diagnostic characteristics were calculated and compared to those of other alternative cut-offs found on both sides of these values. Table 2 lists the sensitivity and specificity values with associated LR+ obtained from the compilation of all time data. THCCOOH blood concentrations and corresponding serum values are also reported. This latter parameter was estimated from the THCCOOH serum/WB concentrations ratios determined by Giroud *et al.* (1.7)^[20] and corroborated by Karschner *et al.* (1.8).^[21] Table 2 indicates that the two selected cut-offs represent a good compromise between likelihood ratio, specificity, and sensitivity.

The THCCOOH threshold of $3.0 \mu\text{g/L}$ was correlated with a specificity of 62 % (LR+ of 2.6) and a sensitivity of 97%. The same parameters for a cut-off greater than $40 \mu\text{g/L}$ were 100 (infinite LR+) and 16 %. An infinite positive likelihood ratio indicated that the probability to be an occasional smoker with a THCCOOH level greater than $40 \mu\text{g/L}$ was null. Conversely, an LR+ of 2.6 associated with a cut-off of $> 3.0 \mu\text{g/L}$ indicated that it was only 2.6 times more likely to be a heavy smoker than an occasional user. Almost identical results were obtained when considering only the samples collected after cannabis smoking (results not shown). Table 3 lists the number of blood specimens that agreed

or disagreed with the condition 'to be a heavy smoker' and fulfilled the requirement 'to be higher than the decision cut-off of 40 or $3 \mu\text{g}$ THCCOOH/L'.

Discussion

THCCOOH concentrations in WB collected from documented heavy and occasional cannabis users enrolled in the controlled administration study are presented. The distinction between occasional and regular cannabis smokers is important in the context of driving assessment and evaluation of long-term fitness to drive. In this respect, Fergusson *et al.*^[22] have shown the correlation between the rate of active traffic accidents and an increased frequency of cannabis use. The main finding of our study was that the range of THCCOOH levels in the regular smokers was significantly higher than that in the occasional consumers. We also proposed two thresholds to help distinguish between regular and occasional cannabis users. According to Table 1, the two groups of smokers differed mostly in their frequency of cannabis consumption, with distinct and broad ranges of use. Because of the large variations in their smoking habits and inhalation techniques, a broad range of THCCOOH blood concentrations was expected at inclusion and throughout the day of the experiment. Although the concentrations varied considerably, THCCOOH blood levels between occasional and heavy smokers remained significantly different throughout the day of the experiment, as shown in Figure 1. It is noteworthy that the experimental conditions included a wide range of circumstances: blood sampled before smoking or after inhaling a placebo joint reflects what happens in the late elimination phase, while samples taken during the first 3 h following joint inhalation are typical of the distribution and early elimination phase. Furthermore, two methods of smoking are represented: THCCOOH detected at inclusion or after smoking a placebo is

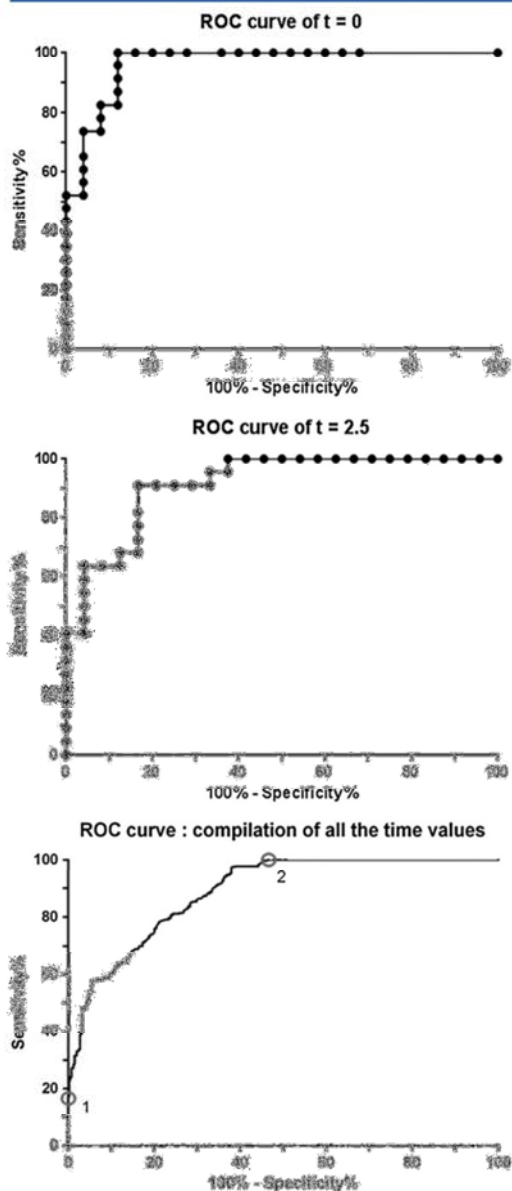


Figure 3. ROC curves of THCCOOH concentrations in whole blood calculated (a) before smoking ($t=0$ h), (b) after smoking a cannabis joint ($t=2.5$ h) and (c) of THCCOOH values compiled throughout the study. Circle 1 = 40 $\mu\text{g/L}$: cut-off to rule in heavy smokers. Circle 2 = 3.0 $\mu\text{g/L}$: cut-off to rule out heavy smokers.

observed in THCCOOH levels between the occasional and heavy smokers could therefore be used to establish indicators of the frequency of cannabis consumption. These differences were also found to be significant when considering each time point separately (see the box and whisker plots shown in Figure 2). However, as already mentioned by Toennes *et al.*,^[13] the range of THCCOOH concentrations partially overlapped between each group. A grey area was found between about 3.0 and 30 $\mu\text{g/L}$ for which no sharp distinction could be made. This can be observed in Figure 2; no significant difference could be made between THCCOOH C_{max} in occasional smokers and THCCOOH concentrations measured in heavy smokers before smoking a joint or a placebo. Therefore, making a clear distinction between an occasional consumer who has just smoked a joint and a heavy smoker who has stopped smoking for several hours is hardly possible. Daldrup *et al.*^[13] suggested that THCCOOH and THC levels in serum could be used as indicators to discriminate between regular and occasional cannabis use. Their conclusions were that serum THCCOOH concentrations lower than 5 $\mu\text{g/L}$ suggested occasional consumption and levels above 75 $\mu\text{g/L}$ were correlated with regular consumption. These cut-offs were based on the few published studies that distinguish between regular and occasional consumers, and which also take into consideration the eight days between the relevant event and the time of blood sampling. Depending on whether the driver with a serum level of 75 $\mu\text{g/L}$ stopped or continued to smoke, his serum concentration eight days before would range between 75 and 150 $\mu\text{g/L}$. When taking into account the blood serum-plasma distribution of cannabinoids,^[14] corresponding THC concentrations of about 3, 43, and 86 $\mu\text{g/L}$ can be calculated. As shown in Figure 2, this latter value greatly exceeds almost all of those determined for the group of heavy smokers. Similarly, the value of 43 $\mu\text{g/L}$ exceeds most of the THCCOOH concentrations of the heavy smokers, while the proposed lowest threshold is in accordance with the majority of the values determined for the occasional smokers. Furthermore, none of the THCCOOH concentrations measured in the blood of the occasional smokers exceeded the threshold value of 43 $\mu\text{g/L}$, while only a few values determined in the blood of the heavy smokers were lower than the 3 $\mu\text{g/L}$ threshold. Our data were not inconsistent with the cut-off suggested by Daldrup *et al.* However, the experimental conditions of the two studies were significantly different. Regarding their usual consumption of cannabis, we did not ask the participants to change their habits. However, in the study of Daldrup *et al.*, the subjects were suspected of driving under the influence of cannabis and were asked for further toxicological investigations within eight days to determine the serum THCCOOH concentrations. Although the terminal blood half-life of THCCOOH is very long, it can be assumed (especially if they were arrested in a time period preceding the terminal elimination phase) that they would have seriously decreased their consumption, resulting in higher levels of THCCOOH at the time of the event. Our study evaluates THCCOOH blood levels issues without exerting any influence on the smokers' behaviour. Participants were even encouraged to keep their habits unchanged and to maintain their usual cannabis consumption (frequency and dose), with the exception of abstinence during the four hours prior to the investigation day.

To determine our cut-off values, we established the ROC curves. The areas which were close to 1 indicated that heavy smokers could be clearly distinguished from occasional users. According to Table 2, if we select 3.0 $\mu\text{g/L}$ as a cut-off (Point 2

the result of *ad libitum* self-administration, while THCCOOH levels determined after joint smoking are the consequence of the controlled paced and self-administration. The differences

THCCOOH concentrations in whole blood: are they useful in discriminating occasional from heavy smokers?

Table 2. Diagnostic characteristics of free THCCOOH concentrations test in cannabis smokers enrolled in a joint smoking administration study

	THCCOOH blood level	THCCOOH estimated serum level*	Sensitivity	Specificity	Likelihood ratio
Heavy smokers rule out cut-off	> 2.5 µg/L	> 4.4 µg/L	98	61	2.5
	> 3.0 µg/L	> 5.2 µg/L	97	62	2.6
	> 5.0 µg/L	> 8.7 µg/L	91	65	2.6
	> 10 µg/L	> 17 µg/L	75	80	3.7
Heavy smokers rule in cut-off	> 30 µg/L	> 52 µg/L	29	98	20
	> 35 µg/L	> 61 µg/L	23	99	90
	> 40 µg/L	> 70 µg/L	16	100	∞
	> 45 µg/L	> 79 µg/L	13	100	∞
	> 50 µg/L	> 87 µg/L	9.5	100	∞

* Serum/WB ratio = 1.75^[20,21]

Table 3. Two by two tables for two different cut-offs (40 and 3.0 µg/L). Number and percentage of blood specimens (total number N = 797) which meet the condition "belong to the heavy smokers' group" and THCCOOH level "greater than the cut-off"

		Heavy smokers	
		Yes	No
> 40 µg/L	Yes	66 (8.2 %)	0 (0 %)
	No	338 (42.4 %)	393 (49.3 %)
> 3.0 µg/L	Yes	392 (49.2 %)	152 (19.1 %)
	No	12 (1.5 %)	241 (30.2 %)

of the ROC curve), the specificity indicated that 62 % of occasional smokers' THCCOOH values were correctly assigned to the occasional group. The sensitivity showed that 97 % of the heavy users' samples were higher than 3.0 µg/L and were not falsely attributed to the occasional group. For an unknown sample with a THCCOOH level of 3.0 µg/L, it was 2.6 times more likely that it belonged to the heavy smokers' group than to the occasional smokers. At a concentration of 40 µg/L, only 16% of the heavy smokers' specimens were correctly detected, but no samples from the occasional consumers were falsely assigned (specificity of 100 %). This is confirmed by the results presented in Table 3. A null proportion of blood specimens from the occasional smokers presented a THCCOOH blood concentration higher than 40 µg/L. Consequently, within the context of assessment of fitness to drive, our results suggest 3.0 and 40 µg/L as decision thresholds to assess in which category of cannabis smokers the drivers belong: occasional (< 3.0 µg/L) or heavy smokers (> 40 µg/L)? Our suggested cut-offs are quite similar to those proposed by Daldrup *et al.*^[12] An external validation of our decision thresholds was then carried out using the values reported by Toennes *et al.*^[13] In their study, the authors compared the serum cannabinoid pharmacokinetic properties in occasional and heavy users smoking a marijuana or placebo drug. Figure 4 shows the ROC curve obtained from these seven data that include 60 heavy smokers' samples and 22 specimens from occasional users. The area of the ROC curve (0.7459) was much lower than that of our study. The sensitivity and specificity obtained with these data were 31% and 100 %, respectively, for a threshold of 70 µg/L of serum (corresponding to about 40 µg/L in WB, calculated with the serum-to-WB ratio of 1.75). This confirms that our proposed cut-off of 40 µg/L in WB can be used as a screening test to detect heavy cannabis users. Concerning the cut-off of 5 µg/L in serum (corresponding to 3 µg/L in WB),

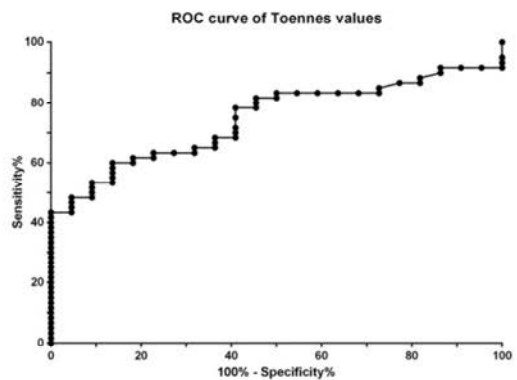


Figure 4. ROC curve established using values reported in Toennes *et al.*'s study^[13].

Toennes' values gave a specificity of 7.1% and a sensitivity of 92 %. However, because very few samples from the occasional smokers were below this threshold, the positive likelihood ratio was only 1.0. As mentioned before, there is a paucity of studies making a clear distinction between occasional and heavy smokers. Skopp and Pötsch^[23] showed that, 24–48 h after their last drug use, serum THCCOOH levels were below 17 µg/L in light users while heavy, regular users presented a free THCCOOH level reaching values of 297 µg/L. If we consider the THCCOOH disposition in plasma of frequent cannabis users during continuous monitored abstinence, the results reported by Karschner *et al.*^[24] indicate that after 5 days' abstinence none of 18 long-term heavy cannabis smokers were classified as heavy consumers according to our proposed decision threshold of 40 µg/L in WB. However, after so long a period of abstinence, these cannabis users can't be considered regular consumers anymore. In daily practice, a large-scale study carried out in all the main areas of Switzerland has shown that 40% of 6375 blood specimens collected during the years 2005 to 2007 were above the decision threshold of 40 µg/L. The proportion of cases below 3 µg/L was insignificant (less than 1.5%).^[2,25] Furthermore, the time interval between the traffic event and the blood sampling was unexpectedly short, with a mean value of 1.5 h (M. Augsburg, pers. comm.). This short period of time indicates that a retrospective calculation is generally not required. The circumstances in which the knowledge of the THCCOOH

concentration can be of use are very specific. The detection of THC in the blood, within the context of the Swiss zero-tolerance policy, demonstrates that at the time of blood sampling the driver was under the influence of cannabis and his/her ability to drive was impaired short-term. The forensic expert is then asked to determine whether their fitness to drive is also altered long-term. Depending on the clinical and psychological context of the driver, knowledge of blood THCCOOH levels may be very useful to guide or narrow diagnosis of chronic use and possibly of dependence, and facilitate therapeutic follow-up and treatment. A long and costly therapeutic monitoring will be not necessary if the THCCOOH level is below 3 µg/L and the medical interview suggests that cannabis smoking is occasional at most. In this case, the driver can reclaim their driving license. On the other hand, if the THCCOOH level is higher than 40 µg/L and the medical assessment indicates a regular consumption, a therapeutic follow-up for a cannabis use disorder must be undertaken. After a proven period of abstinence and regular medical follow-ups, a driving license may be returned to a driver who has been a heavy cannabis smoker in the past. If the THCCOOH concentration is in the grey zone between 3 and 40 µg/L and the medical assessment does not exclude a regular use, it is advisable to undertake a forensic expertise and a therapeutic follow-up. Therefore, THCCOOH provides a useful orientation tool for the forensic expert within the context of assessing fitness to drive.

Limitations of the study

For each clinical trial, compromises and choices must be made. In this broad cannabis administration study, two parameters have greatly influenced the time-schedule of the day of experiment. First, we chose to keep the volunteers under close supervision for several hours before administration of the joint. The second parameter was the timing of the fMRI sessions. Finally, the infrastructure of the clinical research centre, the ethical committee agreement, and the volunteers' availability were not compatible with a multi-day experiment. The drawback was that a long investigation after inhalation was not possible. The robustness of the proposed cut-offs should be tested in a variety of conditions. Other ways of smoking and different dosage regimens should be investigated. The influence of varying the proportions of tobacco should also be tested. Furthermore, different frequencies of consumption could be considered, for instance regular versus intermittent versus 'weekend binge weed smoking'. In addition, the concurrent intake of illegal or therapeutic drugs interacting with THC metabolism could be studied. The consequences of altered THC metabolism related to genetic polymorphisms of CYP2C9 and glucuronosyltransferase enzymes should also be evaluated. In our opinion, it could be interesting to quantify separately free THCCOOH and its glucuronide conjugate. However, this molecule is almost never considered in routine work.

Conclusion

Whole blood THCCOOH concentrations of heavy cannabis smokers determined in a controlled administration study greatly exceeded those measured in the occasional users' group. Therefore, we can take advantage of this difference to estimate to which category of smokers the drivers belong. A level of THCCOOH higher than

40 µg/L is strongly correlated with a heavy consumption of cannabis, whereas a concentration below 3 µg/L suggests occasional use. These threshold values can be used as guidance criteria to help the forensic expert in the classification of impaired drivers as heavy or occasional users. A heavy consumption may suggest a long-term unfitness to drive that should be followed by further toxicological investigations and therapeutic follow-up. Once abstinence has been demonstrated, the driver can reclaim their driving license.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Swiss National Science Foundation (FNS_320030_127507/1), the Centre d'Imagerie BioMédicale (CIBM) and the Faculty of Biology and Medicine (interdisciplinary grant) at the University of Lausanne for their financial support. We thank Dr Marc Augsburger of the University Center of Forensic Medicine Lausanne-Geneva, Prof. Thierry Buclin, and the staff of the division of Clinical Pharmacology and Toxicology at CHUV. We also thank Dr Frank Sporkert for fruitful discussion.

References

- http://www.bag.admin.ch/suchtmontoring/index.html?lang=fr. Monitoring suisse des addictions: être bien informé pour mieux prévenir. (October 2013)
- M.C. Simms, M.C. Augsburger, B. Aebi, T.A. Ehrhart, N. Donze, J.L. Dubrasani, P.L. van, C. Schaub, W. Baum, K. Simms. First nationwide study on driving under the influence of drugs in Switzerland. *Forensic Sci. Int.* **2010**, *198*, 11.
- M. Augsburger, N. Donze, A. Menetrey, C. Brossard, F. Sporkert, C. Giroud, P. Mangin. Concentration of drugs in blood of suspected impaired drivers. *Forensic Sci. Int.* **2005**, *153*, 11.
- A. Menetrey, M. Augsburger, C. Giroud, P. Mangin. [Cannabis and automobile driving]. *Praxis (Bern 1994)* **2001**, *90*, 1398.
- M. Fabritius, H. Chtioui, G. Battistella, J.M. Annoni, K. Dao, B. Favrat, E. Fornari, E. Lauer, P. Maeder, C. Giroud. Comparison of cannabinoid concentrations in oral fluid and whole blood between occasional and regular cannabis smokers prior and after smoking a cannabis joint. **2013**, *Anal. Bioanal. Chem.* DOI: 10.1007/s00216-013-7412-1.
- J.G. Ramaekers, G. Kauert, E.L. Theunissen, S.W. Toennes, M.R. Moeller. Neurocognitive performance during acute THC intoxication in heavy and occasional cannabis users. *J. Psychopharmacol.* **2009**, *23*, 266.
- B. Moosmann, N. Roth, V. Auwärter. Hair analysis for THCA-A, THC and CBH after passive *in vivo* exposure to marijuana smoke. *Drug Test. Anal.* **2013**, DOI: 10.1002/dta.1474.
- M.A. Huestis, R.A. Gustafson, E.T. Moolchan, A. Barnes, J.A. Bourland, S.A. Sweeney, E.F. Hayes, P.M. Carpenter, M.L. Smith. Cannabinoid concentrations in hair from documented cannabis users. *Forensic Sci. Int.* **2007**, *169*, 129.
- F. Musshoff, B. Madea. Review of biologic matrices (urine, blood, hair) as indicators of recent or ongoing cannabis use. *Ther. Drug Monit.* **2006**, *28*, 155.
- E. Han, H. Choi, S. Lee, H. Chung, J.M. Song. A study on the concentrations of 11-nor-Delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCCOOH) in hair root and whole hair. *Forensic Sci. Int.* **2011**, *210*, 201.
- E. Han, H. Chung, J.M. Song. Segmental hair analysis for 11-nor-Delta (9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid and the patterns of cannabis use. *J. Anal. Toxicol.* **2012**, *36*, 195.
- T. Daldrup, H. Käferstein, H. Köhler, R. Maier, F. Musshoff. Deciding between one off/occasional and regular cannabis consumption. *Blutalkohol* **2000**, *37*, 39.
- S.W. Toennes, J.G. Ramaekers, E.L. Theunissen, M.R. Moeller, G.F. Kauert. Comparison of cannabinoid pharmacokinetic properties in occasional and heavy users smoking a marijuana or placebo joint. *J. Anal. Toxicol.* **2008**, *32*, 470.
- Société Française de Toxicologie Analytique. Website. Available at: http://sfta.org/presentation/main/main_accueil.php [24 October 2013]
- G. Battistella, E. Fornari, A. Thomas, J.F. Mall, H. Chtioui, M. Appenzeller, J.M. Annoni, B. Favrat, P. Maeder, C. Giroud. Weed or wheel? fMRI, behavioural, and toxicological investigations of how cannabis smoking affects skills necessary for driving. *PLoS One* **2013**, *8*, e52545.

- [16] A. Thomas, C. Widmer, G. Hopfgartner, C. Staub. Fast gas chromatography and negative-ion chemical ionization tandem mass spectrometry for forensic analysis of cannabinoids in whole blood. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *45*, 495.
- [17] M. Fabritius, C. Staub, P. Mangin, C. Giroud. Analysis of cannabinoids in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicol.* **2013**, *31*, 151.
- [18] L. Chrostek, B. Cylwik, E. Gruszewska, J. Tobolczyk. The diagnostic power of direct carbohydrate-deficient transferrin immunoassay in alcoholics. Absolute or relative values? *Alcohol* **2012**, *46*, 69.
- [19] H. Delacour, A. Servonnet, A. Perrot, J.F. Vigezzi, J.M. Ramirez. [ROC (receiver operating characteristics) curve: principles and application in biology]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **2005**, *63*, 145.
- [20] C. Giroud, A. Menetrey, M. Augsburg, T. Buclin, P. Sanchez-Mazas, P. Mangin. Delta(9)-THC, 11-OH-Delta(9)-THC and Delta(9)-THCCOOH plasma or serum to whole blood concentrations distribution ratios in blood samples taken from living and dead people. *Forensic Sci. Int.* **2001**, *123*, 159.
- [21] E.L. Karschner, D.M. Schwoppe, E.W. Schwilke, R.S. Goodwin, D.L. Kelly, D.A. Gorelick, M.A. Huestis. Predictive model accuracy in estimating last Delta9-tetrahydrocannabinol (THC) intake from plasma and whole blood cannabinoid concentrations in chronic, daily cannabis smokers administered subchronic oral THC. *Drug Alcohol Depend.* **2012**, *125*, 313.
- [22] D.M. Fergusson, L.J. Horwood. Cannabis use and traffic accidents in a birth cohort of young adults. *Accid. Anal. Prev.* **2001**, *33*, 703.
- [23] G. Skopp, L. Potsch. Cannabinoid concentrations in spot serum samples 24–48 hours after discontinuation of cannabis smoking. *J. Anal. Toxicol.* **2008**, *32*, 160.
- [24] E.L. Karschner, E.W. Schwilke, R.H. Lowe, W.D. Darwin, R.J. Herning, J.L. Cadet, M.A. Huestis. Implications of plasma Delta9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC concentrations in chronic cannabis smokers. *J. Anal. Toxicol.* **2009**, *33*, 469.
- [25] SGRM. Description de la section. Available at: <http://www.sgrm.ch/fr/chemie/ueber-die-sektion.html> [24 October 2013].

IV.1.3. Résultats des analyses des échantillons urinaires

Tous les échantillons urinaires de l'étude ont été analysés. Cependant, dans un souci de clarté et afin de ne pas surcharger ce document, l'ensemble des données n'est pas présenté. Les concentrations moyennes, médianes, minimales et maximales de THCCOOH libre, THCCOOH total, THC-gluc et THCCOOH-gluc sont données dans le tableau 1 pour les fumeurs occasionnels et réguliers.

Tableau 1. Concentrations en THC-gluc, THCCOOH-gluc, THCCOOH libre et hydrolysé dans les urines des sujets volontaires de l'étude Cannabis / IRMf / conduite automobile

	THC-gluc (nmol/L) A	THCCOOH- gluc (nmol/L) B	THCCOOH libre (nmol/L) C	THCCOOH- gluc + THCCOOH libre B + C (nmol/L)	THCCOOH hydrolysé (nmol/L)
<i>Fumeurs occasionnels</i>					
Moyenne	0.3	55	6.3	61	67
Médiane	0.0	2.5	0.0	2.6	4.7
SD	1.1	163	38	175	173
Min	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Max	5.3	1052	326	1101	1084
<i>Fumeurs réguliers</i>					
Moyenne	88	1062	43	1104	1055
Médiane	49	770	18	787	744
SD	115	834	67	874	835
Min	0.0	125	0.0	125	122
Max	498	2904	369	2974	2881

Une analyse statistique de ces données montre que les concentrations de chaque analyte sont significativement différentes entre les deux groupes de fumeurs (test Mann-Whitney, $p < 0.0001$). De la même façon que pour le THCCOOH dans le sang, les concentrations en THCCOOH-gluc et en THCCOOH hydrolysé pourraient être utilisées comme indicateurs de fréquence de consommation de cannabis.

Il est également intéressant de noter que la somme des concentrations molaires du THCCOOH-gluc (B) et du THCCOOH libre (C) correspond à la concentration molaire du THCCOOH hydrolysé. La technique « dilute and shoot » utilisée pour mesurer les concentrations en conjugués glucuronides permet donc d'éviter l'hydrolyse de ces composés. Ceci a déjà été observé par Felli et al. [103].

IV.2. Thématiques complémentaires à l'étude

IV.2.1. Les moyens préconisés sur internet pour échapper à un contrôle salivaire positif sont-ils efficaces ?

IV.2.1.1. Présentation de l'étude pilote sur le rinçage de la bouche

Plusieurs auteurs ont mentionné la présence de cannabinoïdes dans la salive et notamment du THC en grande quantité après inhalation [74, 78, 95]. Ces affirmations ont été confirmées par notre étude et étendues à d'autres cannabinoïdes comme le THC-A [73, 104]. Cependant, aucune étude n'a encore étudié la possibilité de falsifier les résultats de dosage par un rinçage de la bouche après l'inhalation du joint et avant la collecte de salive. Des kits sont proposés sur internet pour tricher et tenter d'échapper à un résultat positif aux tests actuellement utilisés (www.testclear.com, www.alwaystestclean.com ou www.passyourdrugtest.com). Mais sans forcément avoir recours à de telles pratiques, il est intéressant de se demander si le rinçage de la cavité buccale et l'ingestion de liquide comme de l'eau ou un produit riche en graisses tel que le lait permettrait de diminuer la concentration du THC dans la bouche. Pour cela, des essais ont été menés afin de déterminer si un rinçage de la bouche avec de l'eau, une boisson lactée ou un produit d'hygiène dentaire, permet de réduire la concentration de cannabinoïdes dans la cavité buccale et si oui, dans quelles proportions.

Quatre sujets en bonne santé, tous fumeurs réguliers de cannabis, ont été recrutés pour cette étude pilote. Le protocole détaillé de cette étude toxicologique est présenté en Annexe 2. Les volontaires ont participé auparavant à l'étude Cannabis / IRMf / conduite automobile. Après avoir reçu les informations sur l'étude et donné leur consentement, les sujets ont reçu des collecteurs de salive, ainsi que des liquides pour se rincer la bouche. Il leur a été demandé de se rincer la cavité buccale après l'inhalation d'un joint, préparé chez eux avec leur propre matériel et fumé selon leurs habitudes. La commission d'éthique du canton de Vaud a donné son aval pour cet amendement à l'étude.

Au cours de ces séances d'inhalation, cinq prélèvements salivaires ont été effectués à l'aide du collecteur Quantisal™. Un prélèvement a eu lieu 5 à 10 minutes avant l'inhalation. Les quatre suivants ont eu lieu 10, 20, 40 et 60 minutes après l'inhalation. Les liquides de rinçage utilisés sont de l'eau, une solution de bain de bouche non alcoolisée et une boisson lactée. Un seul liquide est utilisé par session d'inhalation. Entre chacun des quatre prélèvements effectués après l'inhalation, le sujet se rince la cavité buccale. Une fois prélevés, les échantillons salivaires ont été conservés au congélateur jusqu'à analyse selon la méthode développée au laboratoire (voir Chapitre III.3.1).

IV.2.1.2. Résultats et discussion

Chaque volontaire a effectué sur lui-même cinq prélèvements et les échantillons ont été analysés dans notre centre. Les concentrations moyennes en THC et en THC-A obtenues sont présentées dans les Figures 12 et 13.

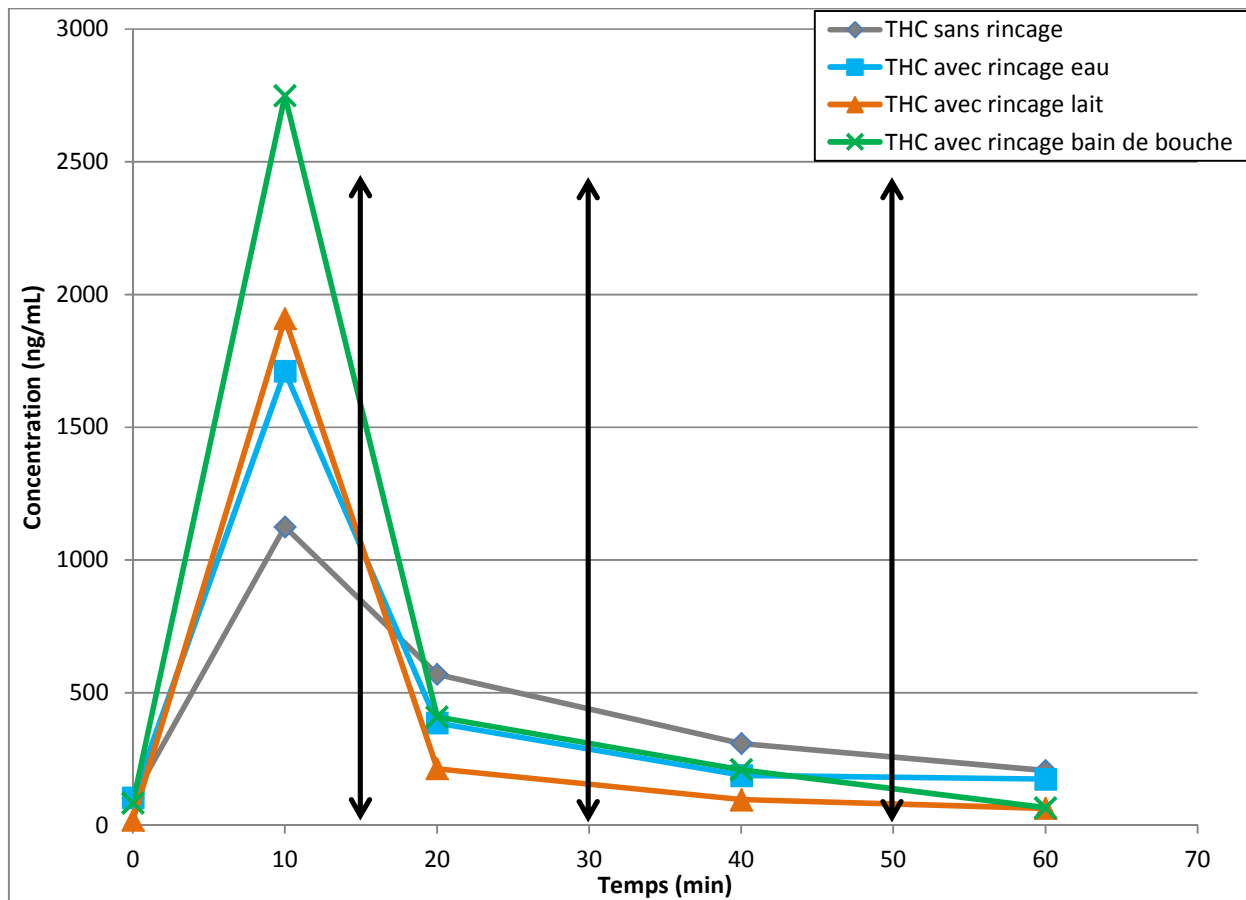


Figure 12. Concentrations moyennes en THC avant et après l'utilisation de différents produits de rinçage de la cavité buccale pour 4 volontaires. T=0 : prélèvement juste avant l'inhalation. Les flèches verticales indiquent les 3 moments de rinçage.

Dans cette étude toxicologique pilote, il a été demandé aux sujets de fumer autant que possible la même quantité de cannabis, en respectant leurs habitudes de consommation. Si le protocole d'inhalation n'était pas standardisé comme celui de notre étude, il présentait l'avantage de se rapprocher le plus possible de la réalité quotidienne du fumeur. L'inconvénient était l'absence de supervision pouvant entraîner des variations importantes dans les doses inhalées et la façon de fumer. Ceci expliquerait notamment les grandes variations des concentrations maximales moyennes obtenues pour chaque type de rinçage. Ces concentrations maximales sont observées juste après l'inhalation, mais avant le premier rinçage.

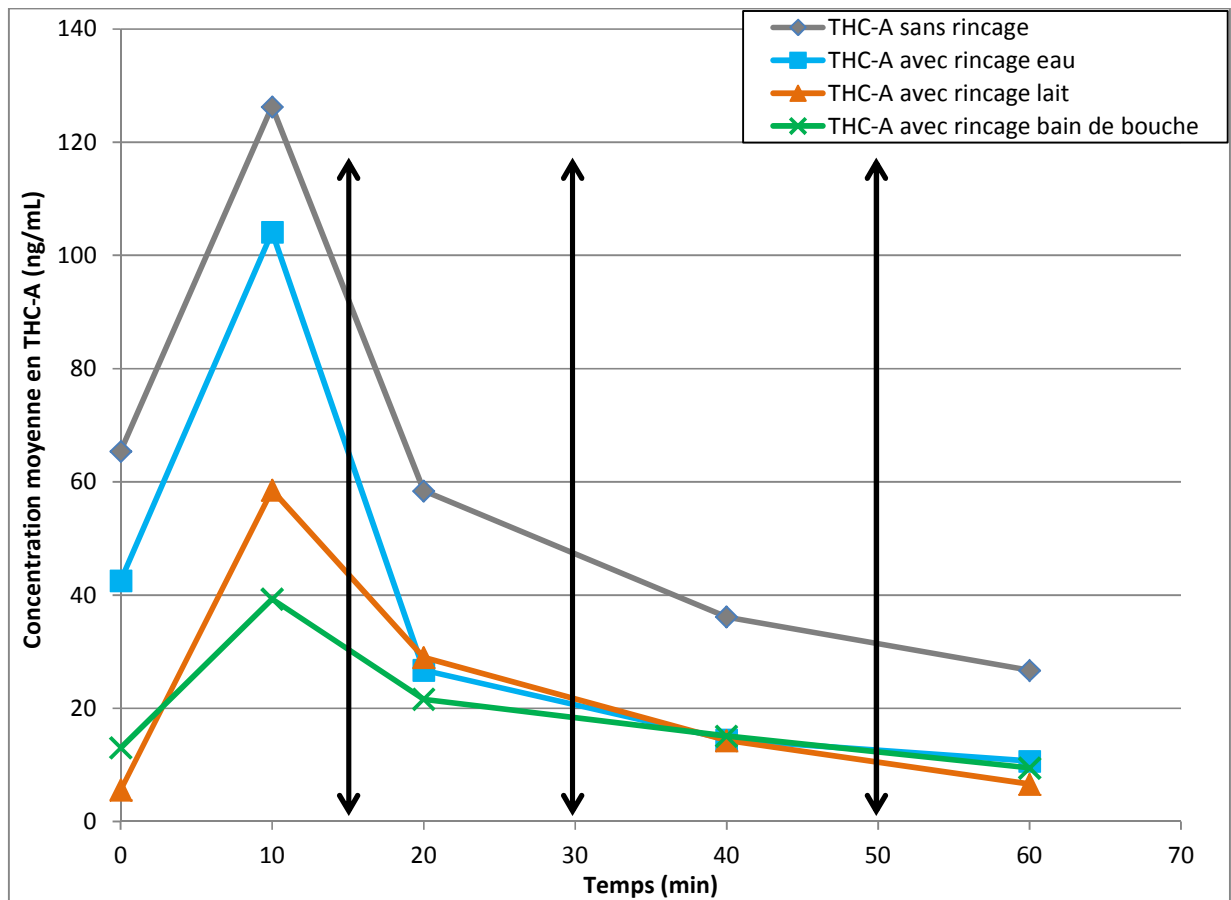


Figure 13. Concentrations moyennes en THC-A avant et après l'utilisation de différents produits de rinçage de la cavité buccale.

A partir des Figure 12 et 13, on peut observer une diminution de la concentration en THC et en THC-A pour chaque test effectué, avec ou sans rinçage. Il est difficile d'évaluer l'effet du rinçage en comparant les profils des concentrations absolues. Afin de pouvoir mieux préciser l'efficacité du rinçage de chaque produit, j'ai donc déterminé le pourcentage de THC et de THC-A éliminé par les trois rinçages à l'aide de la formule suivante : $100 * (C_{\max} - C_{2.5h}) / C_{\max}$. Le résultat est donc exprimé en pourcent de la concentration maximale. Les valeurs obtenues sont présentées dans le Tableau 2.

Nous pouvons remarquer que le lait et le bain de bouche semblent réduire plus fortement la concentration en THC que l'eau ou l'absence de rinçage. Pour le THC-A, c'est l'eau et le lait qui semblent les plus efficaces. Cependant, les différences observées ne sont pas statistiquement significatives, probablement en raison du faible nombre de sujets s'étant prêtés à l'expérience.

Tableau 2. Pourcentages moyens de THC et de THC-A éliminés par les différents rinçages de la cavité buccale.

Type de rinçage	Perte de THC (%)	Perte de THC-A (%)
Sans rinçage	81.6	78.9
Eau	89.8	89.7
Boisson lactée	96.6	88.7
Bain de bouche	97.6	75.9

Nos analyses révèlent qu'aucun produit de rinçage ne permet d'éliminer complètement la présence du THC et du THC-A dans la salive. Ces résultats sont en accord avec ceux exposés sur un poster présenté par A. de Castro et al. au 51^e congrès de la TIAFT (The International Association of Forensic Toxicologists) à Madère en 2013: « Influence of different mouthwashes on THC concentrations in oral fluid ».

Enfin, il est important de noter que nous avons pu mesurer le THC-A en concentrations très importantes (1920 ng/mL) dans la salive d'un sujet avant et après l'inhalation. Après investigation, il est apparu que ce volontaire avait préparé tous ces joints en même temps et avec le même matériel afin de standardiser autant que possible l'inhalation. Cependant, après la préparation, il ne s'est pas lavé les mains et a touché à plusieurs reprises les cotons de prélèvements sur les collecteurs Quantisal™ pour la série « sans rinçage ». Il en ressort que le THC-A présent en grandes concentrations dans la plante de cannabis s'est déposé sur le coton

et a pu contaminer les échantillons. Le profil cinétique obtenu pour ce sujet est présenté dans la Figure 14.

Les concentrations en THC-A de ce sujet n'ont pas été prises en compte pour les Figures 12 et 13, ni pour les résultats présentés dans le Tableau 2.

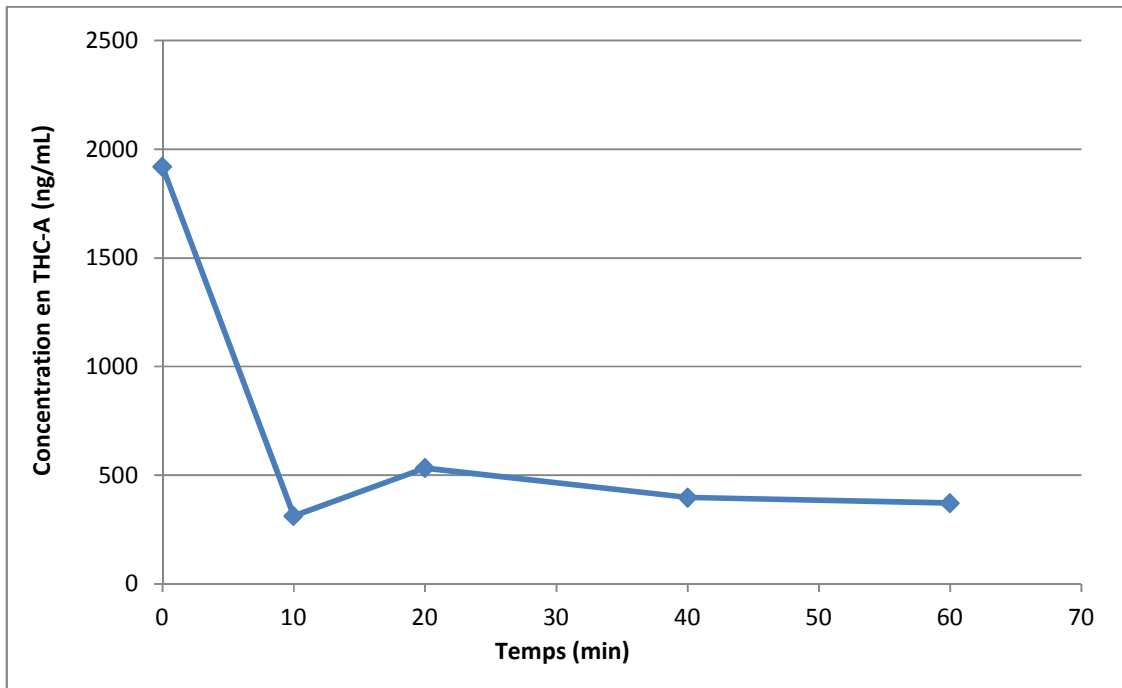


Figure 14. Concentration en THC-A mesurée chez un sujet après contamination des collecteurs. T=0, prélèvement effectué avant l'inhalation. Série sans rinçage.

Les différentes méthodes de lavage testées ne permettent donc pas d'éliminer totalement les cannabinoïdes, ils les diminuent tout au plus. L'analyse salivaire reste donc une méthode fiable pour dépister une consommation de cannabis. Il est cependant capital que le sujet ne manipule pas le système de prélèvement et que l'intervenant ne touche pas le coton absorbant ou porte des gants.

IV.2.2. Cannabis médical vs. cannabis illégal, peut-on faire la distinction ?

IV.2.2.1. Présentation de la problématique

Actuellement en Suisse, il est interdit de conduire un véhicule à partir du moment où du cannabis est consommé, qu'il soit médical ou illégal. Cependant, dans certains pays européens comme l'Allemagne [105], la conduite sous l'influence de THC médical prescrit est autorisée du moment que le conducteur ne montre aucune diminution de sa capacité à conduire. Bien que la législation suisse ne permette pas actuellement la conduite d'un véhicule après consommation de cannabis thérapeutique, il a semblé intéressant de se pencher sur cette thématique et de déterminer si une méthode analytique permet distinguer les deux types de consommation de cannabis.

Les préparations thérapeutiques de cannabis actuellement disponibles en Europe et aux Etats-Unis ne contiennent généralement que du THC et/ou du CBD synthétiques ou purifiés de la plante et aucun autre phytocannabinoïde. Ces autres cannabinoïdes, comme le THC-A ou le tétrahydrocannabivarine (THCV) sont présents dans la marijuana ou le haschich. Lors d'une consommation non médicale de cannabis, ces composés peuvent donc être détectés dans les fluides biologiques (salive, sang ou urine) et permettre de déterminer si le cannabis consommé est d'origine thérapeutique ou pas.

Trois cannabinoïdes d'intérêt ont été recherchés pour confirmer ou infirmer une consommation de cannabis non thérapeutique :

- Le THC-A, précurseur du THC, qui est détecté en très grandes quantités dans la salive après l'inhalation d'un joint [73, 104] et en quantité minime dans le sang [106].
- Le THCV, phytocannabinoïde analogue au THC avec une chaîne latérale plus courte, qui pourrait être mesuré dans le sang et éventuellement dans le fluide oral.

- Le THCVCOOH, métabolite du THCV [107] équivalent métabolique du THCCOOH pour le THC, qui serait détecté en quantité non négligeable dans l'urine mais également présent dans le sang, en particulier chez les fumeurs réguliers.

Les transitions et temps de rétention pour le THC-A ont été déterminés précédemment pour l'analyse de la salive. Des solutions standards de THCV (THC Pharm GmbH, Frankfurt/Main, Allemagne) et de THCVCOOH (EISOHLY Laboratories Inc., Oxford, MS, Etats-Unis) ont été infusées dans le spectromètre de masse pour déterminer les transitions. Elles ont ensuite été injectées dans le LC-MS/MS avec les mêmes conditions d'élution que pour la méthode développée pour les analyses de fluide oral afin de déterminer le temps de rétention et de le comparer aux temps de rétention des autres cannabinoïdes. Les données obtenues sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3. Paramètres MS et temps de rétention pour le THCV-COOH et le THCV.

Analyte	Ion parent (m/z)	Ion fils (m/z)	DP (V)	CE (V)	RT (min)	TW
THCV-COOH	315.0	270.9	-65	-10	3.62	1
	315.0	162.8	-65	-10	3.62	1
THCV	287.2	165.0	41	10	5.77	2
	287.2	231.0	41	10	5.77	2

DP: potentiel de declustering

CE: énergie de collision

RT: temps de rétention

TW: fenêtre de temps. TW 1 du début jusqu'à 5.1 min, TW 2 de 5.1 à 6.4 min

Les transitions retenues pour le THCVCOOH et pour le THCV ont été utilisées pour l'analyse de ces composés dans les urines et dans le sang. Les échantillons d'urine issus de l'étude toxicologique déjà décrite ont été analysés comme indiqués dans le paragraphe III.6. Quatre volontaires de l'étude cannabis / IRMf / conduite automobile ont rapporté avoir fumé un joint le

matin, quelques heures avant de venir à la PCL pour la journée d'étude. Les échantillons salivaires et plasmatiques de ces sujets volontaires ont donc été analysés. L'analyse de plasma se fait de la même façon que les analyses de sang complet décrites dans le paragraphe III.4, avec les transitions du THCV et du THCVCOOH en plus.

IV.2.2.2. Résultats et discussion

L'étude toxicologique menée sur plusieurs volontaires avec prélèvements de sang et de salive a permis de démontrer que des quantités non négligeables de THC-A sont mesurées dans le fluide oral (voir paragraphes III.3.1 et IV.1.1). Ce cannabinoïde n'étant pas présent dans la majorité des préparations thérapeutiques de cannabis, il ne devrait pas être détecté dans des échantillons de patients qui reçoivent de telles prescriptions. Ainsi, le THC-A pourrait être utilisé comme marqueur salivaire de consommation de cannabis par inhalation, et donc de cannabis non thérapeutique.

Le THCV n'a pas pu être détecté dans les échantillons plasmatiques des sujets volontaires ayant fumé un joint avant de participer à l'étude. Il semblerait donc que ce cannabinoïde soit présent en trop faibles concentrations pour pouvoir être mesuré. Par contre, le THCV a pu être détecté dans la salive de plusieurs sujets volontaires de l'étude pilote sur le rinçage de la bouche. En effet, il a pu être mis en évidence sur les chromatogrammes des échantillons collectés après l'inhalation du joint. Cependant, aucune concentration précise ne peut être donnée puisque la méthode n'a pas été validée.

Le tableau 4 énumère les concentrations moyennes et médianes, ainsi que les concentrations minimales et maximales en cannabinoïdes, mesurées dans les urines prélevées chez les volontaires de l'étude. Ces résultats montrent que, de la même façon que le THCCOOH, le

THCVCOOH est fréquemment mis en évidence dans les urines des fumeurs réguliers de cannabis, alors qu'il est souvent non détecté chez les occasionnels. La présence de ce métabolite du THC dans les urines apporte une forte présomption de consommation de marijuana ou de haschich. Cependant, à l'instar du THCCOOH, l'absence de THCVCOOH ne peut pas prouver une abstinence de consommation. Rappelons qu'en Suisse, la pharmacie Fankhauser à Langnau dans le canton de Berne délivre une teinture alcoolique de cannabis contenant du THC et du CBD et probablement d'autres cannabinoïdes comme le THC (voir paragraphe I.1.1.2).

Comme présenté par Radünz [105], les essais menés avec des échantillons réels ont révélés que le THCVCOOH pouvait être mesuré dans l'urine d'une personne qui a consommé du cannabis brut, très vraisemblablement d'origine non médicale. La présence de ce composé dans les urines est une forte présomption d'une consommation de cannabis non thérapeutique.

Tableau 4. Concentrations urinaires en THCCOOH et THCVCOOH après hydrolyse exprimées en µg/L chez les fumeurs occasionnels et réguliers de l'étude toxicologique.

	THCCOOH hydrolysé (µg/L)	THCVCOOH hydrolysé (µg/L)
<i>Fumeurs occasionnels</i>		
Moyenne	23	4.6
Médiane	1.6	0.0
SD	60	7.3
Min	0.0	0.0
Max	373	25
<i>Fumeurs réguliers</i>		
Moyenne	363	39
Médiane	256	29
SD	287	39
Min	42	0.0
Max	991	260

Des traces de THCVCOOH ont également été détectées dans le plasma de quelques sujets de l'étude d'administration de cannabis. Cependant, les concentrations en THCV dans ce fluide biologique étaient trop faibles pour être détectées.

Ainsi, le THC-A, le THCV et le THCVCOOH peuvent être détectés dans les échantillons biologiques de fumeurs de cannabis. Comme ces cannabinoïdes ne sont pas présents dans la plupart des préparations thérapeutiques de cannabis, en particulier celles élaborées à partir de THC de synthèse comme le dronabinol, ou de cannabinoïdes décarboxylés et fortement purifiés, comme le Sativex®, ils constituent d'excellents marqueurs de consommation de cannabis illégal.

V. Discussion générale

Au terme de ce travail le bilan suivant peut être tiré : après avoir fait la revue des différentes approches analytiques impliquant la spectrométrie de masse en tandem, nous avons développé une méthode originale basée sur cette technique pour analyser les principales familles de cannabinoïdes dans la salive. Ensuite, nous avons essayé d'améliorer la sensibilité en testant différentes méthodes de dérivation. Dans une nouvelle étape, la méthode a été adaptée à la bile qui joue un rôle important dans l'excrétion des cannabinoïdes avec pour conséquence un impact non négligeable sur leur pharmacocinétique. Finalement, les échantillons de fluide oral, de sang et d'urine collectés au cours d'une importante étude toxicologique visant à évaluer les effets du cannabis sur les performances de conduite automobile ont été analysés, toujours avec la même approche analytique, impliquant l'usage de la spectrométrie de masse en tandem. Deux groupes de consommateurs, occasionnels et réguliers, ont été investigués. Les principaux paramètres pharmacocinétiques ont été déterminés et comparés. Enfin, des critères ont été établis afin de faciliter l'estimation de la fréquence de consommation des usagers. Les principaux résultats ont été les suivants :

- 1) Comme indiqué par plusieurs autres études [35, 95, 108], nous avons pu montrer que le THC est présent en très grandes concentrations dans la salive après l'inhalation d'un joint de cannabis. Nous avons également mesuré le THC-A et le CBN en concentrations importantes. Des investigations devraient être menées pour déterminer dans quelle mesure le THC-A et le CBN dans le fluide oral pourraient être utilisés comme marqueurs de consommation récente de cannabis. En effet, bien que leur concentration diminue relativement rapidement, ces deux cannabinoïdes sont mesurables trois heures après l'inhalation d'un joint.
- 2) Le THC-A présent dans le fluide oral pourrait être utilisé comme marqueur de consommation de cannabis non thérapeutique car il n'est pas présent dans les

préparations médicamenteuses à base de THC et/ou de CBD (dronabinol ou Sativex®). D'autres phyto-cannabinoïdes, tels que le THCV ou le THCVCOOH pourraient également être considérés comme des marqueurs de consommation de cannabis non médical.

- 3) Le THCCOOH mesuré dans le sang pourrait permettre de distinguer des fumeurs occasionnels de fumeurs réguliers de cannabis. Nous avons pu démontrer avec les résultats de notre étude, que seuls les fumeurs réguliers présentent des échantillons sanguins avec une concentration supérieure à 40 ng/mL. A l'inverse, une concentration inférieure à 3 ng/mL est fortement corrélée avec une consommation occasionnelle. Entre ces deux seuils, une large zone grise existe dans laquelle il est impossible de faire une distinction nette. Il est cependant important de rappeler qu'il est nécessaire de clairement définir les notions de consommateurs réguliers et occasionnels. En effet, il est apparu que selon les références, plusieurs définitions ont été utilisées : de 0 à presque 8 usages par semaine pour les fumeurs occasionnels et un minimum de 10 par mois (2.3 par semaine) pour les consommateurs réguliers.

Au cours de ce travail, nous avons été confrontés à plusieurs difficultés : nous avons pu remarquer qu'il est très difficile de mettre au point une méthode capable de doser un grand nombre de cannabinoïdes simultanément. En effet, les cannabinoïdes ont des propriétés physicochimiques relativement différentes, ce qui complique l'analyse si l'on veut effectuer une seule et unique extraction de la matrice biologique. De plus, la validation des méthodes analytiques requiert l'utilisation d'étalons internes deutérés. Ces composés facilitent les analyses et l'usage des étalons deutérés analogues à chaque cannabinoïde étudié est souhaité. Pourtant, si les étalons des cannabinoïdes libres sont disponibles depuis longtemps (THC-d₃ ou 11-OH-THC-d₃), le THCCOOH-gluc-d₃ n'est présent sur le marché des standards analytiques que depuis peu de temps. Enfin, il a été nécessaire d'abaisser le seuil de sensibilité pour le

THCCOOH dans le fluide oral jusqu'à des valeurs inférieures au ng/mL. Cette étape a nécessité du temps et de nombreux tests afin de pouvoir aboutir à une méthode validée et applicable aisément. Pourtant, il apparaît que le seuil de sensibilité peut être encore réduit puisque des méthodes utilisant la GC à deux dimensions (deux colonnes GC différentes utilisées à la suite), couplée à la spectrométrie de masse permet d'obtenir une LOQ de 2 à 7.5 ng/L pour le THCCOOH dans le fluide oral [109, 110].

Plusieurs auteurs scientifiques s'accordent sur le fait que le THCCOOH peut être considéré comme un marqueur de consommation active de cannabis [111]. En effet, d'après les résultats obtenus, nous avons pu remarquer qu'il est présent en très faibles concentrations dans le fluide oral après l'inhalation d'un joint et à ce jour, aucune étude effectuée sur la consommation passive n'a démontré la présence de ce métabolite du THC dans la salive. Le THCCOOH n'est pas présent dans la plante, dans la fumée de cannabis [112], ni dans les joints. La détection du THCCOOH dans la salive est donc uniquement due au métabolisme humain et au passage de ce composé entre le sang et la salive. Ceci pourrait être confirmé par les résultats obtenus avec les volontaires de l'étude. Le THCCOOH a été détecté et mesuré dans la salive de tous les fumeurs chroniques, qui présentent un taux sanguin médian de THCCOOH de 20 µg/L juste avant l'inhalation du joint. A l'opposé, les échantillons de fluide oral des fumeurs occasionnels n'ont pas permis la détection du THCCOOH. Ces volontaires présentent un taux sanguin médian de THCCOOH inférieur au seuil de détection de la méthode soit à 0.5 ng/mL au même moment. Ceci laisse à penser que les concentrations salivaires sont corrélées avec les concentrations sanguines et on pourrait donc s'attendre à détecter du THCCOOH chez les fumeurs occasionnels si les méthodes de mesure étaient suffisamment sensibles. On peut faire l'hypothèse que le THCCOOH soit présent, mais en infimes quantités dans le fluide oral des fumeurs occasionnels. Si les futures méthodes analytiques deviennent nettement plus sensibles que celles développées jusqu'à présent, le THCCOOH devrait être détecté dans une proportion

beaucoup plus importante chez les fumeurs occasionnels. L'inconvénient majeur est que le risque de rendre un résultat positif pour une personne ayant été exposée passivement ou contaminée par le cannabis augmente.

Finalement, il ne fait aucun doute que le cannabis est une drogue qui est largement répandue et utilisée dans le monde, en particulier par les jeunes. L'étude toxicologique menée par notre équipe a démontré que les consommateurs occasionnels de cannabis présentent une baisse de performance des capacités nécessaires pour la conduite automobile [48]. Ainsi, il est donc nécessaire d'avoir des méthodes analytiques fiables pour déterminer de manière précise les concentrations de cannabis dans les fluides biologique. La disponibilité de ces données permet de déterminer si un conducteur est sous l'influence du cannabis. Actuellement, la mesure du THC dans le sang est la méthode de choix par excellence pour démontrer une consommation de cannabis. Cependant, le fluide oral est une matrice biologique alternative qui, au vu des résultats présentés dans ce travail, semble avoir sa place dans le milieu forensique. En effet, des concentrations très importantes de cannabinoïdes peuvent être mesurées suite à la contamination de la cavité buccale après l'inhalation d'un joint. Quelques études supplémentaires devraient être menées pour déterminer si une autre forme de consommation (ingestion d'un space cake par exemple) peut être détectée par le biais de la salive. Enfin, avec l'expansion des préparations thérapeutiques à base de THC et/ou CBD, d'autres marqueurs potentiels de consommation illégale de cannabis comme le THCV ou le THC-A pourraient être employés.

VI. Bibliographie

1. Giroud C, Bollman M, Thomas A, Mangin P, Favrat B. Consommation de cannabis : quels sont les risques ? *Ann Toxicol Anal.* 2008;20(4):183-205.
2. United Nations ODC. Review of the world cannabis situation. *Bulletin on narcotics* vol LVIII; 2006.
3. Menetrey A, Augsburg M, Giroud C, Mangin P. [Cannabis and automobile driving]. *Praxis.* 2001 Aug 23;90(34):1398-407.
4. OFROU. Instructions du 22 mai 2008 concernant la constatation de l'incapacité à conduire dans la circulation routière. http://www.wastra2adminch/media/pdfpub/2008-05-22_2362_fpdf, consulté en ligne le 16 octobre 2013.
5. Uges D. Unintended toxicity (intoxication) by cannabis ingestion of space cake. *Journal of forensic sciences.* 1995 Nov;40(6):927-8.
6. Andre C, Jaber-Filho JA, Bento RM, Damasceno LM, Aquino-Neto FR. Delirium following ingestion of marijuana present in chocolate cookies. *CNS spectrums.* 2006 Apr;11(4):262-4.
7. Chaudry HR, Moss HB, Bashir A, Suliman T. Cannabis psychosis following bhang ingestion. *British journal of addiction.* 1991 Sep;86(9):1075-81.
8. Godlaski TM. Shiva, Lord of Bhang. *Substance use & misuse.* 2012 Aug;47(10):1067-72.
9. Gupta BD, Jani CB, Shah PH. Fatal 'Bhang' poisoning. *Medicine, science, and the law.* 2001 Oct;41(4):349-52.
10. Smith PF. GW-1000. GW Pharmaceuticals. *Current opinion in investigational drugs.* 2004 Jul;5(7):748-54.
11. Di Marzo V, Petrocillis LD. Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. *Annual review of medicine.* 2006;57:553-74.
12. Rahn U, Hohmann AG. Cannabinoids as pharmacotherapies for neuropathic pain: from the bench to the bedside. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics.* 2009 Oct;6(4):713-37.
13. Ben Amar M. Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *Journal of ethnopharmacology.* 2006 Apr 21;105(1-2):1-25.
14. Brenneisen R, Gli A, Isohly MA, Henn V, Spiess Y. The effect of orally and rectally administered delta 9-tetrahydrocannabinol on spasticity: a pilot study with 2 patients. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics.* 1996 Oct;34(10):446-52.
15. Kalant H. Medicinal use of cannabis: history and current status. *Pain research & management : the journal of the Canadian Pain Society = journal de la société canadienne pour le traitement de la douleur.* 2001 Summer;6(2):80-91.
16. Jung J, Meyer MR, Maurer HH, Neuss C, Weinmann W, Auwarter V. Studies on the metabolism of the Delta9-tetrahydrocannabinol precursor Delta9-tetrahydrocannabinolic acid A (Delta9-THCA-A) in rat using LC-MS/MS, LC-QTOF MS and GC-MS techniques. *Journal of mass spectrometry : JMS.* 2009 Oct;44(10):1423-33.
17. Dussy F, Hamberg C, Luginbuhl M, Schwerzmann T, Briellmann TA. Isolation of Delta9-THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Delta9-THC in cannabis products. *Forensic Sci Int.* 2005 Apr 20;149(1):3-10.
18. Harvey DJ. Absorption, Distribution, and Biotransformation of the Cannabinoids. *Marihuana and Medicine.* 1999;Golds GG Nahas et al.:91-103.
19. Gorelick DA, Heishman SJ. Methods for clinical research involving cannabis administration. *Methods in molecular medicine.* 2006;123:235-53.

20. Huestis MA, Henningfield J, Cone J. Blood cannabinoids. I. Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THCCOOH during and after smoking marijuana. *J Anal Toxicol.* 1992 Sep-Oct;16(5):276-82.
21. Grotenhermen F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clinical pharmacokinetics.* 2003;42(4):327-60.
22. Menetrey A, Augsburg M, Rothuizen L, Pin M, Appenzeller M, Favrat B, et al. Profils cinétiques du delta-9-tétrahydrocannabinol, du 11-hydroxy-delta-9-tétrahydrocannabinol et de l'acide 11-nor-delta-9-tétrahydrocannabinol-9-carboxylique chez le sujet volontaire sain après administration orale de décoctions de cannabis ou de dronabinol. *Ann Toxicol Anal.* 2004;16(4):231-43.
23. Widman M, Agurell S, Ehrnebo M, Jones G. Binding of (+)- and (-)-delta-1-tetrahydrocannabinols and (-)-7-hydroxy-delta-1-tetrahydrocannabinol to blood cells and plasma proteins in man. *The Journal of pharmacy and pharmacology.* 1974 Nov;26(11):914-6.
24. Garrett R, Hunt CA. Physicochemical properties, solubility, and protein binding of delta-9-tetrahydrocannabinol. *Journal of pharmaceutical sciences.* 1974 Jul;63(7):1056-64.
25. Wahlqvist M, Nilsson IM, Sandberg F, Agurell S. Binding of delta-1-tetrahydrocannabinol to human plasma proteins. *Biochemical pharmacology.* 1970 Sep;19(9):2579-84.
26. Watanabe K, Yamaori S, Funahashi T, Kimura T, Yamamoto I. Cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of tetrahydrocannabinols and cannabinol by human hepatic microsomes. *Life sciences.* 2007 Mar 20;80(15):1415-9.
27. Sachse-Seeboth C, Pfeil J, Sehr D, Meineke I, Tzvetkov M, Bruns R, et al. Interindividual variation in the pharmacokinetics of Delta-9-tetrahydrocannabinol as related to genetic polymorphisms in CYP2C9. *Clinical pharmacology and therapeutics.* 2009 Mar;85(3):273-6.
28. Harvey DJ, Brown NK. Comparative in vitro metabolism of the cannabinoids. *Pharmacology, biochemistry, and behavior.* 1991 Nov;40(3):533-40.
29. Kemp PM, Abukhalaf IK, Manno J, Manno BR, Alford DD, McWilliams M, et al. Cannabinoids in humans. II. The influence of three methods of hydrolysis on the concentration of THC and two metabolites in urine. *J Anal Toxicol.* 1995 Sep;19(5):292-8.
30. Mazur A, Lichti CF, Prather PL, Zielinska AK, Bratton SM, Gallus-Zawada A, et al. Characterization of human hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferase enzymes involved in the metabolism of classic cannabinoids. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals.* 2009 Jul;37(7):1496-504.
31. Harvey DJ, Paton WD. Metabolism of the cannabinoids. *Rev Biochem Toxicol.* 1986;6:221-64.
32. Williams PL, Moffat AC. Identification in human urine of delta-9-tetrahydrocannabinol-11-oic acid glucuronide: a tetrahydrocannabinol metabolite. *The Journal of pharmacy and pharmacology.* 1980 Jul;32(7):445-8.
33. Toennes SW, Ramaekers JG, Theunissen L, Moeller MR, Kauert GF. Comparison of cannabinoid pharmacokinetic properties in occasional and heavy users smoking a marijuana or placebo joint. *J Anal Toxicol.* 2008 Sep;32(7):470-7.
34. Skopp G, Potsch L. Cannabinoid concentrations in spot serum samples 24-48 hours after discontinuation of cannabis smoking. *J Anal Toxicol.* 2008 Mar;32(2):160-4.
35. Toennes SW, Ramaekers JG, Theunissen L, Moeller MR, Kauert GF. Pharmacokinetic properties of delta-9-tetrahydrocannabinol in oral fluid of occasional and chronic users. *J Anal Toxicol.* 2010 May;34(4):216-21.
36. Daldrup T, Käferstein H, Köhler H, Maier R, Musshoff F. Deciding between one off/occasional and regular cannabis consumption. *Blutalkohol.* 2000;37(1):39-47.
37. http://sfta.org/presentation/main/main_accueil.php. consulted on July 2013.
38. Murray RM, Morrison PD, Henquet C, Di Forti M. Cannabis, the mind and society: the hash realities. *Nature reviews Neuroscience.* 2007 Nov;8(11):885-95.

39. Pertwee RG. GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *British journal of pharmacology*. 2007 Dec;152(7):984-6.
40. Di Marzo V, Petrosino S. Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Current opinion in lipidology*. 2007 Apr;18(2):129-40.
41. Rafaelsen L, Christrup H, Bech P, Rafaelsen OJ. Effects of cannabis and alcohol on psychological tests. *Nature*. 1973 Mar 9;242(5393):117-8.
42. <http://www.bag.admin.ch/themen/drogen/00042/13457/?lang=fr>. . consulted on July 2013.
43. Narring F, Tschumper A, Inderwili Bonivento L, Jeannin A, Addor V, Bütikofer A, et al. Santé et styles de vie des adolescents âgés de 16 à 20 ans en Suisse (2002). In: Institut universitaire de médecine sociale et préventive L, editor. SMASH 2002 : Swiss multicenter adolescent survey on health 2002; 2002. p. 211.
44. Klonooff H. Marijuana and driving in real-life situations. *Science*. 1974 Oct 25;186(4161):317-24.
45. Ramaekers JG, Moeller MR, van Ruitenbeek P, Theunissen FL, Schneider J, Kauert G. Cognition and motor control as a function of Delta9-THC concentration in serum and oral fluid: limits of impairment. *Drug Alcohol Depend*. 2006 Nov 8;85(2):114-22.
46. Ramaekers JG, Robbe HW, O'Hanlon JF. Marijuana, alcohol and actual driving performance. *Human psychopharmacology*. 2000 Oct;15(7):551-8.
47. Ramaekers JG, Berghaus G, van Laar M, Drummer OH. Dose related risk of motor vehicle crashes after cannabis use. *Drug Alcohol Depend*. 2004 Feb 7;73(2):109-19.
48. Battistella G, Fornari J, Thomas A, Mall JF, Chtioui H, Appenzeller M, et al. Weed or wheel! FMRI, behavioural, and toxicological investigations of how cannabis smoking affects skills necessary for driving. *PloS one*. 2013;8(1):e52545.
49. Battistella G. Multimodal MRI analysis of structural and functional networks in the human brain. Application to two clinical studies: driving abilities under THC intoxication and early white matter changes in FXTAs. Lausanne: Université de Lausanne - Faculté de Biologie et Médecine; 2013.
50. Green B, Kavanagh D, Young R. Being stoned: a review of self-reported cannabis effects. *Drug Alcohol Rev*. 2003 Dec;22(4):453-60.
51. Hall W, Solowij N. Adverse effects of cannabis. *Lancet*. 1998 Nov 14;352(9140):1611-6.
52. Thomas A, Hopfgartner G, Giroud C, Staub C. Quantitative and qualitative profiling of endocannabinoids in human plasma using a triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer with liquid chromatography. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2009 Mar;23(5):629-38.
53. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *The Journal of prosthetic dentistry*. 2001 Feb;85(2):162-9.
54. Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. *British dental journal*. 1992 Apr 25;172(8):305-12.
55. SureScreen D. The Definitive Guide to Oral Fluid. Technical Bulletin.6 http://www.surescreen.com/diagnostics/pdf/DDN08_6.pdf consulté en ligne le 18 octobre 2013.
56. Langel K, Engblom C, Pehrsson A, Gunnar T, Ariniemi K, Lillsunde P. Drug testing in oral fluid-evaluation of sample collection devices. *J Anal Toxicol*. 2008 Jul-Aug;32(6):393-401.
57. Prestifilippo JP, Fernandez-Solari J, de la Cal C, Iribarne M, Suburo AM, Rettori V, et al. Inhibition of salivary secretion by activation of cannabinoid receptors. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006 Sep;231(8):1421-9.
58. Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet J, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--part II. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2007 Sep 21;45(1):70-81.
59. Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet J, Cohen N, Compagnon PA, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--part III. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2007 Sep 21;45(1):82-96.

60. Feinberg M. Labo-Stat Guide de validation des méthodes d'analyses. Paris : Ed Tec & Doc Lavoisier. 2012:361 p.
61. Konig S, Aebi B, Lanz S, Gasser M, Weinmann W. On-line SP² LC-MS/MS for the quantification of Delta9-tetrahydrocannabinol (THC) and its two major metabolites in human peripheral blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2011 Apr;400(1):9-16.
62. Lacroix C, Sausseureau B. Fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of cannabinoids in micro volume blood samples after dabsyl derivatization. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2012 Sep 15;905:85-95.
63. Oiestad BL, Johansen U, Oiestad AM, Christophersen AS. Drug screening of whole blood by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol*. 2011 Jun;35(5):280-93.
64. Mercolini L, Mandrioli R, Sorella V, Somaini L, Giocondi D, Serpelloni G, et al. Dried blood spots: liquid chromatography-mass spectrometry analysis of Delta9-tetrahydrocannabinol and its main metabolites. *J Chromatogr A*. 2013 Jan 4;1271(1):33-40.
65. Dubois N, Paccou AP, De Backer BG, Charlier CJ. Validation of the quantitative determination of tetrahydrocannabinol and its two major metabolites in plasma by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry according to the total error approach. *J Anal Toxicol*. 2012 Jan-Feb;36(1):25-9.
66. Ferreiros N, Labocha S, Walter C, Lotsch J, Geisslinger G. Simultaneous and sensitive LC-MS/MS determination of tetrahydrocannabinol and metabolites in human plasma. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2013 Feb;405(4):1399-406.
67. Wohlfarth A, Roth N, Auwarter V. LC-MS/MS analysis of Delta9-tetrahydrocannabinolic acid A in serum after protein precipitation using an in-house synthesized deuterated internal standard. *Journal of mass spectrometry : JMS*. 2012 Jun;47(6):778-85.
68. Fabritius M, Staub C, Mangin P, Giroud C. Distribution of free and conjugated cannabinoids in human bile samples. *Forensic Sci Int*. 2012 Nov 30;223(1-3):114-8.
69. Gronewold A, Skopp G. A preliminary investigation on the distribution of cannabinoids in man. *Forensic Sci Int*. 2011 Jul 15;210(1-3):e7-e11.
70. Concheiro M, Lee D, Lendoiro B, Huestis MA. Simultaneous quantification of Delta(9)-tetrahydrocannabinol, 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol in oral fluid by microflow-liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2013 Jul 5;1297:123-30.
71. Coulter C, Garnier M, Moore C. Analysis of tetrahydrocannabinol and its metabolite, 11-nor-Delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid, in oral fluid using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol*. 2012 Jul;36(6):413-7.
72. de Castro A, Pineiro B, Lendoiro B, Cruz A, Lopez-Rivadulla M. Quantification of selected synthetic cannabinoids and Delta(9)-tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2013 Jun 21;1295:99-106.
73. Fabritius M, Staub C, Mangin P, Giroud C. Analysis of cannabinoids in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicol*. 2013;31(1):151-63.
74. Molnar A, Lewis J, Doble P, Hansen G, Prolov T, Fu S. A rapid and sensitive method for the identification of delta-9-tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int*. 2012 Feb 10;215(1-3):92-6.
75. Sergi M, Montesano C, Odoardi S, Mainero Rocca L, Fabrizi G, Compagnone D, et al. Micro extraction by packed sorbent coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of cannabinoids in oral fluids. *J Chromatogr A*. 2013 Aug 2;1301:139-46.
76. Wille SM, Di Fazio V, Ramirez-Fernandez Mdel M, Kummer N, Samyn N. Driving Under the Influence of Cannabis: Pitfalls, Validation, and Quality Control of a UPLC-MS/MS Method for the

Quantification of Tetrahydrocannabinol in Oral Fluid Collected With StatSure, Quantisal, or Certus Collector. *Ther Drug Monit.* 2013 Feb;35(1):101-11.

77. Zancanaro I, Limberger RP, Bohel PO, dos Santos MK, De Boni RB, Pechansky F, et al. Prescription and illicit psychoactive drugs in oral fluid--LC-MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers. *Forensic Sci Int.* 2012 Nov 30;223(1-3):208-16.

78. Lee PD, Chang YJ, Lin KL, Chang YZ. Simultaneous determination of Delta9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-Delta9-tetrahydrocannabinol in oral fluid using isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry.* 2012 Jan;402(2):851-9.

79. Bylda C, Leinenbach A, Thiele R, Kobold U, Volmer DA. Development of an electrospray LC-MS/MS method for quantification of Delta(9) -tetrahydrocannabinol and its main metabolite in oral fluid. *Drug testing and analysis.* 2012 Jul;4(7-8):668-74.

80. He X, Kozak M, Nimkar S. Ultra-sensitive measurements of 11-Nor-delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in oral fluid by microflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a benchtop quadrupole/orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem.* 2012 Sep 18;84(18):7643-7.

81. Scheidweiler KB, Himes SK, Chen X, Liu HF, Huestis MA. 11-Nor-9-carboxy-9-tetrahydrocannabinol quantification in human oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry.* 2013 May 17.

82. de Jager AD, Bailey NL. Online extraction LC-MS/MS method for the simultaneous quantitative confirmation of urine drugs of abuse and metabolites: amphetamines, opiates, cocaine, cannabis, benzodiazepines and methadone. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011 Sep 1;879(25):2642-52.

83. Scheidweiler KB, Desrosiers NA, Huestis MA. Simultaneous quantification of free and glucuronidated cannabinoids in human urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 2012 Nov 20;413(23-24):1839-47.

84. Zanchetti G, Floris I, Piccinotti A, Tameni S, Poletti A. Rapid and robust confirmation and quantification of 11-nor-Delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH) in urine by column switching LC-MS-MS analysis. *Journal of mass spectrometry : JMS.* 2012 Jan;47(1):124-30.

85. Di Corcia D, D'Urso F, Gerace G, Salomone A, Vincenti M. Simultaneous determination in hair of multiclass drugs of abuse (including THC) by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012 Jun 15;899:154-9.

86. Mercolini L, Mandrioli R, Protti M, Conti M, Serpelloni G, Raggi MA. Monitoring of chronic Cannabis abuse: An LC-MS/MS method for hair analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2013 Mar 25;76:119-25.

87. Roth N, Moosmann B, Auwarter V. Development and validation of an LC-MS/MS method for quantification of Delta9-tetrahydrocannabinolic acid A (THCA-A), THC, CBN and CBD in hair. *Journal of mass spectrometry : JMS.* 2013 Feb;48(2):227-33.

88. Salomone A, Gerace G, D'Urso F, Di Corcia D, Vincenti M. Simultaneous analysis of several synthetic cannabinoids, THC, CBD and CBN, in hair by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Method validation and application to real samples. *Journal of mass spectrometry : JMS.* 2012 May;47(5):604-10.

89. Koster RA, Alffenaar JW, Greijdanus B, Vandernagel J, Uges DR. Fast and Highly Selective LC-MS/MS Screening for THC and 16 Other Abused Drugs and Metabolites in Human Hair to Monitor Patients for Drug Abuse. *Ther Drug Monit.* 2013 Sep 25.

90. De Brabanter N, Van Gansbeke W, Hooghe F, Van Eenoo P. Fast quantification of 11-nor-Delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCA) using microwave-accelerated derivatisation and gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Forensic Sci Int.* 2013 Jan 10;224(1-3):90-5.

91. Prata Vde M, ĩmidio ĩS, Dorea HS. New catalytic ultrasound method for derivatization of 11-nor-Delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine, with analysis by GC-MS/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2012 Apr;403(2):625-32.
92. Han ĩ, Park Y, Kim ĩ, In S, Yang W, Lee S, et al. Simultaneous analysis of Delta(9)-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol in hair without different sample preparation and derivatization by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2011 Jul 15;55(5):1096-103.
93. Kim JY, Cheong JC, Lee JI, In MK. Improved gas chromatography-negative ion chemical ionization tandem mass spectrometric method for determination of 11-nor-Delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using mechanical pulverization and bead-assisted liquid-liquid extraction. *Forensic Sci Int*. 2011 Mar 20;206(1-3):e99-102.
94. Minoli M, Angeli I, Ravelli A, Gigli F, Lodi F. Detection and quantification of 11-nor-Delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair by GC/MS/MS in Negative Chemical Ionization mode (NCI) with a simple and rapid liquid/liquid extraction. *Forensic Sci Int*. 2012 May 10;218(1-3):49-52.
95. Milman G, Schwoppe DM, Gorelick DA, Huestis MA. Cannabinoids and metabolites in expectorated oral fluid following controlled smoked cannabis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2012 Apr 11;413(7-8):765-70.
96. Teixeira H, Proenca P, Verstraete A, Corte-Real F, Vieira DN. Analysis of Delta9-tetrahydrocannabinol in oral fluid samples using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Forensic Sci Int*. 2005 Jun 10;150(2-3):205-11.
97. Day D, Kuntz DJ, Feldman M, Presley L. Detection of THCA in oral fluid by GC-MS-MS. *J Anal Toxicol*. 2006 Nov-Dec;30(9):645-50.
98. Santa T. Derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biomedical chromatography : BMC*. 2011 Jan;25(1-2):1-10.
99. Fabritius M, Giroud C. Letter to the editor regarding "Simultaneous determination of 9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-9-tetrahydrocannabinol in oral fluid using isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry". *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2013 Jan;405(1):435-7.
100. Thomas A, Widmer C, Hopfgartner G, Staub C. Fast gas chromatography and negative-ion chemical ionization tandem mass spectrometry for forensic analysis of cannabinoids in whole blood. *J Pharm Biomed Anal*. 2007 Nov 5;45(3):495-503.
101. Anizan S, Milman G, Desrosiers N, Barnes AJ, Gorelick DA, Huestis MA. Oral fluid cannabinoid concentrations following controlled smoked cannabis in chronic frequent and occasional smokers. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2013 Oct;405(26):8451-61.
102. Himes SK, Scheidweiler KB, Beck O, Gorelick DA, Desrosiers NA, Huestis MA. Cannabinoids in ĩxhaled Breath following Controlled Administration of Smoked Cannabis. *Clin Chem*. 2013 Sep 17.
103. Felli M, Martello S, Chiarotti M. LC-MS-MS method for simultaneous determination of THCCOOH and THCCOOH-glucuronide in urine: Application to workplace confirmation tests. *Forensic Sci Int*. 2011 Jan 30;204(1-3):67-73.
104. Fabritius M, Chtioui H, Battistella G, Annoni JM, Dao K, Favrat B, et al. Comparison of cannabinoid concentrations in oral fluid and whole blood between occasional and regular cannabis smokers prior to and after smoking a cannabis joint. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2013 Dec;405(30):9791-803.
105. Radunz L, Westphal F, Maser ĩ, Rochholz G. THCVA-A - a new additional marker for illegal cannabis consumption. *Forensic Sci Int*. 2012 Feb 10;215(1-3):171-4.

106. Jung J, Kempf J, Mahler H, Weinmann W. Detection of Delta9-tetrahydrocannabinolic acid A in human urine and blood serum by LC-MS/MS. *Journal of mass spectrometry : JMS*. 2007 Mar;42(3):354-60.
107. Sohly MA, deWit H, Wachtel SR, Feng S, Murphy TP. Delta9-tetrahydrocannabivarin as a marker for the ingestion of marijuana versus Marinol: results of a clinical study. *J Anal Toxicol*. 2001 Oct;25(7):565-71.
108. Kauert GF, Ramaekers JG, Schneider J, Moeller MR, Toennes SW. Pharmacokinetic properties of delta9-tetrahydrocannabinol in serum and oral fluid. *J Anal Toxicol*. 2007 Jun;31(5):288-93.
109. Milman G, Barnes AJ, Lowe RH, Huestis MA. Simultaneous quantification of cannabinoids and metabolites in oral fluid by two-dimensional gas chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2010 Feb 26;1217(9):1513-21.
110. Moore C, Coulter C, Rana S, Vincent M, Soares J. Analytical procedure for the determination of the marijuana metabolite 11-nor-Delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in oral fluid specimens. *J Anal Toxicol*. 2006 Sep;30(7):409-12.
111. Moore C. Response to "Is THCCOOH a useful determinant for passive inhalation in oral fluid THC testing?". *J Anal Toxicol*. 2012 Jun;36(5):358.
112. Lee D, Milman G, Barnes AJ, Goodwin RS, Hirvonen J, Huestis MA. Oral fluid cannabinoids in chronic, daily Cannabis smokers during sustained, monitored abstinence. *Clin Chem*. 2011 Aug;57(8):1127-36.

VII. Annexes

VII.1. Lettre à l'éditeur

Letter to the editor regarding “Simultaneous determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in oral fluid using isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry”

Letter to the Editor regarding “Simultaneous determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in oral fluid using isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry”

Marie Fabritius · Christian Giroud

Received: 7 August 2012 / Accepted: 22 October 2012 / Published online: 13 November 2012
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Dear Sir,

We read with great interest the article entitled “Simultaneous determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in oral fluid using isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry” by Lee et al. [1]. The authors describe a fast and very sensitive method to analyse dansyl derivatives of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCCOOH) in oral fluid with limits of quantification of 25 and 5 pg/mL, respectively. Generally, liquid chromatography (LC)–mass spectrometry (MS) is preferred over gas chromatography–MS because it does not require prior derivatization and extensive sample clean-up, making this approach much less tedious and time consuming. However, this common rule has several exceptions. In this regard, there are some substances that do not show a signal sufficiently intense with the classic ion sources commonly used in LC-MS. Typically, the phytocannabinoids belong to this family. To overcome this problem, derivatization can be used to improve MS/MS detectability [2]. In this respect, Lee et al. reported the use of a chemical derivatization approach using isotope dilution LC-MS/MS with electrospray ionization in positive mode to detect and quantify THC and THCCOOH. Derivatization of the phenolic group was done with dansyl chloride (DC) at basic pH (10.5) at 70 °C for 5 min.

This method was tested in our laboratory with oral fluid samples spiked with a broader range of cannabinoids: THC, THCCOOH, 11-hydroxy-THC (11-OH-THC), cannabinol, cannabidiol, the two glucuronide conjugates THC–glucuronide (THC–gluc) and THCCOOH–glucuronide (THCCOOH–

gluc) and the plant precursor of THC, Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (THC-A). All except 11-OH-THC are known to be present in oral fluid, a few at high concentrations (THC, THC-A, cannabidiol), others in only tiny amounts (mainly the THC metabolites and their conjugates). Since this method involving derivatization followed by LC-MS/MS analysis has been advocated with other biological matrices, its evaluation with a more expanded range of cannabinoids is even more warranted.

Pure and dansylated standards were analysed first to determine the ion transitions and the best MS/MS parameters. Then, drug-free oral fluid samples spiked at different concentrations (5, 25, 50, 100, 250, 500 and 1,000 pg/mL) with the whole range of cannabinoids were pretreated, derivatized and extracted according to the protocol developed by Lee et al. [1]. These samples were also extracted according to our own procedure, which does not include a derivatization step [3]. Briefly, our method is as follows. To 250 μ L of oral fluid, we added 10 μ L of an internal standard solution of 5 ng/mL THC- d_3 , 11-OH-THC- d_3 and THCCOOH- d_9 . Then, the volume was made up to 1 mL with ammonium formate buffer (10 mM, pH 6.5) and the mixture was vortexed for 5 s. Oasis HLB extraction columns (Waters, Baden, Switzerland) were conditioned with 2 mL of methanol, 2 mL of deionized water and 2 mL of ammonium formate buffer (10 mM, pH 6.5). The samples were loaded by gravity. Cannabinoids were eluted with 3 mL of methanol. The eluates were evaporated to dryness and reconstituted in 150 μ L of ammonium formate buffer (5 mM, pH 6.8)–acetonitrile (70:30, v/v). For both procedures, the LC parameters and the MS/MS equipment were the same. The separation was done on a Kinetex™ C₁₈ 100-Å column (150 mm×2.1 mm inner diameter, 2.6 μ m), (Phenomenex, Brechbühler, Echallens, Switzerland). Gradient elution was performed using a mixture of ammonium formate buffer at 5 mM, pH 6.8 (solvent A) and acetonitrile (solvent B)

M. Fabritius · C. Giroud (✉)
Forensic Toxicology and Chemistry Unit,
University Center of Legal Medicine,
Rue du Bugnon 21,
1011 Lausanne, Switzerland
e-mail: christian.giroud@chuv.ch

at a flow rate of 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. The initial gradient conditions were as follows: 30 % solvent B, hold for 30 s, and then linearly increase to reach 90 % solvent B at 7 min. The conditions using 90 % solvent B were maintained for 2 min. Then, the gradient was decreased to 30 % solvent B over 30 s and held for 2.5 min. Then, 10 μL of the sample was injected into the LC-MS/MS system. Analytes were detected using an Applied Biosystems SCIEX API 5000 triple-quadrupole mass spectrometer with a TurboIonSpray interface. As described by Lee et al., the dansylated derivatives were registered in positive electrospray ionization mode with the same multiple reaction monitoring transitions. In our procedure, MS transitions were recorded using a scheduled multiple reaction monitoring mode with three separate time windows. The first time window (from the start to 5.1 min) was operated in negative ionization mode, whereas the second (from 5.1 to 6.4 min) and the third (from 6.4 to 7.5 min) windows were operated in the positive mode. THC-A, THCCOOH and the glucuronides were analysed in the negative mode to achieve better sensitivity.

Specific analyses for THC-A and glucuronide conjugates were also conducted. Drug-free oral fluid samples were spiked with THC-A, THC-gluc or THCCOOH-gluc at a concentration of 100 ng/mL and were analysed with the method of Lee et al. As deuterated homologues of these compounds were not commercially available, THC- d_3 was used as the internal standard for THC-gluc and THCCOOH- d_9 was selected for THC-A and THCCOOH-gluc. Calibration curves were obtained with six calibration levels (0.1, 0.5, 5, 10, 25 and 50 ng/mL) for THC, THCCOOH, cannabidiol, cannabinol and 11-OH-THC.

Therefore, two different methods in the analysis of cannabinoids in oral fluid were used and compared. What differentiates these two methods is the dansylation step used by Lee et al. as it combines a simple liquid–liquid extraction, whereas our method does not require any derivatization even though it involves a longer purification on solid-phase cartridges. This latter step was necessary to extract the underivatized glucuronide conjugates from oral fluid. Derivatization with DC was done at basic pH (10.5) and 70 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min. With the method developed in our laboratory, samples were analysed straightforwardly at almost neutral pH (6.8) and without heating. The other parts of the methods were similar and rely upon LC-MS/MS analysis with electrospray ionization and reverse-phase chromatographic separation using a C_{18} column.

Our results confirm and extend those of Lee et al.: the sensitivity for THC and THCCOOH detection was improved, as was that for cannabidiol, cannabidiol and 11-OH-THC detection. In this respect, the limits of detection (LOD) were lower for these five cannabinoids using the method developed by Lee et al.: the LOD of THCCOOH, 11-OH-THC and cannabinol decreased from 100 to 5 pg/mL, the LOD of THC decreased from 50 to 25 pg/mL and the LOD of cannabidiol was 50 pg/mL with DC derivatization, whereas it was

300 pg/mL with our method. However, we failed to detect the dansylated THC-A, THC-gluc and THCCOOH-gluc. The reasons of their non-detection were investigated, and one of the most important factors could be the derivatization conditions. It has been proved that THC-A degrades into THC at high temperature [4]. Incubation of DC with cannabinoids at 70 $^{\circ}\text{C}$ for several minutes could lead at least to partial thermal conversion of THC-A into THC. Furthermore, the basic conditions (obtained with 100 mM sodium bicarbonate buffer at pH 10.5) have been proved to be sufficient to hydrolyse THCCOOH-gluc [5] and could explain the non-detection of the glucuronide conjugates.

To test these hypotheses, the following experiments were performed to assess whether THC-A is converted into THC and whether the glucuronides are hydrolysed to their corresponding free cannabinoids during the dansylation step. Drug-free oral fluid samples were spiked with THC-A, THC-gluc or THCCOOH-gluc at a concentration of 100 ng/mL. Samples were extracted and analysed according to the protocol developed by Lee et al. [1]. For the oral fluid specimens spiked with THCCOOH-gluc, DC-THCCOOH was measured at a concentration of 20 ng/mL. Taking into account their molar differences, we found that more than 30 % of THCCOOH-gluc was hydrolysed to THCCOOH during the derivatization process. For samples spiked with THC-A, DC-THC was detected at a concentration of 9 ng/mL. This level corresponds to 10 % of the initial concentration of THC-A. For THC-gluc samples, only 2 ng/mL DC-THC was detected (4 %). As expected, our analyses revealed that dansylation resulted in significant hydrolysis of THCCOOH-gluc to THCCOOH. For THC-A and THC-gluc, THC was detected in low concentrations only. These results indicate that the glucuronide conjugates of THC and THC-A are partly converted into THC when dansylated. Therefore, quantitative results of dansylated cannabinoids must be interpreted with great caution because they represent a partial sum of free and conjugated metabolites of THC and THC-A. However, if qualitative results only are required, the method using dansylation should be preferred because it has better sensitivity. For blood, this method is not recommended because the concentrations of free cannabinoids could be wrongly increased.

More than 80 metabolites of THC have been identified [6]. In 2007, Jung et al. [7], who studied the metabolism of THC-A, reported 12 THC-A metabolites. We suggest that THC-gluc, THCCOOH-gluc, THC-A and other metabolites are also degraded, possibly into polymers, oxidized compounds and other cannabinoids that could not be detected with our analytical method. Recently, Schwilke et al. [8] suggested that the ether–glucuronide bond in THC is stabler than the ester–glucuronide bond in THCCOOH. This difference could explain the greater hydrolysis of THCCOOH-gluc compared with THC-gluc.

In the experimental design of Lee et al. [1], oral fluid samples of suspected cannabis users were analysed. They

were not concerned with the fact that after a user has smoked a joint, a significant amount of THC-A can be found in oral fluid [3, 9]. In this respect, THC-A was detected at a concentration of 1 ng/mL by Moore et al. [9] until 8 h after a user had smoked a joint. In another study, we detected THC-A until the end of the experiment, this being 4 h after the first puff of the joint had been inhaled. THCCOOH-gluc in very low concentrations was also detected.

As a conclusion, to obtain accurate measurements and a better comparison of results between laboratories, a method able to quantify separately each cannabinoid should be preferred. Furthermore, our results show that some minor cannabinoids and their metabolites which could be used as biomarkers to substantiate use [10] and/or to estimate the last time of use cannot be measured separately after derivatization with DC. Very recently, another approach was suggested by Coulter et al. [11], who advocate the use of picolyamine to derivatize the carboxylic function of THCCOOH in order to achieve the requisite sensitivity.

References

1. Lee PD, Chang YJ, Lin KL, Chang YZ (2012) Simultaneous determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in oral fluid using isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 402:851–859
2. Santa T (2011) Derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 25:1–10
3. Fabritius M, Staub C, Mangin P, Giroud C (2012) Analysis of cannabinoids in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicol*. doi:10.1007/s11419-012-0168-z
4. Dussy FE, Hamberg C, Luginbuhl M, Schwerzmann T, Briellmann TA (2005) Isolation of Δ^9 -THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Δ^9 -THC in cannabis products. *Forensic Sci Int* 149:3–10
5. Kemp PM, Abukhalaf IK, Manno JE, Manno BR, Alford DD, McWilliams ME, Nixon FE, Fitzgerald MJ, Reeves RR, Wood MJ (1995) Cannabinoids in humans. II. The influence of three methods of hydrolysis on the concentration of THC and two metabolites in urine. *J Anal Toxicol* 19:292–298
6. Yamamoto I, Watanabe K, Narimatsu S, Yoshimura H (1995) Recent advances in the metabolism of cannabinoids. *Int J Biochem Cell Biol* 27:741–746
7. Jung J, Kempf J, Mahler H, Weinmann W (2007) Detection of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A in human urine and blood serum by LC-MS/MS. *J Mass Spectrom* 42:354–360
8. Schwilke EW, Schwöpe DM, Karschner EL, Lowe RH, Darwin WD, Kelly DL, Goodwin RS, Gorelick DA, Huestis MA (2009) Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC plasma pharmacokinetics during and after continuous high-dose oral THC. *Clin Chem* 55:2180–2189
9. Moore C, Rana S, Coulter C (2007) Simultaneous identification of 2-carboxy-tetrahydrocannabinol, tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol in oral fluid. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 852:459–464
10. Cone EJ, Huestis MA (2007) Interpretation of oral fluid tests for drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci* 1098:51–103
11. Coulter C, Garnier M, Moore C (2012) Analysis of tetrahydrocannabinol and its metabolite, 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid, in oral fluid using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 36:413–417

VII.2. Protocole de l'amendement à l'étude pour le rinçage de la bouche

Amendement : Effet du rinçage de la bouche après inhalation d'un joint de cannabis sur les concentrations salivaires en cannabinoïdes

Cet amendement a été envoyé à la commission cantonale d'éthique de la recherche sur l'être humain le 16 avril 2013, afin d'obtenir son approbation pour l'amendement au projet de recherche Cannabis / imagerie médicale / conduite automobile.

Amendement au document 5.2

a

Amendement au projet de recherche sur le cannabis, l'IRM fonctionnelle et la capacité à conduire (protocole 107/07).

En Suisse, il est actuellement interdit de conduire un véhicule lorsque l'on est sous l'influence du cannabis. Plusieurs études ont montré que l'analyse de la salive est un moyen efficace de déterminer si un conducteur a consommé récemment du cannabis, car la fumée inhalée contamine rapidement la cavité buccale et donc la salive. Cependant, aucune étude n'a étudié la possibilité de falsifier les résultats de dosage par un rinçage de la bouche après l'inhalation du joint et avant la collecte de salive.

Le but de cette étude est donc de déterminer si un rinçage de la bouche avec différents liquides pourrait conduire à une perte des cannabinoïdes présents dans la salive et ainsi falsifier les résultats obtenus. Les conséquences d'une falsification des résultats sont importantes d'un point de vue de la toxicologie médico-légale.

Il s'agit donc d'une étude toxicologique étalée sur une durée de 3 à 4 mois. Des sujets fumeurs réguliers de cannabis qui ont participé au protocole 107/07 (hommes de 18 à 30 ans) seront recontactés par téléphone pour leur demander s'ils souhaitent participer à cette étude. Six sujets seront retenus. Les volontaires intéressés devront se rendre au service de Pharmacologie Clinique (PCL) du CHUV pour se faire expliquer le protocole. Un test urinaire sera réalisé au même moment pour confirmer la consommation de cannabis. La consommation d'autres drogues est un critère d'exclusion. Un résultat négatif au test urinaire pour le cannabis est aussi un motif d'exclusion.

Les volontaires consommeront les joints chez eux. Ils prépareront leurs propres joints selon leurs habitudes (quantité de cannabis habituelle, coupée ou non avec du tabac) avec leur propre matériel. Il leur est demandé, dans la mesure du possible, de préparer les mêmes joints pour chaque série de collecte. Lors de la préparation de ses joints, le participant devra mettre des

gants (fournis) pour ne pas avoir de cannabis sur les doigts et éviter ainsi la contamination des collecteurs de salive par la suite. Les gants devront être retirés pour l'inhalation. En aucun cas, le volontaire ne doit toucher le coton du collecteur avec les doigts.

La collecte de salive ne doit pas être un prétexte pour consommer du cannabis mais se fera uniquement à l'occasion d'une inhalation souhaitée par le volontaire participant. La participation à cette étude ne peut pas être considérée comme un motif de non respect des dispositions légales relatives à l'usage des stupéfiants et à la conduite automobile.

Pour chaque série de collecte, 3 rinçages et 5 prélèvements de salive (1 avant et 4 après l'inhalation) devront être effectués. Le participant devra noter sur les étiquettes des tubes de collecte l'ordre de prélèvements (1, 2, 3, 4 et 5) et indiquer sur le document fourni (doc 5.6) l'heure du début de l'inhalation et les heures de collecte. Les prélèvements doivent être effectués de la façon suivante :

- Un prélèvement (n°1) 5 à 10 minutes avant le début de l'inhalation
- Un prélèvement (n°2) 10 minutes après avoir fumé un joint
- Premier rinçage
- Un prélèvement (n°3) 20 minutes après avoir fumé
- Deuxième rinçage
- Un prélèvement (n°4) 40 minutes après avoir fumé
- Troisième rinçage
- Un prélèvement (n°5) 60 minutes après avoir fumé

Pendant l'heure qui suit l'inhalation, aucune bouffée ne doit être réalisée.

Le rinçage sera effectué avec 3 liquides différents : de l'eau (liquide facilement disponible), une solution de bain de bouche non alcoolisée (qui paraît idéale pour éliminer les contaminants sans pour autant que l'éthylotest ne soit positif en cas de contrôle inopiné) ou une boisson lactée (car le tétrahydrocannabinol, principale molécule psychoactive du cannabis, est lipophile et devrait donc facilement passer dans une boisson un peu grasse comme le lait).

Une série sera effectuée sans rinçage et servira de contrôle pour les 3 autres. Pour cette série, le participant ne devra pas boire ni manger depuis l'inhalation et jusqu'à la fin de la collecte des 5 échantillons de salive.

Les échantillons de salive collectés doivent rester à température ambiante quelques heures puis conservés au congélateur ou au moins à une température réfrigérée pour éviter toute perte des cannabinoïdes. Le volontaire devra ensuite apporter ses échantillons au service de Pharmacologie Clinique pour qu'ils puissent être analysés au CURML.

Un dédommagement de 50.- est prévu après remise de la totalité des échantillons.

Lausanne, le 16 avril 2013, MF/CG

VII.3. Liste des communications scientifiques

Ce travail de thèse a permis la publication de 6 articles dans des revues scientifiques internationales et a donné lieu à plusieurs présentations orales ou posters lors de congrès nationaux, internationaux ou séminaires.

Publications scientifiques

- **Analyse des cannabinoïdes par spectrométrie de masse en mode tandem**
M. Fabritius, C. Staub, C. Giroud, Ann Toxicol Anal (2011) 23 (1): 21-36
- **Distribution of free and conjugated cannabinoids in human bile samples**
M. Fabritius, C. Staub, P. Mangin, C. Giroud, Forensic Sci Int (2012) 223 (1-2): 114-118
- **Analysis of cannabinoids in oral fluid by liquid-chromatography tandem mass spectrometry**
M. Fabritius, C. Staub, P. Mangin, C. Giroud, Forensic Toxicology (2013) 31 (1): 151-163
- **Letter to the Editor regarding « Simultaneous determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in oral fluid using isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry »**
M. Fabritius, C. Giroud, Anal Bioanal Chem (2013) 405 (1): 435-437
- **Comparison of cannabinoid concentrations in oral fluid and whole blood between occasional and regular cannabis smokers prior to and after inhalation of a cannabis joint**
M. Fabritius, H. Chtioui, G. Battistella, JM. Annoni, K. Dao, B. Favrat, E. Fornari, E. Lauer, P. Maeder, C. Giroud, Anal Bioanal Chem (2013) 405(30): 9791-9803
- **THCCOOH concentrations in whole blood: are they useful in discriminating occasional from heavy smokers?**
M. Fabritius, B. Favrat, H. Chtioui, G. Battistella, JM. Annoni, M. Appenzeller, E. Fornari, E. Lauer, P. Maeder, P. Mangin, C. Staub, C. Giroud, Drug Test Anal (2014) 6(1-2): 155-163
- **Fitness to drive and cannabis: validation of two blood THCCOOH thresholds to discriminate occasional users from heavy smokers**
M. Fabritius, M. Augsburg, H. Chtioui, B. Favrat, C. Giroud
Soumis pour publication

- **Long-term effects of cannabis on brain structure**

G. Battistella, E. Fornari, JM. Annoni, H. Chtioui, K. Dao, M. Fabritius, B. Favrat, JF. Mall, P. Maeder, C. Giroud

Hors cadre de la thèse, soumis pour publication

Communications orales

- **Profils cinétiques salivaires chez des fumeurs réguliers de marijuana ayant inhalé un joint de cannabis pur titré à 11% de THC**

M. Fabritius, C. Staub, P. Mangin, M. Appenzeller, C. Giroud, XXème congrès de la Société Française de Toxicologie Analytique, Chambéry (France), 19-21 septembre 2012

- **Différences entre fumeurs occasionnels et fumeurs réguliers de cannabis**

M. Fabritius, E. Lauer, P. Mangin, C. Staub, C. Giroud, Journée d'été de la Société Suisse de Médecine Légale, Zermatt (Suisse), 14-15 juin 2013

- **Time profiles of cannabinoids in whole blood and oral fluid from occasional and heavy cannabis consumers after smoking a cannabis joint containing 11% THC**

M. Fabritius, E. Lauer, H. Chtioui, M. Appenzeller, P. Mangin, C. Staub, C. Giroud, 51st annual meeting of The International Association of Forensic Toxicologists, Funchal (Madère – Portugal), 2-7 septembre 2013

- **THCCOOH concentrations in whole blood: are they useful in discriminating occasional from heavy smokers?**

M. Fabritius, B. Favrat, H. Chtioui, E. Lauer, P. Mangin, C. Staub, C. Giroud, Workshop 2013 de la Commission Circulation Routière (CCR), Harmonisation de l'interprétation du cannabis en Suisse, Société Suisse de Médecine Légale, Bern (Suisse), 8 novembre 2013

Posters

- **Whole blood cannabinoid pharmacokinetic parameters in heavy and occasional smokers. Do oral fluid cannabinoid measurements correlate with whole blood data in heavy smokers?**

M. Fabritius, E. Lauer, H. Chtioui, M. Appenzeller, P. Mangin, C. Staub, C. Giroud, 11th Conference of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, Genève (Suisse), 28-31 août 2013