



UNIL | Université de Lausanne

Unicentre

CH-1015 Lausanne

<http://serval.unil.ch>

Year : 2020

Intérêt de la spectrométrie de masse haute-résolution pour l'analyse toxicologique systématique

Joye Timothée

Joye Timothée, 2020, Intérêt de la spectrométrie de masse haute-résolution pour
l'analyse toxicologique systématique

Originally published at : Thesis, University of Lausanne

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

Document URN : urn:nbn:ch:serval-BIB_71ACE010C8E35

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 de médecine

Centre Universitaire Romand de Médecine Légale

**Intérêt de la spectrométrie de masse haute-résolution pour l'analyse
toxicologique systématique**

Thèse de doctorat ès sciences de la vie (PhD)

présentée à la

Faculté de biologie et de médecine
de l'Université de Lausanne

par

Timothée Joye

MSc ès Sciences Forensique, mention criminalistique chimique

Jury

Prof. Nelly Pitteloud, Présidente
Prof. Aurelien Thomas, Directeur de thèse
Prof. Bernard Favrat, Co-directeur
Prof. Youssef Daali, expert
Prof. Pierre Esseiva, expert
Prof. Alain Verstraete, expert

Lausanne 2020

Imprimatur

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

Président·e	Madame	Prof.	Nelly	Pitteloud
Directeur·trice de thèse	Monsieur	Prof.	Aurélien	Thomas
Co-directeur·trice	Monsieur	Prof.	Bernard	Favrat
Expert·e·s	Monsieur	Prof.	Youssef	Daali
	Monsieur	Prof.	Pierre	Esseiva
	Monsieur	Prof.	Alain	Verstraete

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

Monsieur Timothée Joye

Master ès Sciences en science forensique, mention criminalistique chimique,
Université de Lausanne

intitulée

Intérêt de la spectrométrie de masse haute- résolution pour l'analyse toxicologique systématique

Lausanne, le 17 juin 2020

pour le Doyen
de la Faculté de biologie et de médecine



Prof. Niko GELDNER
Directeur de l'Ecole Doctorale

Remerciements

Durant ce projet de presque 5 ans, j'ai eu l'occasion de côtoyer de près ou de loin de nombreuses personnes qui ont participé ou influencé l'accomplissement de ce travail.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Professeur Aurélien Thomas qui m'a encadré et suivi depuis la réalisation de mon projet de Master. Il m'a rapidement accordé sa confiance et a su se montrer très disponible et à l'écoute dans la conduite de l'ensemble de mes travaux. Il m'a également aidé à me remettre en question et à aborder le travail de routine et de recherche de façon plus aboutie ce qui m'a permis d'évoluer scientifiquement, professionnellement et humainement.

Je tiens également à remercier le Professeur Bernard Favrat qui a accepté de co-diriger ce travail. Son aide m'aura été précieuse, notamment concernant les approches liées à la capacité et à l'aptitude à conduire, représentant un des enjeux principal de ce travail.

J'adresse mes plus vifs remerciements au Docteur Marc Augsburger pour m'avoir accueilli au sein de son unité. Sa vision ouverte concernant l'évolution technologique au sein du laboratoire m'a permis d'implémenter certains développements réalisés au cours de ma thèse dans un cadre appliqué lors des analyses de routine.

Toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres de mon jury de thèse, au Professeur Alain Verstraete, au Professeur Pierre Esseiva, au Professeur Yousef Daali, ainsi qu'à la présidente de ce jury, la Professeure Nelly Pitteloud, d'avoir accepté de donner de leur temps et de juger ce travail.

Un grand merci aux Docteurs Alexandre Moulin et Benjamin Boutrel qui m'ont donné accès à des échantillons qui m'auront permis d'élargir le champ de ma thèse à des approches d'imagerie tissulaire.

Je remercie également le Docteur Pierre Lescuyer et son équipe notamment Abderrahim Karmime, pour son aide et son implication dans le développement de l'approche de screening haute-résolution.

Mes remerciements vont à l'ensemble des collaborateurs du CURML que ce soit à Genève ou à Lausanne. Je remercie les Docteurs Christèle Widmer, Federica Gilardi, Tatjana Sajic, Frank Sporkert et Caroline Mathon et Sébastien Lenglet. Je remercie également tout particulièrement Federica Zbinden, Françoise Nicoud, Joëlle Baechler et Filomena Rocha Cunha. Un grand merci à Max Villa, Estelle Lauer Magali Dovat-Sabatella, Angélique Chevalley, Cinzia Forney, Valérie Aepli, Céline Vermeille, Françoise Iatropoulos-Jollien, Annette Jordan, Melek Donmez-Altun et Christel Gachoud. Merci à Sara Petter, Marine Manso, Tatiana Duffey ainsi qu'à Lucia Delprete. Merci aux autres doctorants avec qui j'ai eu l'occasion de partager au sein du CURML, Marie Gasser, Gaëlle Magliocco, Sasha Aljakna ainsi que Marie Gorka. Merci également à l'ensemble des stagiaires et apprentis que j'ai eu l'occasion de côtoyer au laboratoire, notamment Rachel Jacot-Descombes, Joan Jordan, Laura Carrara et Allison Steiner. Mes remerciements particuliers à Nasim Bararpour qui a suivi le même parcours que moi sur des approches différentes tout au long de ces 5 ans. Un grand merci également au Docteur Jonathan Sidibe, camarade de course à pied que j'ai eu l'occasion de côtoyer lors de quelques triathlons et voyages en train notamment. Je souhaite tout particulièrement remercier le Docteur Julien Deglon avec qui j'ai beaucoup échangé et dont certains propos m'auront certainement servi de déclic dans mon évolution au cours de cette thèse. Un grand merci également à Elodie Lefrançois qui m'aura aidé à garder un équilibre entre le travail et le divertissement ces 5 dernières années

Merci aux stagiaires qui ont participé de façon active à certains de mes travaux et que j'ai eu l'occasion de superviser, Katell Rocher, Katia Garcia, Jonathan Maurer et Praveen Kelankandath.

Je termine ces remerciements en exprimant ma plus profonde gratitude à tous les gens qui ont contribué à mon bien être et indirectement à mon projet durant ces 5 années, à mes coéquipiers, à mes amis, ainsi qu'à famille.

Résumé

Parmi ses missions, la toxicologie forensique s'intéresse à la recherche de substances ayant pu modifier le comportement et influencer ou causer la mort d'un individu. La liste des substances potentiellement impliquées dans un cadre médico-légal est vaste et présente une grande diversité de propriétés physico-chimiques. Cette diversité nécessite la mise en œuvre de préparation d'échantillon et de techniques d'analyse spécifiques.

À l'heure actuelle, les méthodes de séparation chromatographiques couplées au pouvoir d'identification de la spectrométrie de masse constituent la stratégie analytique la plus répandue en toxicologie forensique. L'objectif de cette thèse a été d'évaluer l'intérêt de la spectrométrie de masse à haute-résolution (HRMS) en développant des alternatives aux méthodes classiques, à la fois concernant les approches de criblages et les approches quantitatives.

Dans ce but, une méthode de criblage basée sur la chromatographie liquide (LC) couplée à l'HRMS permettant la détection et l'identification simultanée de 1065 substances à partir de microéchantillon sanguin (*Dried Blood Spots* ou DBS) a été développée et implémentée en routine. Cette méthode a ensuite été appliquée dans le cadre d'une étude visant à évaluer la prévalence des drogues et des médicaments au sein de conducteurs en Suisse Romande.

Cette étude a notamment montré que le pourcentage de positivité le plus élevé à une drogue d'abus était mesuré pour les conducteurs de moins de 35 ans pendant les nuits et les week-ends, périodes qui sont considérés comme particulièrement à risque en ce qui concerne les accidents mortels dans ce segment de la population. De plus, les résultats ont montré que la perception du risque d'être contrôlé positivement est relativement faible parmi les conducteurs interrogés. Globalement, ces résultats ont mis en évidence l'intérêt des approches développées au cours de ce travail afin d'améliorer la prévention liée aux problématiques de médicaments et de drogues au volant (MDV).

En accord avec ce constat, plusieurs approches quantitatives associées à la problématique MDV ont également été mises au point au moyen de la technologie HRMS et sont maintenant implémentées dans le service du laboratoire.

De manière générale, ces nouvelles approches HRMS présentées dans ce travail ont ainsi permis d'augmenter les performances analytiques tout en réduisant les temps de préparation d'échantillons et d'analyse, ainsi que la quantité d'échantillon nécessaire.

A la lumière de ce travail, il semble évident que la spectrométrie de masse à haute-résolution va jouer un rôle primordial dans le domaine de la toxicologie forensique dans les années à venir, en apportant des solutions innovantes pour répondre aux enjeux liés aux demandes d'expertise auxquelles le toxicologue est soumis.

Abstract

Among its tasks, forensic toxicology focuses on the research of substances that might have modified someone's behaviour and influence or cause his death. The list of substances that might be implied in a forensic investigation is broad and present a large diversity of physico-chemical properties. This diversity requires the implementation of specific sample preparation and analytical strategies.

Currently, the chromatographic separation approaches coupled with the identification power of mass spectrometry are the most widespread analytical strategies in forensic toxicology. The goal of this project was to evaluate the interest of high-resolution mass spectrometry (HRMS) and present alternatives that were developed during this work, to both classical screening and quantitative confirmation approaches, benefiting from the technological improvements.

Following this goal, a screening procedure based on liquid chromatography (LC) coupled with HRMS allowing the simultaneous detection and identification of 1065 substances on DBS (Dried Blood Spot) samples was developed and implemented for routine analyses. This procedure was then applied in a roadside study whose goal was to evaluate the prevalence of drugs and pharmaceuticals among drivers in Western Switzerland.

This study notably highlighted that the number of positive cases measured in biological fluids was higher regarding drivers under 35 years old during nights and weekends that are known to be at risk regarding fatal crashes for this specific population. Moreover, the results demonstrated that the risk's perception of being positively controlled was relatively low among asked drivers. Overall, our results highlighted the interest of the approaches developed during this work towards prevention and repression regarding driving under the influence of drugs (DUID).

According to those results, several quantitative approaches associated with DUID cases have been developed benefiting from HRMS and are now implemented in our laboratory

Overall, the new HRMS methods presented herein, allowed to improve the analytical performances while reducing the time required for sample preparation and analysis as well as the necessary volume of sample.

In light of this work, it seems evident that HRMS will play an essential role in the coming years in the field of forensic toxicology bringing innovative solutions towards the toxicologist's missions.

Avant-propos

Dans le domaine de la toxicologie forensique, les analyses par chromatographie (gazeuse, GC, ou liquide, LC) couplées à la spectrométrie de masse (MS) sont les approches les plus couramment utilisées. Les développements technologiques et particulièrement la spectrométrie de masse haute-résolution (HMRS) permettent de diversifier les stratégies analytiques possibles et d'améliorer les performances instrumentales aux divers stades de l'analyse toxicologique. L'analyse d'un échantillon en toxicologie se déroule généralement en deux étapes. Une première étape de criblage permettant de détecter et d'identifier les substances d'intérêt. Cette étape peut être réalisée dans diverses matrices biologiques. La 2^{ème} étape consiste en une confirmation quantitative dans le sang des analytes identifiés lors de la première étape, qui permettra une interprétation toxicologique afin de déterminer si la personne était ou non sous l'influence de la substance au moment des faits.

Mon premier contact avec la spectrométrie de masse haute-résolution remonte au printemps 2015. À cette époque, j'effectuais mon travail de Master au sein du CURML sous la direction, déjà, du Professeur Aurélien Thomas. Le projet consistait à divers développements d'approches MALDI (Matrix Assister Laser Desorption/Ionisation) HRMS pour des approches de criblage toxicologique et de métabolomique par imagerie par spectrométrie de masse (IMS), sur des biopsies de tumeurs oculaires notamment, s'affranchissant des étapes séparatives chromatographiques. Ce travail m'a laissé entrevoir le potentiel de l'HRMS pour les approches toxicologiques et m'a permis de me familiariser avec le travail de laboratoire et les aspects techniques liés aux analyses de diverses matrices biologiques.

À la fin de ce projet de Master, j'ai eu la chance de me voir proposer le travail de doctorat financé par l'Office Fédéral de la Santé Publique (OFSP) qui vous est présenté ici. Initialement, ce projet était basé sur le développement d'une approche de criblage LC-HRMS sur des microprélèvements de sang au bout du doigt (appelé aussi Dried blood spots en anglais ou plus

généralement DBS). L'objectif était ensuite d'appliquer cette méthode sur des échantillons collectés au bord de la route lors de contrôles routiers effectués en collaboration avec la police. L'objectif de ce projet était double ; le premier but consistait à obtenir plus d'informations concernant la prévalence des drogues et des médicaments consommés par les conducteurs afin d'améliorer la prévention. Le deuxième objectif était d'évaluer l'efficacité d'un kit de prélèvement DBS en dehors d'un environnement médicalisé.

À la suite des résultats extrêmement prometteurs obtenus notamment grâce aux développements d'approches HRMS, ce travail a pu être étendu. J'ai en effet eu l'occasion de développer diverses approches toxicologiques, que ce soit pour des analyses de criblages ou des analyses quantitatives. Si ces développements concernent principalement les approches de consommation de substances psychoactives au volant, d'autres applications ont également été mises en évidence, et notamment des approches d'imagerie par spectrométrie de masse.

Au final, l'objectif de ce travail a pu être étendu pour présenter l'intérêt de la spectrométrie de masse-haute résolution à travers divers développements et applications dans le domaine de la toxicologie forensique.

Structure de la thèse

Ce travail de thèse est constitué de 5 chapitres :

La première partie (**Chapitre 1**) est une partie introductive dédiée à la présentation du sujet. La première section de cette introduction traite de l'analyse toxicologique systématique qui présente les diverses étapes de la stratégie à adopter en présence d'un échantillon inconnu en toxicologie. La deuxième section quant à elle présente les mesures de performance d'une méthode analytique ainsi que l'apport de la spectrométrie de masse haute-résolution vis-à-vis de ces paramètres. Elle présente également quelques aspects théoriques concernant le couplage LC-HRMS par electrospray et les analyseurs de masse haute-résolution, qui sont la base technologique des applications qui seront présentés par la suite.

La deuxième partie (**Chapitre 2**) présente une approche de criblage développée durant cette thèse pour l'analyse des drogues et des médicaments. Une basée sur le couplage entre la chromatographie en phase liquide et la spectrométrie de masse haute-résolution pour effectuer un criblage large-échelle à partir de microéchantillons de sang sera présentée. Elle s'applique à des cas de toxicologie comportementale de conduite sous l'influence d'alcool, de drogues ou de médicaments (MDV), ainsi qu'à des cas post-mortem.

La 3^{ème} partie (**Chapitre 3**) présente des approches utilisant les propriétés de la spectrométrie de masse haute-résolution pour la quantification des drogues et médicaments liés à la conduite sous l'influence d'une substance psychoactive. La première approche développée durant ce travail et décrite ici se concentre sur l'analyse des cannabinoïdes alors que la seconde concerne une approche multi-analyte pour l'analyse des substances fréquemment rencontrées dans le cadre de la conduite sous l'influence.

La 4^{ème} partie (**Chapitre 4**) reprend tout particulièrement la problématique de la conduite sous l'influence de substances psychoactives. Ce chapitre présente une étude dont les prélèvements

ont été réalisés sur base volontaire lors de contrôles routiers en collaboration avec les polices de Suisse romande.

Enfin, la 5^{ème} partie (**Chapitre 5**) comprend les conclusions de cette thèse ainsi que les perspectives liées aux nouveaux développements en toxicologie et notamment l'imagerie par spectrométrie de masse.

Table des matières

Remerciements	I
Résumé	IV
Abstract	V
Avant-propos	VI
Structure de la thèse.....	VIII
Table des matières.....	X
Abréviations.....	XII
Communications scientifiques effectuées dans le cadre de la thèse.....	XV
Chapitre 1 : Introduction à l'analyse toxicologique systématique	1
1. Missions de la toxicologie forensique.....	2
1.1. Toxicologie du vivant.....	3
1.2. Toxicologie post-mortem	4
2. Matrices biologiques	5
3. L'analyse toxicologique systématique	10
4. Conclusions du chapitre.....	31
5. Références du chapitre.....	32
Chapitre 2 : Approches de criblage par couplage LC-HRMS	40
1. Stratégie analytiques, acquisition dépendante et indépendante des données	42
2. Criblage large-échelle par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute-résolution.....	45
2.1. Présentation de la problématique.....	45
2.2. Article : Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for broad-spectrum screening of dried blood spot as microsampling procedure	48
3. Conclusions du chapitre.....	56
4. Références du chapitre.....	57
Chapitre 3 : Approches quantitatives.....	59
1. Aspects théoriques.....	61
1.1. Stratégies analytiques	61
1.2. Validation de méthode	64
2. Applications	66
2.1. Analyse des cannabinoïdes	67
2.2. Approche multi-analyte pour l'analyse des cas drogues et médicaments au volant	78

3. Conclusions du chapitre.....	93
4. Références du chapitre.....	93
Chapitre 4 : Application de l'HRMS au dépistage à large échelle de la consommation de drogues et de médicaments sur une population de conducteurs en Suisse romande.....	99
1. Présentation du projet	101
1.1. Problématiques de sécurité routière, en particulier la conduite sous l'influence de substances psychoactives	101
1.2. Design de l'étude	103
1.3. Approches de prélèvement systématiques minimalement invasives	106
1.4. Comparaison des études sur des conducteurs suspectés avec les études réalisées sur base volontaire	108
1.5. Limitations de l'étude	112
1.6. Article : First study on randomly controlled drivers in Western Switzerland, evolution of the drug prevalence in the last 10 years	115
2. Conclusion du chapitre	135
3. Références du chapitre.....	135
Chapitre 5 : Conclusion et perspectives sur l'apport de l'HRMS en toxicologie forensique.....	138
Références du chapitre.....	146
Annexe 1 : Protocole de demande à la commission d'éthique concernant l'étude au bord de la route.....	148
Annexe 2 : Questionnaire concernant la sécurité routière utilisant auprès des participants à l'étude au bord de la route.....	171
Annexe 3: Article: High throughput qualitative and quantitative drug checking by MALDI HRMS	174
Présentation de la problématique	174
Article : High throughput qualitative and quantitative drug checking by MALDI HRMS	177
Références de l'annexe.....	187
Annexe 4: Article : In situ metabolomic changes in rat hippocampus after acute cocaine administration.....	189
Présentation de la problématique	189
Article : In situ metabolomic changes in rat hippocampus after acute cocaine administration.....	190

Abréviations

ACN : Acétonitrile

ALAT : Alanine Aminotransférase

ASAT : Aspartate Aminotransférase

CDT : *Carbohydrate Deficient Transferrin*

CID : *Collision-Induced Dissociation*, Dissociations induite par collision

CURML : Centre Universitaire Romand de Médecine Légale

DBS: *Dried blood spot*, Spots de sang séchés

DDA : *Data-Dependent Acquisition*, Acquisition dépendante des données

DIA : *Data-Independent Acquisition*, Acquisition indépendante des données

DESI : *Desorption Electrospray Ionization*

DRUID : *Driving under the influence of alcohol or drugs*

EI : *Electron Impact Ionisation*, Ionisation par impacte électronique

ELISA : *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EMIT : *Enzyme Multiplied Immunoassay Test*

ESI : *Electrospray Ionisation*

ETG : Ethylglucuronide

FA : Acide Formique

FWHM : *Full Width at Half Maximum*

GC : *Gas Chromatography*, Chromatographie en Phase Gazeuse

HCD : *Higher-energy Collisional Dissociation*

HILIC : *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*

HRMS : *High Resolution Mass Spectrometry*, Spectrométrie de masse haute-résolution

IMS : *Mass Spectrometry Imaging*, Imagerie par spectrométrie de masse

IT : *Ion Trap*, Trappe ionique

LC : *Liquid Chromatography*, Chromatographie en phase liquide

LIT : *Linear Ion Trap*, Trappe d'ions linéaire

LOD : Limites de détection

LOI : Limite d'identification

LOQ : Limite de quantification

m/z : Rapport masse sur charge

MALDI : *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, Désorption/ionisation laser assistée par matrice

MDA : 3,4-méthylènedioxyamphétamine

MDEA : 3,4-méthylènedioxy-N-éthylamphétamine

MDMA : 3,4-méthylènedioxy-N-méthylamphétamine

MDV : Médicaments et drogues au volant

MeOH : Méthanol

MS : *Mass Spectrometry*, Spectrométrie de masse

NPS, *New Psychoactive Substances*, Nouvelles substances psychoactives

OFROU : Office federal des routes

PEth : Phosphatidylethanol

PRM : *Parallel Reaction Monitoring*

Q : Analyseur à filtre Quadripolaire

QC : Contrôle qualité

QqQ : Triple Quadripôle

RP : *Reverse Phase*

SIM : *Selected Ion Monitoring*

SRM : *Selected Reaction Monitoring*

TFA: Acide Trifluoroacétique

THC : Tétrahydrocannabinol

THC-OH : 11-hydroxy-delta-9-THC

THC-COOH : 11-nor-9-carboxy-THC

TOF : *Time Of Flight*, Analyseur temps de vol

Communications scientifiques effectuées dans le cadre de la thèse

Articles

- **Liquid chromatography-high resolution MS-based assay for broad-spectrum drug screening of dried blood spot as microsampling procedure.** T. Joye, J. Sidibe, J Déglon, A. Karmime, F. Sporkert, C. Widmer, B. Favrat, M. Augsburger, A. Thomas, 2019, *Analytica Chimica Acta*, 1063, 110-116
- **Parallel reaction monitoring-based quantification of cannabinoids in whole blood.** T. Joye, C. Widmer, B. Favrat, M. Augsburger, A. Thomas, 2020, *Journal of Analytical Toxicology*, 44 (6), 541-548
- **In situ metabolomic changes in rat hippocampus after acute cocaine administration.** T. Joye, N. Bararpour, M. Augsburger, B. Boutrel, A. Thomas, 2019, *Journal of Mass Spectrometry*, 437, 87-91
- **Driving under the influence of drugs - a single parallel monitoring-based quantification approach on whole blood.** T. Joye, K. Rocher, J. Déglon, J. Sidibe, B. Favrat, M. Augsburger, A. Thomas, 2020, *Frontiers in Chemistry*, Volume 8, Article 626
- **High throughput qualitative and quantitative drug checking by MALDI HRMS.** T. Joye, C. Widmer, R. Morger Mégevand, S. Longère, M. Augsburger, A. Thomas, 2020, *Frontiers in Chemistry*, Volume 8, Article 695
- **Randomly controlled drivers using minimal-invasive sampling: assessment of the drug prevalence in Western Switzerland over two time periods.** T. Joye, J. Déglon, N. Donzé, F. Gilardi, J. Sidibe, H. Kharbouche, B. Favrat, M. Augsburger, A. Thomas, 2020, (In preparation)

Présentations orales et présentations de posters

- Medlem 2016 (Poster): **Metabolomic imaging mass spectrometry of high-risk metastasizing uveal tumors classified upon BAP1 mutational status**, T. Joye, N. Bararpour, C. Rivolta, B. Royer-Bertrand, M. Augsburger, F. Behar-Cohen, A. Moulin, A. Thomas
- SOFT-TIAFT 2017 (Oral): **Evaluation of dried blood spot sampling and UHPLC-HRMS for large-scale screening of drugs and pharmaceuticals**, T. Joye, J. Sidibé, J Déglon, F. Sporkert, B. Favrat, M. Augsburger, A. Thomas (Rescheduled meeting)
- Medlem 2017 (Poster): **Evaluation of dried blood spot sampling and UHPLC-HRMS for large-scale toxicological screening of drugs and pharmaceuticals**
- SSML 2018 (Oral): **Evaluation of microsampling hyphenated to UHPLC-HRMS for broad screening of drugs and pharmaceuticals**, T. Joye, J. Sidibe, J Déglon, A. Karmime, F. Sporkert, C. Widmer, B. Favrat, M. Augsburger, A. Thomas
- SFTA 2018 (Poster): **Evaluation du prélèvement de sang sur papier buvard analysé par UHPLC-HRMS pour le criblage large echelle de drogues et de médicaments**, T. Joye, J. Sidibe, J Déglon, A. Karmime, F. Sporkert, C. Widmer, B. Favrat, M. Augsburger, A. Thomas
- TIAFT 2018 (Oral): **Evaluation of microsampling hyphenated to UHPLC-HRMS for broad screening of drugs and pharmaceuticals**, T. Joye, J. Sidibe, J Déglon, A. Karmime, F. Sporkert, C. Widmer, B. Favrat, M. Augsburger, A. Thomas

Chapitre 1

Introduction à l'analyse toxicologique systématique

Introduction à l'analyse toxicologique systématique

1. Missions de la toxicologie forensique

Les missions de la toxicologie forensique s'inscrivent, par définition, dans un cadre juridique. Celles-ci se concentrent principalement sur la recherche de substances ayant pu causer ou influencer la mort d'un individu ou d'en modifier le comportement, notamment dans des cas de conduites sous l'influence d'une substance psychoactive ou de soumission chimique. L'objectif est d'abord d'identifier puis de quantifier les substances exogènes ayant pu avoir un des rôles susmentionnés dans diverses matrices biologiques. La liste des substances potentiellement impliquées dans un cadre médico-légal est vaste. Celles-ci présentent une grande diversité de propriétés physico-chimiques nécessitant des techniques d'analyses et de préparation d'échantillons spécifiques. Dans ce travail, il sera principalement fait mention des substances psychoactives pouvant influencer le comportement, à savoir les drogues d'abus (cannabinoïdes, opiacés, cocaïne, amphétamines, nouvelles substances psychoactives) ainsi que certaines classes de médicament (antidépresseurs tricycliques et inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine, neuroleptiques, benzodiazépines et opioïdes principalement).

Lors de la réception d'un échantillon, le toxicologue va mettre en place une méthodologie systématique permettant de confirmer ou d'infirmer la présence de substances présentant un intérêt toxicologique. Cette méthodologie appelée l'analyse toxicologique systématique (ATS) est fractionnée en 2 étapes majeures. La première consistera en une procédure qualitative de criblage toxicologique. Cette procédure peut engager plusieurs stratégies analytiques ayant pour but de détecter et d'identifier toute substance présentant un intérêt toxicologique. Cette étape sera suivie d'une confirmation quantitative idéalement réalisée dans le sang. Pour cette raison, les analyses de criblages doivent être rapides et exhaustives.

À l'heure actuelle, les méthodes chromatographiques séparatives couplées au pouvoir d'identification de la spectrométrie de masse constituent la stratégie analytique la plus répandue en toxicologie forensique. L'objectif de ce travail fût d'évaluer l'intérêt de la spectrométrie de masse haute-résolution (HRMS) pour l'ATS, que ce soit au niveau des approches de criblages mais aussi des approches quantitatives. Ce premier chapitre décrira de façon plus approfondie les missions et les défis auxquels sont confrontés le toxicologue forensique lors de l'analyse d'un échantillon inconnu. Les choix de la matrice biologique et de la procédure analytique sont des aspects capitaux lié à la réalisation de ces missions. Le but de ce chapitre est de décrire précisément le cadre d'application ainsi que les aspects techniques liés à l'utilisation de l'HRMS pour l'ATS dans les domaines de la toxicologie du vivant et de la toxicologie post-mortem.

1.1. Toxicologie du vivant

La toxicologie du vivant se divise en deux classes principales, à savoir la toxicologie comportementale et le suivi d'abstinence. La toxicologie comportementale a pour but d'évaluer si une substance consommée ou administrée a pu être impliquée dans une intoxication non létale ou causer un changement de comportement chez un individu. Les deux problématiques principales de toxicologie comportementale rencontrée au laboratoire sont liées aux cas de conduite sous l'influence d'alcool, de drogues ou de médicaments (DUID ou MDV), ainsi que des cas de soumission chimique, notamment liés à des affaires d'agression sexuelle.

Les cas MDV qui constitueront la majeure partie de la problématique durant ce travail se distinguent par la grande diversité des composés potentiellement impliqués. Si les drogues classiques sont relativement bien définies, l'apparition de nouvelles substances psychoactives (NPS), ainsi que la diversité des médicaments pouvant influencer la capacité à conduire, compliquent la tâche du toxicologue.

Le suivi d'abstinence, quant à lui, a pour but de s'assurer qu'une personne ayant été testée positive à une drogue d'abus à une ou plusieurs reprises ou présentant un comportement à risque vis-à-vis de sa consommation d'alcool est capable de s'abstenir de consommer. Ces tests présentent certains avantages pour le toxicologue puisqu'ils concernent généralement une liste de substances relativement petite et bien définie. Cette problématique impliquera l'utilisation de matrice biologique possédant des fenêtres de consommation relativement longue, telles que l'urine ou les cheveux. En effet, l'objectif de ces analyses n'est pas de mettre en évidence une consommation à un moment précis mais bien de s'assurer qu'une substance n'a pas été consommée pendant une période définie.

1.2. Toxicologie post-mortem

La recherche d'une ou plusieurs substances ayant pu causer directement ou indirectement un décès non-naturel peut s'avérer complexe. Lors d'une prise en charge médicale ante-mortem, l'état du patient a pu nécessiter l'administration de certaines substances qu'il convient de connaître. Il en va de même concernant le traitement médical usuel du sujet décédé. Il arrive d'ailleurs que les substances associées au traitement du patient soient impliquées dans le décès, à la suite d'une prise en charge médicale inadaptée par exemple. La recherche de substances peut être également orientée par divers éléments de l'enquête. En effet, une information des enquêteurs, du médecin légiste, ainsi que la présence de drogues, médicaments ou d'une substance non déterminée à proximité du corps, peuvent s'avérer capitales pour le toxicologue. En effet, les analyses toxicologiques post-mortem seules ne suffisent pas à établir si la consommation d'une substance est la cause du décès.

Parmi les difficultés associées à l'analyse post-mortem, les différentes matrices biologiques peuvent être soumises à des évolutions de concentration post mortem liées à la dégradation ou néoformation de molécules, ainsi qu'à des phénomènes de redistribution de certaines substances dans l'organisme. Ces différents aspects compliquent l'interprétation toxicologique

des résultats effectuée sur la base des analyses quantitatives. De façon plus générale, l'état de dégradation du corps peut également compliquer l'accès à une matrice en particulier ou interférer avec les analyses. C'est le cas notamment des amines formées lors de la putréfaction cadavérique. L'identification d'une substance ayant pu causer un décès de façon directe ou indirecte présente néanmoins un avantage pour la personne en charge des analyses, puisqu'une intoxication létale est habituellement associée à une concentration élevée de la substance impliquée.

2. Matrices biologiques

Toutes les matrices biologiques disponibles sont sujettes à être analysées dans un laboratoire de toxicologie. Classiquement, le sang et l'urine sont les matrices de référence en toxicologie, mais d'autres matrices peuvent éventuellement être considérées selon les analyses réalisées. Comme mentionné, le cheveu est par exemple, couramment analysé pour des questions de suivi d'abstinence¹⁻². Les fluides oraux, notamment la salive sont également fréquemment utilisés comme c'est le cas dans le cadre de la conduite sous l'influence de drogues ou de médicaments. Il a également été fait mention d'autres matrices alternatives comme par exemple le liquide lacrymal, la sueur, ou le méconium³⁻⁴.

Dans les cas de toxicologie post-mortem, les possibilités d'échantillonnage se multiplient puisque l'aspect invasif du prélèvement n'entre plus en ligne de compte et toutes les matrices biologiques deviennent potentiellement d'intérêt⁵, l'utilisation du sang et de l'urine reste néanmoins largement majoritaire lorsque ces matrices sont à disposition. En effet, entre 2011 et 2015, 1612 cas post-mortem ont été analysés au sein de l'Unité de Toxicologie et Chimie Forensiques (UTCF) dont 96 % et 73 % des cas impliquant l'utilisation du sang et de l'urine respectivement. Selon ces mêmes statistiques internes, le contenu gastrique et la bile (11 %), les cheveux (10 %), ainsi que des tissus biologiques tels que les muscles (3.7 %) et le foie (2.1 %) ont également été utilisés de façon plus marginale⁵. Le choix de l'échantillon sera cependant

déterminé par les besoins de l'interprétation toxicologique des résultats, les analytes n'ayant pas la même fenêtre de détection en fonction de la matrice dans laquelle ils sont recherchés. C'est donc le contexte de l'investigation et la demande du mandant qui déterminera ce choix.

Le toxicologue sera également parfois confronté à des difficultés pratiques. Par exemple, la difficulté d'obtenir certains échantillons à la suite d'une dégradation du corps. Dans les sections suivantes seront décrites les particularités des matrices ayant été utilisées durant ce travail, principalement le sang, ainsi que de l'urine comme matrice importante en toxicologie, notamment pour les applications de criblage.

2.1. Urine

L'urine est depuis longtemps la matrice de choix en ce qui concerne les approches de criblage. Si les développements analytiques permettent la mise au point de méthodes de criblage dans diverses matrices, et notamment le sang, l'urine conserve certains avantages. Premièrement, elle peut être collectée de façon non invasive, ou presque, en quantités importantes, et ce sans intervention médicale ou de personnel qualifié. Elle présente également l'avantage de concentrer la plupart des substances d'intérêt ainsi que leurs métabolites⁶. L'urine est une matrice relativement « propre » puisque pauvre en protéines et en lipides, ce qui la rend idéale pour des tests nécessitant une préparation d'échantillons simplifiée. Certaines analyses développées et publiées ne comprennent d'ailleurs qu'une simple dilution suivie d'une injection en LC-MS⁷⁻⁸.

L'utilisation de l'urine comme matrice comprend néanmoins 2 obstacles à son utilisation généralisée en toxicologie. Premièrement, la fenêtre de détection des substances d'intérêt dans l'urine est relativement longue, ce qui compromet la détection de la substance initialement ingérée et favorise celle de ses métabolites. Si ce paramètre s'avère être un avantage concernant les étapes de dépistage, il complique l'interprétation toxicologique des cas sur la base des résultats urinaires. En effet, sur cette base, il est impossible de savoir si la personne était sous

l'influence d'une substance au moment du prélèvement. Ce type de prélèvement est également relativement facilement falsifiable. Heureusement, certaines stratégies peuvent être mises en place pour compliquer la tâche du fraudeur. L'utilisation d'un marqueur ingéré par le patient avant le prélèvement permet, par exemple, de s'assurer que le prélèvement n'a pas été remplacé par une autre urine. La mesure de la créatinine permet également de confirmer qu'il s'agit bien d'urine ainsi que de mettre en évidence une éventuelle dilution de l'échantillon. D'autres caractéristiques physiques (la couleur, la formation de mousse, etc...), ainsi que des paramètres physico-chimiques comme le pH, permettent également d'identifier une éventuelle falsification de l'échantillon.

2.2. Sang

Le sang est la matrice de référence en toxicologie forensique pour les analyses quantitatives. En effet, le sang est la seule matrice permettant de déterminer si une personne était sous l'effet d'une substance à moment donné. Il existe une assez bonne corrélation entre la concentration sanguine en drogues ou en médicaments et l'effet observé sur le consommateur, facilitant l'interprétation toxicologique. La corrélation entre la concentration sanguine et l'effet toxicologique est liée au fait que le sang est un vecteur de distribution direct de ces substances contrairement aux autres matrices biologiques. C'est d'ailleurs pour cette raison que les seuils thérapeutiques liés à une consommation de médicament ainsi que ceux fournis par l'office fédéral des routes (OFROU) dans son ordonnance sur la sécurité routière, le sont dans le sang⁹⁻¹⁰. Cet aspect est également amplifié par le fait que la littérature à disposition est nettement plus fournie en ce qui concerne l'interprétation toxicologique dans le sang par rapport aux autres matrices biologiques.

Malgré tout, le sang présente quelques inconvénients, à la fois d'un point de vue logistique et analytique. En effet, si le prélèvement par ponction veineuse rend le prélèvement difficilement falsifiable, la prise de sang est un mode de prélèvement invasif, nécessitant certains moyens

logistiques ainsi que la présence de personnel médical¹¹. De plus, dans certaines situations, notamment certains cas post-mortem mais également en ce qui concerne une partie vulnérable de la population, le volume de sang disponible peut s'avérer limité¹². Deuxièmement, le sang complet est également une matrice extrêmement complexe ce qui complique la préparation de l'échantillon et peut interférer avec les analytes d'intérêt. Enfin, les concentrations des analytes sont généralement plus faibles que dans l'urine, ce qui nécessite des approches plus sensibles et explique le développement plus tardif des approches de criblage dans cette matrice¹³. Dans le cadre des prélèvements post-mortem, le prélèvement sanguin peut s'effectuer à différents endroits du corps plus ou moins exposés aux phénomènes de redistribution post-mortem. En effet, idéalement le sang cardiaque ne devrait pas être utilisé pour estimer la dose absorbée par une personne en raison de ces phénomènes. Les concentrations dans le sang périphérique sont généralement plus représentatives même si elles sont généralement plus importantes que dans le sang issu de prélèvement ante- ou péri-mortem. Idéalement, le prélèvement de sang périphérique s'effectue dans la veine fémorale immédiatement après le décès après une ligature permettant d'éviter toute contamination¹⁴.

Il est important de noter que le gain de sélectivité et de sensibilité lié aux développements récents de la spectrométrie de masse sur lesquels nous reviendrons dans ce chapitre, a contribué à l'émergence des approches de microéchantillonnages¹⁵⁻¹⁷. En effet, la diminution des volumes de matrice biologiques prélevés nécessite d'être compensée par le développement de procédures analytiques très sensibles.

Le microéchantillonnage de sang sur papier buvard ou spots de sang séchés (*Dried Blood Spot* en anglais ou plus communément DBS) permet de s'affranchir d'une bonne partie des problèmes liés à l'utilisation de sang complet présenté ci-dessus¹⁸. La première mention du DBS date de plus de 50 ans par Guthrie et Susie concernant des approches pédiatriques¹⁹. L'avantage premier du DBS est qu'il ne nécessite l'échantillonnage que d'un faible volume de

sang (5-10 μL). Le prélèvement est effectué grâce à une pique au bout du doigt ou du talon, et peut être effectué par un utilisateur ou par le patient lui-même après une formation minimale²⁰. L'adsorption du sang sur le papier et le fait que celui-ci soit séché permet de rendre les analytes moins réactifs et de désactiver la plupart des agents pathogènes, rendant la manipulation du sang moins problématique²¹⁻²². De cette façon le transport et le stockage d'échantillons sanguins se trouvent simplifiés, ce qui permet également de réduire les coûts. Enfin, l'utilisation de solvant organique pour l'extraction des analytes sur DBS permet de se débarrasser des protéines et des lipides qui seront retenus sur le papier buvard rendant ce support de prélèvement intéressant en vue d'une analyse par MS.

2.3. Matrices alternatives

Parmi les matrices alternatives, le prélèvement de salive est le prélèvement le plus décrit dans la littérature, notamment lié à des problématiques MDV, en raison de son échantillonnage peu invasif ne nécessitant pas de supervision médicale²³. Un des principaux avantages de la salive dans le cadre de prélèvements routiers par exemple, est la possibilité d'effectuer des tests de dépistage directement sur site afin d'orienter le policier en charge du contrôle²⁴. Une étude évaluant notamment la prévalence de drogues et de médicaments parmi une population de conducteurs en Suisse romande sur la base de prélèvements salivaires et de prélèvements DBS sera d'ailleurs présentée au Chapitre 4. Cependant, ces tests souffrent d'un manque de sensibilité et de sélectivité ainsi que d'une grande variabilité qui conduisent à un nombre important de faux positifs et de faux négatifs²⁵⁻²⁶. De plus, il est difficile d'interpréter toxicologiquement les résultats d'une analyse salivaire. Plusieurs études ont tenté de démontrer une corrélation systématique entre les concentrations présentes dans la salive, le plasma ou le sang complet²⁷⁻²⁹. Malheureusement, il existe une large inter-individualité en ce qui concerne les rapports de concentration entre les différentes matrices biologiques³⁰. Cette variabilité est également amplifiée par le fait que certaines classes de substances réagissent de façons diverses

dans ce milieu, notamment en raison de leur pharmacocinétique. En effet, la plupart des drogues se trouvent dans la salive grâce à un phénomène de diffusion suivant un gradient de concentrations. Le taux de diffusion des différentes substances entre le plasma et la salive dépendra notamment de ce gradient de concentrations, ainsi que des propriétés physico-chimiques des substances d'intérêts, tel le pH salivaire et le pKa de la substance. Les composés basiques comme les amphétamines sont souvent bien assimilés dans la salive alors que les cannabinoïdes par exemple diffusent mal dans cette matrice³¹.

3. L'analyse toxicologique systématique

Lors d'une analyse toxicologique, l'information *a priori* concernant les substances éventuellement impliquées est généralement très lacunaire. Pour cette raison, la méthode de criblage idéale devrait permettre la détection et l'identification non ambiguë de toutes les substances présentant un intérêt toxicologique et ceci en une seule procédure. Si les développements technologiques permettent de se rapprocher de cette situation, la réalité est pour l'instant plus contrastée. C'est pourquoi, afin de conserver des approches de criblage toxicologique les plus complètes possibles, il convient d'utiliser une succession de procédures analytiques pouvant différer par le mode de préparation d'échantillon, ainsi que par les techniques instrumentales mises en place³². Ces méthodes complémentaires serviront à apporter des preuves concordantes permettant de confirmer ou d'infirmer la consommation d'une ou plusieurs substances³³. Cette première phase d'analyses de criblage comprend généralement 2 étapes (Figure 1-1). La première a pour objectif de trouver des indices liés à la présence de composés d'intérêt dans les échantillons biologiques à disposition. Cependant, durant cette première étape, il n'est pas nécessaire d'obtenir une identification absolue des substances détectées. La 2^{ème} étape permet, quant à elle, d'identifier avec la plus grande certitude possible les substances détectées lors de la première étape. Il s'agira, dès lors, d'utiliser des méthodes relativement performantes.

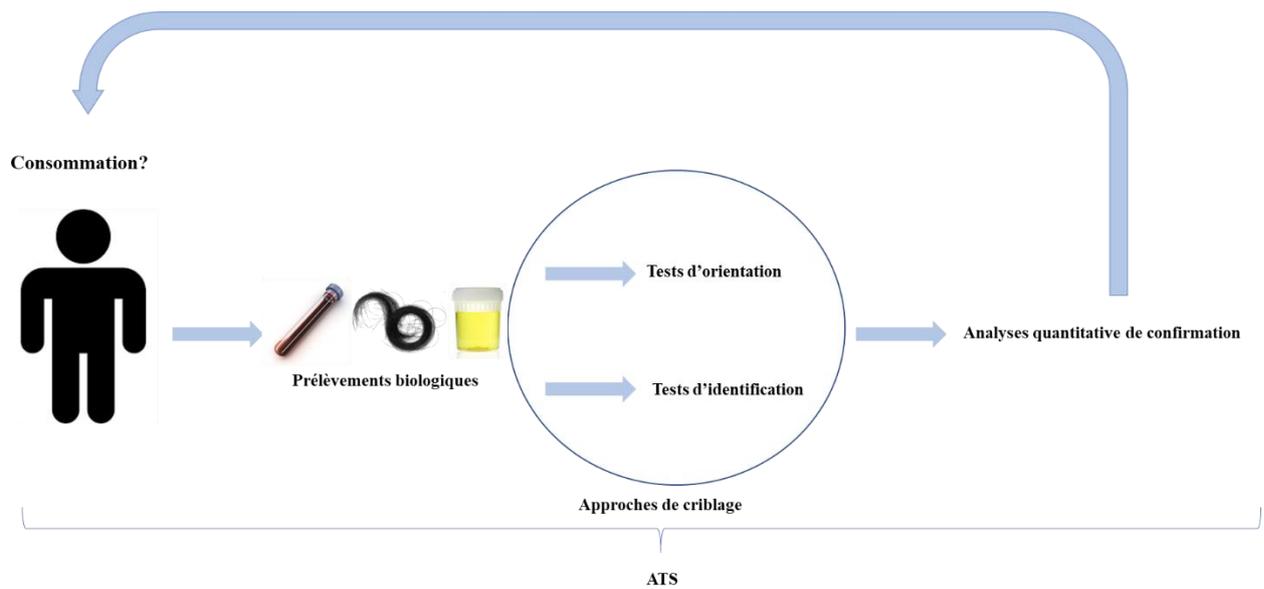


Figure 1-1: Processus d'analyse d'un échantillon en toxicologie forensique

De manière générale, l'objectif de ces étapes doit être atteint sans compromettre les analyses quantitatives qui suivront et qui serviront à l'interprétation toxicologique des cas. En effet, toute détection devra être confirmée dans un 2^{ème} temps à l'aide d'approches quantitatives, nécessitant le déploiement de stratégies analytiques différentes. La combinaison des étapes de criblage et de quantification se définit comme l'ATS. En pratique, la distinction entre les différentes étapes de criblage n'est pas forcément très marquée puisque certains procédés analytiques permettent à la fois de répondre aux besoins de l'étape d'orientation et de l'étape d'identification. Pour cette raison, certains laboratoires renoncent à ces tests d'orientation au profit d'une seule procédure.

Dans le processus d'analyse d'un échantillon en toxicologie forensique, il existe une grande variété de moyens analytiques pouvant être mis en œuvre. Le choix de la stratégie analytique dépendra par la suite de plusieurs facteurs, notamment de la question à laquelle il sera demandé de répondre. En fonction de la demande et des échantillons à disposition, un choix sera effectué concernant la ou les matrices biologiques d'intérêt ce qui influencera également le choix des

stratégies analytiques mises en œuvre. De manière générale, l'analyse en toxicologie médico-légale implique l'utilisation d'un large éventail de techniques analytiques. Celles-ci incluent notamment l'usage de tests immunologiques, ces tests sont basés sur les réactions d'une classe de xénobiotiques d'intérêt avec un anticorps spécifique. Ces tests rapides et sensibles ne demandent quasiment pas de développements puisque les fabricants fournissent des kits de dépistages validés permettant l'identification d'un grand nombre de substances ou de classes de substances. Malheureusement, ces tests s'ils sont efficaces pour l'identification d'une classe de molécule ne sont pas toujours spécifiques pour l'identification de la consommation d'une substance en particulier.

Les approches séparatives par chromatographie sont également extrêmement populaires dans les laboratoires d'analyse. Les techniques chromatographiques sont des approches séparatives basées sur les différences d'affinités des différents analytes présents dans l'échantillon avec une phase stationnaire et une phase mobile. Il existe une grande diversité d'approches chromatographiques qui varient en fonction du choix des phases mobiles et de la phase stationnaire, et de leurs propriétés physico-chimiques. Parmi les approches les plus répandues, la chromatographie en phase gazeuse (GC), en phase liquide (LC) ou encore en phase supercritique (SFC) se distinguent par la nature de la phase mobile et sont des approches de chromatographie sur colonne. Ces approches séparatives sont généralement couplées à diverses méthodes de détection, parmi lesquelles les détecteurs ultra-violet (UV), à ionisation de flamme (FID), ou les spectromètres de masse. Quelle que soit la stratégie adoptée, l'objectif reste de combiner suffisamment d'éléments pour conclure de manière précise et sans équivoque sur la consommation ou l'absence de consommation de substances présentant un intérêt toxicologique. Les sections suivantes se focaliseront sur la description détaillée de l'utilisation de la chromatographie liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse haute-résolution utilisée lors de ce travail.

3.1.1. La chromatographie liquide

Historiquement, l'invention de la chromatographie est attribuée au botaniste Mikhaïl Tswett, qui reportait la séparation de pigments végétaux sur une colonne remplie de carbonate de calcium en 1903. Par la suite, les techniques chromatographiques n'ont cessé de se développer jusqu'à l'invention de la GC dans les années 50, apportant une alternative puissante aux tests colorimétriques et aux approches de spectrophotométries principalement utilisés jusque-là. La GC, cette technique sélective, a pris et conservé une place importante au sein des laboratoires en raison de son grand pouvoir de séparation. Cependant, la principale contrainte liée à l'utilisation de cette technique réside dans la nécessité de faire passer les analytes à l'état gazeux et donc la limitation de l'analyse à des composés relativement volatils. Pour cette raison, la LC, dont les premières applications ont été décrites à la fin des années 60, a pris petit à petit le pas sur l'approche GC ces 20 dernières années. La capacité d'analyser des composés peu volatils et de hauts poids moléculaires, associé à la grande diversité de phases mobiles et de phases stationnaires commercialisées, font de la LC une technique extrêmement polyvalente. La popularité grandissante du couplage LC-MS, qui en fait la méthode la plus employée pour les analyses biomédicales, est autant liée au progrès de la spectrométrie de masse qu'au progrès des approches de chromatographie liquide. Pour rappel, la LC est une approche séparative basée sur l'affinité des analytes, entre une phase stationnaire contenue dans une colonne et une phase mobile liquide. Le succès de la LC s'explique principalement par sa grande polyvalence. En effet, il est très facile d'adapter le choix des phases mobiles et de la colonne afin de se plier aux besoins spécifiques d'une application. Le choix de la phase stationnaire permettra d'effectuer les analyses sur une phase dite normale ou en phase inverse (RP).

L'approche LC en phase normale est la première à avoir été développée et sert principalement à la séparation de composés polaires. Lors de l'utilisation de ce type de stratégie, la phase stationnaire est souvent composée de silice vierge ou à laquelle sont greffés des groupements

polaires. Logiquement, l'utilisation d'une colonne polaire nécessite en contrepartie l'utilisation de phases mobiles apolaires. L'analyse des composés polaires a été améliorée avec l'apparition de la LC par interactions hydrophiles dans les années 1990 (HILIC). Le principe de cette technique repose sur une séparation des analytes polaires à travers une couche d'eau adsorbée à la surface de la phase stationnaire polaire. Cependant, ces conditions ne sont que peu adaptées à l'analyse de petites molécules apolaires que sont les drogues et les médicaments. Pour cette raison si certaines applications de l'utilisation de colonne HILIC ont été décrites, par exemple pour l'analyse de produits dopants amphétaminiques ou pour l'évaluation de la distribution de la cocaïne et de ses métabolites dans les fluides et les tissus biologiques, ces approches sont peu répandues dans les laboratoires de toxicologie analytique ³⁴⁻³⁵.

La chromatographie en RP, à l'inverse a une place prépondérante (près de 80 % des applications) dans les approches LC destinées aux analyses biomédicales dont font partie les approches toxicologiques. Son nom de phase inverse s'oppose à celui de la chromatographie en phase normale. Il n'est donc pas surprenant que dans son application la phase stationnaire soit apolaire associée à l'utilisation de phases mobiles plutôt polaires. Les phases stationnaires sont généralement constituées de silice ou d'un polymère sur lequel vient se greffer des chaînes alkyles (C4, C8 ou C18 le plus souvent) ou d'autres groupements apolaires tels que les groupes phényles ou cyano.

Selon l'équation de Van Deemter, trois paramètres vont également influencer sur les performances d'une colonne LC, et influencer sur la forme des pics obtenus. Le premier, la diffusion turbulente, est lié à l'anisotropie d'écoulement et dépend de la taille et de la répartition des particules de la phase stationnaire à l'intérieur de la colonne. Le deuxième, la diffusion longitudinale dépendra du débit des phases mobiles. Plus le flux sera rapide, meilleure sera la qualité de la chromatographie, en contrepartie, la contre pression générée sera plus importante. Enfin le troisième paramètre, la résistance au transfert de masse, est lié au transfert des analytes entre la

phase mobile et la phase stationnaire. Les colonnes les plus utilisées sont composées de billes de silice sphériques permettant d'obtenir un remplissage uniforme de la colonne ce qui évitera la formation de chemin préférentiel, et donc un élargissement de pic (Figure 1-2). Le diamètre des particules interne influence également la performance d'une colonne. En effet, plus les particules sont petites, et plus la colonne est longue, plus la surface de contact est importante, ce qui permet d'améliorer le pouvoir séparatif. Cependant l'augmentation de cette surface de contact augmente la contre pression de manière significative. Il s'agit donc de trouver le bon compromis. Sur les instruments LC le diamètre des particules varie habituellement entre 3 et 10 μm et la longueur des colonnes entre 5 et 15 cm³⁶. Le développement de systèmes UHPLC (*ultra high performance liquid chromatography*) pouvant supporter des pressions plus importantes, permet d'augmenter la surface de contact et ainsi d'améliorer la qualité de la séparation chromatographique. Le développement de ces approches permet dès lors l'utilisation de particules de diamètres inférieurs à 2 μm . Le gain apporté par ce genre de système permet soit d'améliorer la qualité de la chromatographie ou de diminuer significativement le temps d'analyse en conservant une bonne séparation³⁷.

Une technologie de particules relativement récente permet d'obtenir des performances comparables aux colonnes composées de particules inférieures à 2 μm , tout en conservant une taille de particule plus importante (2.6 μm), ce qui permet de conserver des pressions compatibles avec les systèmes LC conventionnels³⁸⁻³⁹. Cette technologie, nommée *fused-core* (ou *core-shell*) est basée sur des particules présentant un noyau solide recouvert d'une couche poreuse très fine. Cette géométrie permet d'obtenir une importante surface de contact tout en réduisant la résistance à l'écoulement (Figure 1-2). L'ensemble des approches développées lors de ce travail impliquant l'usage de la chromatographie ont été réalisées avec l'utilisation de colonne RP C18 possédant des particules de type core-shell d'une taille de 2.6 μm .

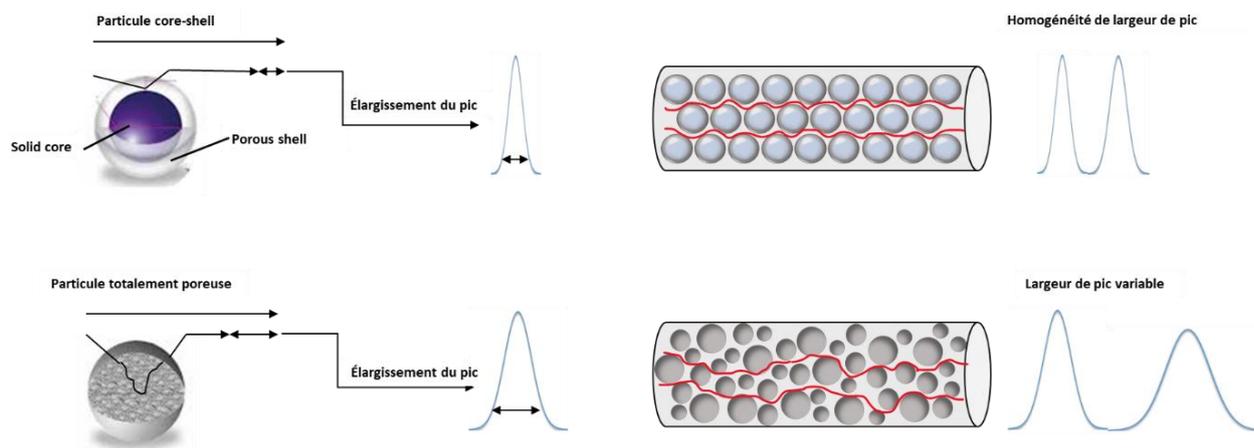


Figure 1-2 : Apport de la technologie de particule core-shell pour le remplissage des colonnes RP en LC

Le choix des phases mobiles utilisées dépendra notamment des phases stationnaires sélectionnées. Celles-ci se composent habituellement d'une phase organique (habituellement de l'ACN ou du MeOH), et d'une phase aqueuse à laquelle peut être ajouté de l'acide formique pour faciliter le processus d'ionisation. L'ajout d'un tampon ajustant le pH peut être utilisé afin de rendre l'analyse plus spécifique en fonction de pKa des analytes d'intérêt. La séparation des différents analytes peut être optimisée et précisément ajustée en faisant varier les proportions des phases mobiles. Lors d'une analyse classique en RP, un fort pourcentage de phase aqueuse, permet, par exemple, de focaliser les analytes. Pour les approches de criblage qui nécessitent la séparation de diverses substances aux propriétés physico-chimiques variées, un gradient complet sera utilisé. Une fois les diverses substances séparées, ce qui permet d'améliorer la sélectivité de l'analyse, il est nécessaire d'ajouter une étape d'identification des molécules d'intérêts. Dans ce but, le pouvoir séparatif de la LC a été couplé au pouvoir de détection et d'identification de la MS, permettant ainsi, de répondre à la plupart des besoins de la toxicologie analytique.

3.1.2. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS), comme son nom l'indique, est une méthode de caractérisation des analytes basée sur la détermination des masses atomiques ou moléculaires. Cette technique

permet l'identification et la caractérisation des molécules dans un mélange complexe, mais également leur quantification.

Les développements précédant le premier spectromètre de masse datent de 1886 avec les travaux de Goldstein qui découvre un moyen de former des ions positifs en phase gazeuse⁴⁰. Par la suite les découvertes de Millikan et Fletcher portant sur l'électron ainsi que les travaux concernant le rayonnement anodiques et cathodiques par Wien et Kaufmann conduisent au premier spectromètre de masse construit par Thompson en 1913⁴¹⁻⁴³.

Quelques dates clés sont également à mentionner concernant le développement de certaines approches MS qui seront utilisées dans ce travail. Les méthodes analytiques, et plus particulièrement la spectrométrie de masse sont en constante évolution. Cet historique part des prémices de la MS pour nous amener à la spectrométrie de masse haute-résolution (HRMS) avec l'introduction de l'Orbitrap par Makarov⁴⁴.

En 1918, Dempster développe la source d'ionisation à impact électronique qui reste encore aujourd'hui la source la plus utilisée sur les instruments MS couplés à la GC⁴⁵. En 1948 est publié, par Cameron et Eggers, le plan du premier spectromètre de masse à temps de vol (*time of flight* ou TOF) basé sur les travaux de Stephens publiés en 1946⁴⁶⁻⁴⁷. Le premier instrument de ce type sera commercialisé en 1958. En 1953 est déposé un brevet concernant la trappe d'ion et l'analyseur quadripolaire, ce dernier sera décrit en détails en 1958 et commercialisé en 1968. Il amènera également à l'attribution d'un prix Nobel de physique à Paul et Dehmelt en 1989. Ces analyseurs restent parmi les plus largement utilisés dans la communauté. En 1956, Beynon démontre l'intérêt analytique de la spectrométrie de masse haute-résolution et la plus-value d'une détermination exacte de la masse pour la caractérisation élémentaire des ions⁴⁸. La même année apparaît également les premiers GC couplés à la MS développés par McLafferty et Gohlke⁴⁹⁻⁵⁰. Ce même McLafferty introduit la dissociation induite par collision (CID) avec l'aide de Jennings qui est une méthode de fragmentation extrêmement répandue encore

aujourd'hui, permettant l'identification d'un composé⁵¹⁻⁵². L'année 1974 voit apparaître les premiers couplage LC-MS mis au point par Arpino, Baldwin et McLafferty⁵³. En 1987, deux groupes de recherche, dont celui de Tanaka, développent la désorption/ionisation laser assistée d'une matrice (MALDI) qui permettra à Tanaka d'obtenir le prix Nobel de chimie en 2002⁵⁴⁻⁵⁵. Le concept de la source d'ionisation par électrospray (ESI) proposé en 1968 sera repris et développé en 1988 par Fenn⁵⁶. Cette technique d'ionisation est, aujourd'hui encore, la plus utilisée en ce qui concerne le couplage LC-MS. Enfin, en 1999, Makarov met au point un nouveau type d'analyseur de masse qu'il baptise Orbitrap⁴⁴. Ce type d'analyseur de masse est aujourd'hui une référence concernant la spectrométrie de masse haute-résolution (HRMS) et les applications décrites dans cette thèse ont été développées sur des instruments basés sur cette technologie. Tous ces développements ont conduit la MS à prendre une place prédominante dans les laboratoires de chimie analytique, les laboratoires de toxicologie n'échappant pas à la règle.

Le principe de la spectrométrie de masse est basé sur l'analyse de composés sous forme ionique. Les analytes présents dans un mélange seront ensuite caractérisés par le rapport entre leur masse (m) et leur état de charge (z), on parlera alors de rapport m/z . Les espèces chargées sont ensuite soumises sous vide, à l'action d'un champ électrique ou magnétique. Divers processus de détection sont impliqués en fonction des différents types d'analyseurs de masse, mais dans tous les cas c'est le rapport m/z qui sera mesuré. Un instrument de MS est généralement composé de 3 parties principales, à savoir une source d'ionisation, un analyseur de masse, ainsi qu'un détecteur.

Puisque l'analyse MS ne peut s'accomplir qu'en présence d'espèces ioniques, la première partie de ces instruments est une source d'ionisation. Le choix de la source d'ionisation est intimement lié à la stratégie analytique souhaitée. Une fois les analytes sous forme ioniques, ceux-ci sont focalisés et accélérés par des lentilles électroniques, afin d'accroître leur énergie cinétique.

La 2^{ème} partie d'un instrument MS est un analyseur de masse qui va permettre de filtrer les ions en fonction de leur rapport m/z . Certains instruments possèdent plusieurs analyseurs de masse qui permettront de réaliser diverses expériences, notamment de fragmenter les molécules d'intérêt à des endroits spécifiques à leur structure et d'analyser ces fragments dans un but d'identification d'un composé, on parlera alors de spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS.

Enfin, les ions atteignent un détecteur, parfois un autre analyseur de masse, qui permet d'établir un signal proportionnel au nombre d'ions incidents.

La diversité des approches MS repose sur le choix de la source d'ionisation mais également et principalement sur le statut du détecteur (qui seront présentés dans les sections suivantes).

Il existe différents facteurs de performance associés à une méthode analytique donnée. En toxicologie analytique et de manière générale lorsqu'il s'agit d'analyser un mélange inconnu, il est nécessaire d'être conscient de la sensibilité de la méthode. Le terme de sensibilité se rapporte à la concentration minimale à laquelle il est possible de détecter ou d'identifier une substance (on parlera alors de limite de détection ou LOD, et de limite d'identification ou LOI) et celle à laquelle il est possible de la quantifier (on parlera ici de limite basse de quantification ou LLOQ). Il s'agit également d'être capable de détecter et d'identifier un composé en particulier en le distinguant des autres composés d'intérêt et des éventuels interférents dans un mélange complexe, on parlera alors de sélectivité.

S'il existe une multitude d'organisations et de sociétés analytiques proposant des recommandations pour la validation de méthode analytique⁵⁷⁻⁵⁸, notamment les approches quantitatives (Chapitre 3), la sensibilité et la sélectivité sont les paramètres pour lesquels la spectrométrie de masse apporte une réelle plus-value vis-à-vis d'autres approches de détection

souvent associée à la chromatographie, le FID (détecteur à ionisation de flamme) ou des méthodes spectroscopiques comme l'UV (ultra-violet) par exemple.

Les concentrations rencontrées dans les échantillons en toxicologie forensique peuvent être extrêmement diverses. Cette diversité de gammes de concentration en fonction des substances se retrouve notamment dans la visualisation des seuils légaux⁹ et des gammes thérapeutiques¹⁰ déterminées dans le sang (Tableau 1-1). En raison notamment de celle-ci, qui sera également dépendante de la matrice biologique choisie, et de la préparation d'échantillon, il est extrêmement délicat de détecter la totalité des composés d'intérêt possédant des propriétés physico-chimiques diverses avec une sensibilité suffisante en une seule procédure. Il est donc nécessaire d'être conscient des paramètres associés à la mesure de la sensibilité d'une méthode développée afin d'éviter le rendu de faux négatifs.

Substance	Therapeutic range/ Legal threshold (ng/ml)
4-CMC	1-75
Amitryptiline	50-300
Amphetamine	15
Carbamazepine	2000-8000
Citalopram	50-110
Cocaine	15
Codeine	30-250
Diazepam	100-2000
Flubromazolam	0.0005-0.1
Fluoxetine	120-500
Gabapentin	50-600
Haloperidol	5-17
Ketamine	1000-6000
MDMA	15
Methadone	100-500
Methamphetamine	15
Mianserin	15-70
Midazolam	40-100
Morphine	15 (free form)
Quetiapine	100-500
Risperidone	6-20
THC	1.5
Trimipramine	10-30
Zolpidem	80-150

Tableau 1-1: Seuils légaux et gammes thérapeutiques pour certaines drogues et certains médicaments fréquemment analysés ainsi que les gammes de concentration observée pour des cas de toxicologie comportementale pour une cathinone (4-CMC)⁵⁹ et une benzodiazépine de synthèse (Flubromazolam)⁶⁰

La sélectivité d'une méthode se définit comme sa capacité à mesurer de façon non-ambigüe un analyte et à le différencier des interférences potentielles. Si on se penche sur cette définition, il apparaît clairement qu'elle est intimement liée aux notions de LOD et LOI. En pratique, la sélectivité est déterminée en utilisant plusieurs échantillons blancs de la matrice choisie et en y ajoutant les substances d'intérêt. De cette façon, la présence de composés potentiellement interférents peut être investiguée.

3.1.3. Interfaçage LC-MS grâce à l'ionisation par electrospray

Comme mentionné, la spectrométrie de masse permet l'analyse de substances sous forme chargée. La première étape d'un MS doit donc permettre la formation de ces espèces chargées pour permettre leur détection. Il existe bon nombre d'approches permettant la formation de ces ions, le choix de celles-ci dépendra notamment du couplage avec une approche chromatographique (GC ou LC principalement). Le couplage GC-MS n'ayant pas été utilisé lors de ce projet, cette technique, bien qu'encore très répandue, ne sera pas détaillée par la suite.

D'un autre côté, le couplage LC-MS est moins évident que le couplage GC-MS, puisque l'étape d'ionisation nécessite le passage des analytes de l'état liquide à l'état gazeux, avant l'entrée dans le spectromètre de masse fonctionnant sous vide poussé. Le gain de popularité des approches LC ces dernières décennies est principalement associé aux développements des sources d'ionisation à pression atmosphérique (API) facilitant ainsi le couplage LC-MS. Parmi les sources d'ionisation API, les sources electrospray (ESI) sont largement les plus utilisées dans les approches LC-MS.

L'avantage de cette stratégie pour les approches de criblage réside principalement en deux points. Premièrement, il s'agit d'une méthode d'ionisation dite douce, à savoir que les ions ne seront pas fragmentés lors de l'étape d'ionisation. En MS, la présence de sels dans les échantillons peut mener à la formation d'adduits avec les molécules d'intérêt menant ainsi à des effets de suppression d'ions. Si la formation d'adduits peut être contrôlée pour améliorer

l'ionisation grâce à l'ajout approprié d'additif dans les phases mobiles, on travaillera donc préférentiellement avec des espèces pseudo-moléculaires soit positivement chargées $[M+nH]^{n+}$, ou négativement chargées $[M-nH]^{n-}$ par protonation ou déprotonation. Deuxièmement, en ce qui concerne les petites molécules telles que les drogues ou les médicaments, cette approche d'ionisation permettra de produire très majoritairement des espèces monochargées ce qui facilitera l'identification basée sur le rapport m/z en simplifiant le spectre de masse, en particulier lors de l'analyse de mélanges complexes, et donnera un accès direct à la masse exacte de l'ion ciblé.

Le principe de l'ESI (Figure 1-3) repose sur l'application d'une forte différence de potentiel à travers un capillaire métallique entre la sortie de la LC et l'entrée du MS. L'application de ce potentiel entre le capillaire et une contre-électrode permet de générer un champ électrique et ainsi une accumulation de charge à la surface du liquide situé à l'extrémité du capillaire métallique formant ainsi un cône dit de Taylor⁴¹. Lorsque la répulsion entre les charges devient plus importante que la tension de surface, celle-ci se rompt temporairement formant un spray de gouttelettes fortement chargées⁶¹⁻⁶³. L'effet de la chaleur et d'un flux d'azote va conduire à l'évaporation partiel du solvant dans ces gouttelettes tout en conservant leur nombre de charges. La taille des gouttelettes va ainsi diminuer jusqu'à atteindre la limite de stabilité de Rayleigh, point où les répulsions électrostatiques sont égales à la tension de surface. Le dépassement de cette limite mène une fission coulombienne générant des gouttelettes plus petites, ce schéma va ensuite se répéter jusqu'à l'obtention d'ions complètement désolvatés⁶⁴.

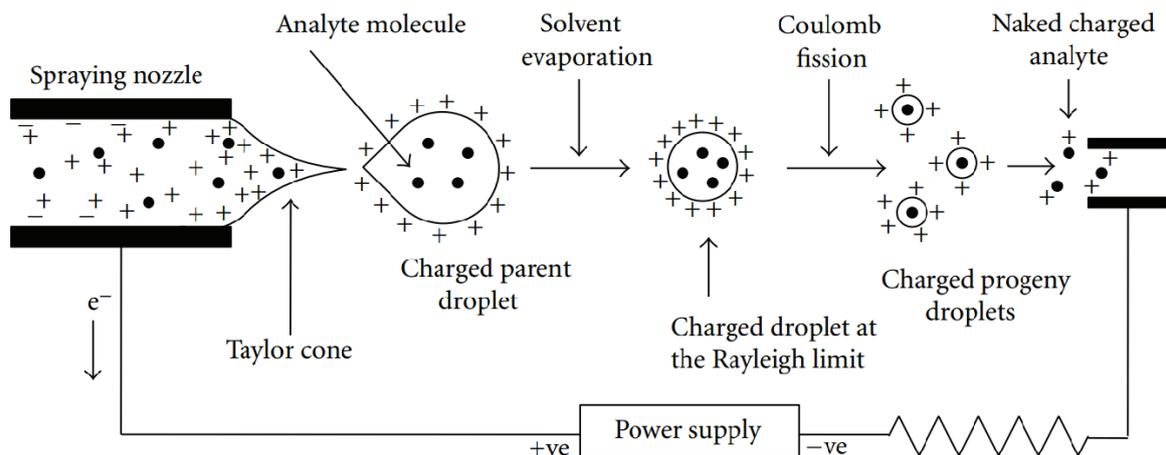


Figure 1-3 :Représentation schématique du processus d'ionisation par electrospray⁶⁵

Cette approche présente néanmoins certains désavantages. En effet, un débit des phases mobiles augmente la taille des gouttelettes ce qui diminue l'efficacité de l'ionisation, en particulier lors de l'utilisation de phases mobiles peu volatiles. Dans ce cas, l'évaporation du solvant se fait parfois de manière incomplète ce qui limite le nombre d'ions atteignant l'entrée du MS. Pour pallier ce problème, un flux de gaz de nébulisation chauffé va venir assister l'ionisation afin de faciliter l'évaporation du solvant. L'ESI est également très sensible à la présence de particules non volatiles. Dans les matrices complexes, telles que les fluides biologiques, la présence de sels et autres interférents peut conduire à des effets de suppression ou d'augmentation d'ions⁶⁶. Ces effets de matrice peuvent influencer considérablement la détection et par conséquent la sensibilité d'une approche basée sur l'ESI, c'est pourquoi il est courant d'évaluer ces effets de matrice dans les approches de validation de méthode (Chapitre 3). Une fois les ions formés, ceux-ci vont pouvoir être analysés par MS.

3.1.4. Apports de la spectrométrie de masse haute-résolution

Les développements de la spectrométrie de masse ont mené à un gain important de performance. Parmi ces développements, l'avènement de la spectrométrie de masse à haute résolution pour des instruments de routine au milieu des années 2010 ont ouvert de nouvelles

opportunités en analyse biologique médicale. Les spectromètres de masse haute-résolution se caractérisent en effet par leur capacité à séparer deux pics de masse proche (on parlera alors de résolution), ainsi qu'à mesurer la masse exacte d'un composé de façon extrêmement précise (précision inférieure à 0,001 Daltons). Cette précision permettra notamment la détermination de la composition élémentaire d'un ion.

La résolution spectrale en MS se calcule soit pour un pic seul, soit pour deux pics adjacents. En pratique la formule reste la même puisqu'il s'agit d'un rapport entre la masse mesurée (m) et une différence de masse (Δm). Pour un pic seul, le delta de masse est lié à la largeur du pic et se calcule à 50 % de la hauteur de celui-ci (Figure 1-4). Pour deux pics adjacents d'une hauteur proche, la même formule est appliquée où m est la masse du 2^{ème} pic, et Δm est la différence de masse mesurée entre les deux pics, il convient néanmoins de définir à quel pourcentage de leur hauteur les deux pics se recouvrent.

La précision sur la masse se calcule habituellement en partie par million (ppm) en divisant la différence entre la masse obtenue pour un composé avec sa masse exacte théorique (Δm) par la masse exacte du pic (m) multiplié par un million. Les spectromètres de masse haute-résolution permettent d'obtenir des précisions inférieures à 5 ppm. Le gain de précision sur le rapport m/z apporté par l'HRMS permet de faciliter l'identification d'une substance inconnue en diminuant le nombre de formules chimiques possibles⁶⁷.

La figure 1-4 illustre le gain de capacité d'identification apporté par l'utilisation d'une méthode HRMS et présente les formules associées à la définition de la résolution.

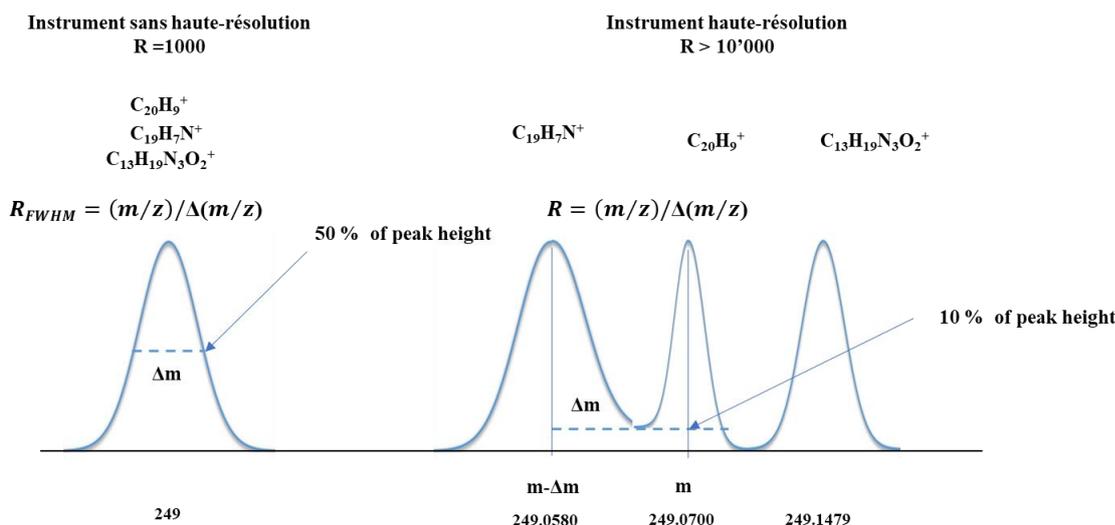


Figure 1-4 : Comparaison d'un spectre de masse en absence et en présence de l'apport de la haute-résolution. La résolution se calcule différemment pour un pic isolé ou lorsqu'on considère deux pics voisins.

Il existe différents types de spectromètres de masse haute-résolution, parmi lesquels les analyseurs temps de vol (TOF), les analyseurs Orbitrap et les analyseurs à résonance cyclonique ionique (FTICR). L'Orbitrap permet notamment d'obtenir une résolution spectrale allant jusqu'à 500'000 en routine, et une précision sur la masse inférieure à 1 ppm. L'utilisation de ces instruments permet également d'obtenir une amélioration de la sélectivité pour les approches ciblées en séparant le signal des molécules d'intérêt, du signal lié au bruit de fond grâce à la précision de masse obtenue⁶⁸. Ce gain de sélectivité induit également indirectement un gain de sensibilité. Maintenant que les avantages liés à cette technologie ont été décrits, le fonctionnement des analyseurs de masses haute-résolution les plus utilisés en toxicologie analytique seront décrits dans les sections suivantes.

3.1.5. Analyseurs de masse à haute résolution

Une fois les analytes ionisés, ceux-ci seront dirigés vers un ou plusieurs analyseurs de masse. Il existe bon nombre de ces analyseurs qui varient par leur géométrie et le principe physique employé. Ces diverses approches auront des vitesses d'acquisition, des gammes d'analyses, des modes d'acquisition ainsi que des résolutions différentes. Pour rappel, les sources d'ionisation

à pression atmosphérique utilisées lors du couplage LC-MS vont permettre le plus souvent d'obtenir des ions pseudo-moléculaires. Cet aspect est crucial dans les approches de criblage puisqu'il simplifiera la mise au point de processus MS/MS et augmentera la capacité d'identification de l'approche. Parmi les analyseurs de masse haute-résolution, deux types d'instruments se sont particulièrement démocratisés dans les laboratoires de routine, à savoir les analyseurs temps de vol (TOF, *time of flight*) et les Orbitraps. Ces deux types d'analyseurs seront décrit en détails dans les sections suivantes.

3.1.5.1. Analyseurs TOF

Les analyseurs TOF sont, comme leurs noms l'indiquent, basés sur la mesure du temps de vol des molécules dans un système dédié. Cette technique, bien que non utilisée durant cette thèse, est très largement utilisée, en particulier pour des approches de criblage. Il est donc normal de lui attribuer une attention particulière dans ce manuscrit.

En pratique, les ions sont soumis à une différence de potentiel leur conférant une énergie cinétique. Les ions entrent ensuite dans un tube avec une énergie proportionnelle à leur masse (m/z) et à leur vitesse au carré ($E_{\text{cin}}=1/2mv^2$). Tous les ions entrant dans le tube possèdent la même énergie cinétique, leur vitesse, et donc la distance parcourue dans le tube (leur temps de vol) permet donc directement de calculer le rapport m/z . Pour améliorer la séparation entre 2 masses et ainsi augmenter la résolution spectrale, il faut allonger le temps de vol, pour ce faire, il existe deux possibilités. La première consiste à diminuer la vitesse des ions, ce qui équivaut à une réduction de l'énergie cinétique et ainsi une augmentation du temps de vol. Toutefois, cette perte d'énergie cinétique aura pour conséquence de diminuer la sensibilité de la mesure et n'est donc pas retenue. L'autre stratégie consiste à augmenter la distance de vol. Le tube peut être allongé mais il en résulte une perte d'ions liée à la dispersion. L'alternative est d'utiliser des sortes de miroirs électrostatiques (réflectrons), pour doubler, tripler, voire quadrupler le temps de vol. Ces réflectrons, grâce à une différence de potentiel, permettent de focaliser les

ions et de limiter ainsi la dispersion de l'énergie cinétique (Figure 1-5). L'utilisation de ces miroirs limite la gamme de masse des composés analysables à des masses inférieures à 4000-5000 Daltons. Une autre stratégie, l'extraction retardée, consiste à appliquer une 2^{ème} impulsion avec un temps retard pour que l'ensemble des ions d'intérêt arrivent simultanément au détecteur. En effet, si on applique une seule impulsion, les ions les plus éloignés du détecteur vont rester plus longtemps dans la zone d'accélération et en sortir plus tard mais avec une énergie cinétique plus importante. Dans le cadre d'une utilisation d'une source d'ionisation continue, telle l'ESI, les ions arrivent avec une certaine vitesse dans l'analyseur. Afin de focaliser les ions, une faible pression d'un gaz inerte est appliquée. Les ions sont ensuite projetés de manière orthogonale et pulsée à leur trajectoire de départ, où ils effectueront leur vol.

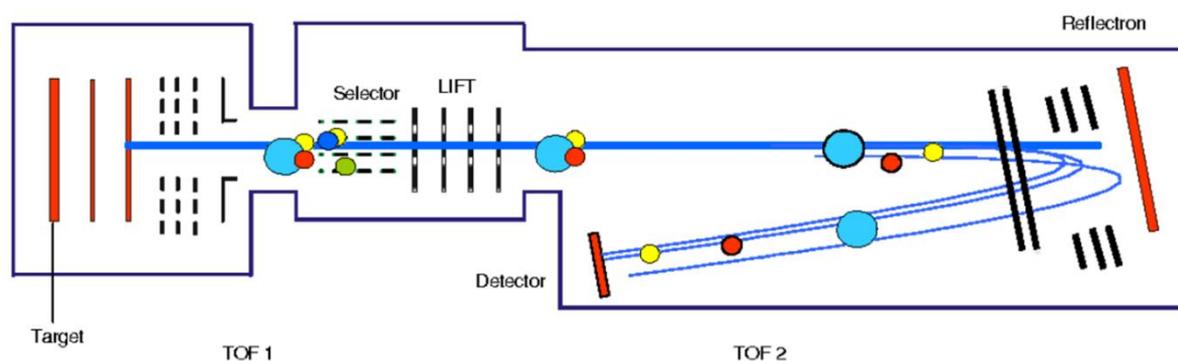


Figure 1-5 : Représentation schématique du fonctionnement d'un analyseur de masse TOF⁶⁹

Les TOF sont des analyseurs de masse avec une très grande vitesse d'acquisition et qui permettent d'obtenir une haute résolution spectrale (de l'ordre de 40'000). De ce fait, de nombreuses applications d'approches de criblage ont été décrites dans la littérature⁷⁰⁻⁷¹. Le TOF présente néanmoins un inconvénient majeur, notamment en termes de stabilité et de sensibilité. En effet, ces d'analyseurs sont très sensibles au changement des conditions opératoires, notamment la température. C'est pourquoi, afin de garantir des résultats précis et justes, il est nécessaire d'infuser régulièrement un étalon au cours des analyses. Comme pour les autres

approches, le TOF peut être couplé avec d'autres types d'analyseurs de masse afin notamment de réaliser des expériences MS/MS.

3.1.5.2. Orbitrap

L'Orbitrap est une trappe électrostatique inventée par Alexander Makarov et décrite pour la première fois en 1999^{44, 72}. L'Orbitrap est un analyseur à transformée de Fourier. Sa configuration se compose d'une électrode externe et d'une électrode centrale (Figure 1-6). L'effet d'un champ électrostatique entre les deux électrodes permet de piéger les ions à l'intérieur de l'électrode extérieure. Ces ions sont en mouvement autour de l'électrode centrale et possèdent des trajectoires et des fréquences d'oscillation et de rotation propre à leur rapport m/z . Les appareils Orbitrap contiennent généralement une trappe d'ions (C-Trap) qui permet d'accumuler les ions et de les introduire de manière pulsée dans l'Orbitrap ou dans une chambre de collision pour les étapes de fragmentation. L'utilisation de trappes par définition permet de sélectionner le temps d'analyse. Plus celui-ci sera long, plus la résolution spectrale pourra être élevée. Ces analyseurs à transformée de Fourier permettent d'obtenir des résolutions jusqu'à 500'000 en routine ce qui présente un avantage certain pour l'identification de molécules.

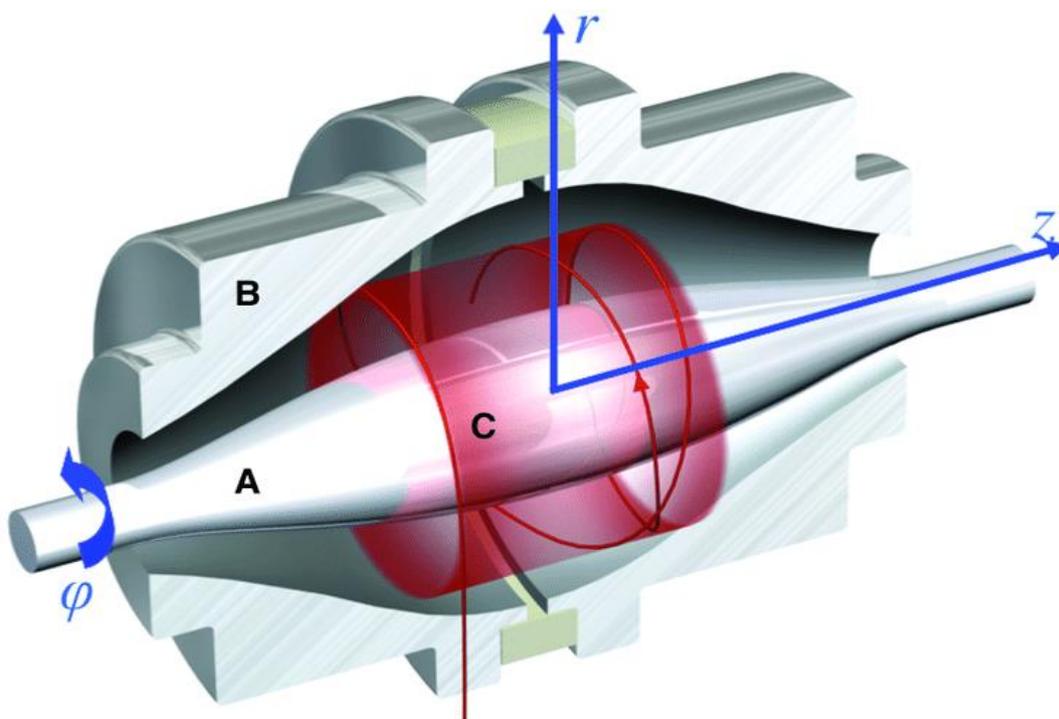


Figure 1-6 : Représentation des trajectoires des ions autour de l'électrode centrale dans une Orbitrap (A), ainsi que structure de celle-ci avec l'électrode extérieur (B), ainsi qu'un anneau de céramique reliant les deux parties de cette électrode (C)⁷³

L'Orbitrap permet d'obtenir une grande robustesse dans la détermination de la masse exacte (avec une précision d'1 ppm) combinée à la haute-résolution spectrale. En contrepartie, sa vitesse d'acquisition est relativement faible comparé au TOF. Depuis sa première commercialisation en 2005 couplé à une trappe d'ion linéaire (LTQ Orbitrap), les instruments hybrides basés sur la technologie Orbitrap n'ont cessé de se développer. L'utilisation d'instruments hybrides permet de coupler les avantages de plusieurs analyseurs au sein d'un même instrument. Dans le cas d'un système LTQ-Orbitrap, il est ainsi possible de fragmenter les molécules au moyen de la trappe linéaire pour réaliser des analyses MS/MS, tout en permettant de bénéficier de l'analyse à haute résolution des substances d'intérêt au moyen de l'analyseur Orbitrap. Dans ces instruments une trappe d'ions linéaire incurvée en forme de « C » appelée « C-trap » est placée juste avant l'analyseur HRMS. Les ions produits en continu par la source ESI vont être transférés puis piégés dans cette trappe. Celle-ci va permettre d'accumuler les ions avant leur injection, de façon discontinue dans l'Orbitrap. Si la popularité

de ces instruments est principalement liée à leurs capacités pour l'analyse qualitative, des analyses quantitatives rapides et sensibles sont également possible. L'utilisation de l'*automatic gain control* (AGC) notamment, un procédé durant lequel un court « présacan » est effectué dans la trappe d'ion permet d'assurer une précision dans la quantification et une bonne gamme dynamique. Ce procédé permet de d'emmagasiner une nombre cible d'ions dans la trappe permettant d'assurer une bonne sensibilité. Afin d'augmenter la sensibilité des analyses et la quantité d'information structurale obtenue, l'amélioration de la C-trap et l'implémentation d'une cellule de fragmentation HCD (*higher energy collision-induced dissociation*) ont menés aux instruments de type QExactive où la trappe d'ions linéaire est remplacée par un analyseur quadripolaire (Figure 1-7). Les approches présentées au cours de ce travail ont d'ailleurs toutes été réalisées sur ce type d'instrument hybride. Par la suite, les appareils ont continué d'évoluer avec pour but d'améliorer la sensibilité et d'accélérer la vitesse d'acquisition tout en améliorant encore la résolution spectrale. Les nouvelles générations d'instruments comme le Q Exactive HF (pour *High Field*®) ou Orbitrap Fusion® (Thermo scientific) permettent d'aller dans ce sens, en permettant, par exemple, une acquisition en *full-scan* dans l'Orbitrap pendant qu'une expérience de fragmentation est réalisée en quasi-simultanée dans la trappe d'ion permettant de réduire le nombre de cycles d'acquisition.

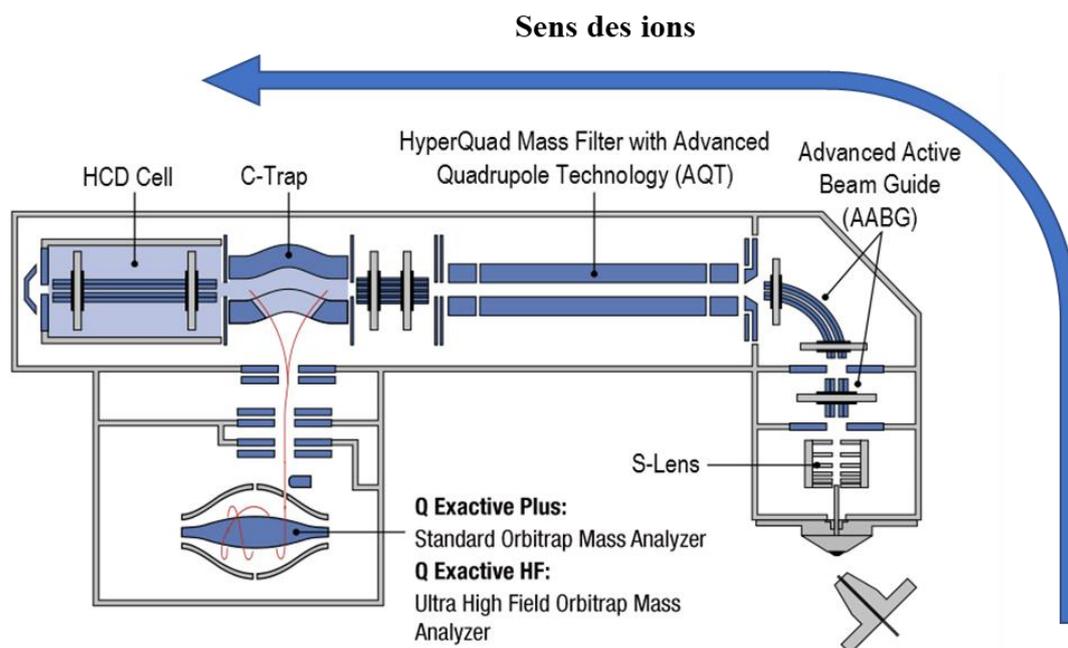


Figure 1-7 : Représentation du spectromètre hybride QExactive™

4. Conclusions du chapitre

Cette première partie a pour but de définir de façon générale le processus et les diverses étapes analytiques liées à la toxicologie forensique. Cette partie a également permis de poser les bases des outils nécessaires à la résolution d'un cas de toxicologie comportementale ou post-mortem. Il était également important de définir dans quel cadre vient s'inscrire l'utilisation de la spectrométrie de masse haute-résolution qui sera le fil conducteur de la suite de cette thèse. Celle-ci se focalisera sur le développement et les applications de diverses approches de criblages et de quantification pour lesquelles la spectrométrie de masse apporte une réelle plus-value.

5. Références du chapitre

1. Villain, M.; Cirimele, V.; Kintz, P., Hair analysis in toxicology. *Clin Chem Lab Med* **2004**, *42* (11), 1265-72.
2. Cuypers, E.; Flanagan, R. J., The interpretation of hair analysis for drugs and drug metabolites. *Clin Toxicol (Phila)* **2018**, *56* (2), 90-100.
3. Kowalczyk, L.; Matet, A.; Dor, M.; Bararpour, N.; Daruich, A.; Dirani, A.; Behar-Cohen, F.; Thomas, A.; Turck, N., Proteome and Metabolome of Subretinal Fluid in Central Serous Chorioretinopathy and Rhegmatogenous Retinal Detachment: A Pilot Case Study. *Transl Vis Sci Technol* **2018**, *7* (1), 3.
4. Samyn, N.; De Boeck, G.; Wood, M.; Lamers, C. T.; De Waard, D.; Brookhuis, K. A.; Verstraete, A. G.; Riedel, W. J., Plasma, oral fluid and sweat wipe ecstasy concentrations in controlled and real life conditions. *Forensic Sci Int* **2002**, *128* (1-2), 90-7.
5. Brockbals, L.; Staeheli, S. N.; Gascho, D.; Ebert, L. C.; Kraemer, T.; Steuer, A. E., Time-Dependent Postmortem Redistribution of Opioids in Blood and Alternative Matrices. *J Anal Toxicol* **2018**, *42* (6), 365-374.
6. Hammett-Stabler, C. A.; Pesce, A. J.; Cannon, D. J., Urine drug screening in the medical setting. *Clin Chim Acta* **2002**, *315* (1-2), 125-35.
7. Feng, S.; Enders, J. R.; Cummings, O. T.; Strickland, E. C.; McIntire, T.; McIntire, G., A Dilute and Shoot LC-MS/MS Method for Antipsychotics in Urine. *J Anal Toxicol* **2019**.
8. Kong, T. Y.; Kim, J. H.; Kim, J. Y.; In, M. K.; Choi, K. H.; Kim, H. S.; Lee, H. S., Rapid analysis of drugs of abuse and their metabolites in human urine using dilute and shoot liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Arch Pharm Res* **2017**, *40* (2), 180-196.
9. Ordonnance de l'OFROU concernant l'ordonnance sur le contrôle de la circulation routière. **2008**, *art. 34*.

10. Schulz, M.; Iwersen-Bergmann, S.; Andresen, H.; Schmoldt, A., Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Crit Care* **2012**, *16* (4), R136.
11. Freeman, J. D.; Rosman, L. M.; Ratcliff, J. D.; Strickland, P. T.; Graham, D. R.; Silbergeld, E. K., State of the Science in Dried Blood Spots. *Clin Chem* **2018**, *64* (4), 656-679.
12. Stove, C. P.; Ingels, A. S.; De Kesel, P. M.; Lambert, W. E., Dried blood spots in toxicology: from the cradle to the grave? *Crit Rev Toxicol* **2012**, *42* (3), 230-43.
13. Lillsunde, P.; Michelson, L.; Forsstrom, T.; Korte, T.; Schultz, E.; Ariniemi, K.; Portman, M.; Sihvonen, M. L.; Seppala, T., Comprehensive drug screening in blood for detecting abused drugs or drugs potentially hazardous for traffic safety. *Forensic Sci Int* **1996**, *77* (3), 191-210.
14. Pelissier-Alicot, A.-L.; Gaulier, J.-M.; Champsaur, P.; Marquet, P., Mécanismes de la redistribution post-mortem des xénobiotiques: le point sur l'état actuel des connaissances. *Annales de Toxicologie Analytique* **2001**, *13* (1), 1-17.
15. Michely, J. A.; Meyer, M. R.; Maurer, H. H., Power of Orbitrap-based LC-high resolution-MS/MS for comprehensive drug testing in urine with or without conjugate cleavage or using dried urine spots after on-spot cleavage in comparison to established LC-MSn or GC-MS procedures. *Drug Test Anal* **2017**.
16. Helfer, A. G.; Michely, J. A.; Weber, A. A.; Meyer, M. R.; Maurer, H. H., Orbitrap technology for comprehensive metabolite-based liquid chromatographic-high resolution-tandem mass spectrometric urine drug screening - exemplified for cardiovascular drugs. *Anal Chim Acta* **2015**, *891*, 221-33.
17. Thomas, A.; Geyer, H.; Schanzer, W.; Crone, C.; Kellmann, M.; Moehring, T.; Thevis, M., Sensitive determination of prohibited drugs in dried blood spots (DBS) for doping

- controls by means of a benchtop quadrupole/Orbitrap mass spectrometer. *Anal Bioanal Chem* **2012**, *403* (5), 1279-89.
18. Bosilkovska, M.; Samer, C.; Deglon, J.; Thomas, A.; Walder, B.; Desmeules, J.; Daali, Y., Evaluation of Mutual Drug-Drug Interaction within Geneva Cocktail for Cytochrome P450 Phenotyping using Innovative Dried Blood Sampling Method. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **2016**, *119* (3), 284-90.
 19. Guthrie, R.; Susi, A., A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants. *Pediatrics* **1963**, *32*, 338-43.
 20. Deglon, J.; Versace, F.; Lauer, E.; Widmer, C.; Mangin, P.; Thomas, A.; Staub, C., Rapid LC-MS/MS quantification of the major benzodiazepines and their metabolites on dried blood spots using a simple and cost-effective sample pretreatment. *Bioanalysis* **2012**, *4* (11), 1337-50.
 21. Wagner, M.; Tonoli, D.; Varesio, E.; Hopfgartner, G., The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. *Mass Spectrom Rev* **2016**, *35* (3), 361-438.
 22. Parker, S. P.; Cubitt, W. D., The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. *J Clin Pathol* **1999**, *52* (9), 633-9.
 23. Bakke, E.; Hoiseth, G.; Arnestad, M.; Gjerde, H., Detection of Drugs in Simultaneously Collected Samples of Oral Fluid and Blood. *J Anal Toxicol* **2019**, *43* (3), 228-232.
 24. Gjerde, H.; Langel, K.; Favretto, D.; Verstraete, A. G., Detection of illicit drugs in oral fluid from drivers as biomarker for drugs in blood. *Forensic Sci Int* **2015**, *256*, 42-5.
 25. Skopp, G., Preanalytic aspects in postmortem toxicology. *Forensic Sci Int* **2004**, *142* (2-3), 75-100.

26. Gentili, S.; Solimini, R.; Tittarelli, R.; Mannocchi, G.; Busardo, F. P., A Study on the Reliability of an On-Site Oral Fluid Drug Test in a Recreational Context. *J Anal Methods Chem* **2016**, *2016*, 1234581.
27. Wille, S. M.; Raes, E.; Lillsunde, P.; Gunnar, T.; Laloup, M.; Samyn, N.; Christophersen, A. S.; Moeller, M. R.; Hammer, K. P.; Verstraete, A. G., Relationship between oral fluid and blood concentrations of drugs of abuse in drivers suspected of driving under the influence of drugs. *Ther Drug Monit* **2009**, *31* (4), 511-9.
28. Toennes, S. W.; Kauert, G. F.; Steinmeyer, S.; Moeller, M. R., 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* **2005**, *152* (2-3), 149-55.
29. Gjerde, H.; Mordal, J.; Christophersen, A. S.; Bramness, J. G.; Morland, J., Comparison of drug concentrations in blood and oral fluid collected with the Intercept sampling device. *J Anal Toxicol* **2010**, *34* (4), 204-9.
30. Langel, K.; Gjerde, H.; Favretto, D.; Lillsunde, P.; Oiestad, E. L.; Ferrara, S. D.; Verstraete, A. G., Comparison of drug concentrations between whole blood and oral fluid. *Drug Test Anal* **2014**, *6* (5), 461-71.
31. Aps, J. K.; Martens, L. C., Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int* **2005**, *150* (2-3), 119-31.
32. Grapp, M.; Maurer, H. H.; Desel, H., Systematic forensic toxicological analysis by GC-MS in serum using automated mass spectral deconvolution and identification system. *Drug Test Anal* **2016**, *8* (8), 816-25.
33. Oberacher, H.; Arnhard, K., Compound identification in forensic toxicological analysis with untargeted LC-MS-based techniques. *Bioanalysis* **2015**, *7* (21), 2825-40.
34. You, Y.; Guan, F.; D'Ippolito, R.; Li, X.; Soma, L. R.; Robinson, M. A., High-throughput doping control analysis of 28 amphetamine-type stimulants in equine plasma using

hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal* **2019**, *11* (3), 441-454.

35. Giroud, C.; Michaud, K.; Sporkert, F.; Eap, C.; Augsburger, M.; Cardinal, P.; Mangin, P., A fatal overdose of cocaine associated with coingestion of marijuana, buprenorphine, and fluoxetine. Body fluid and tissue distribution of cocaine and its metabolites determined by hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry(HILIC-MS). *J Anal Toxicol* **2004**, *28* (6), 464-74.

36. Gritti, F.; Guiochon, G., The current revolution in column technology: how it began, where is it going? *J Chromatogr A* **2012**, *1228*, 2-19.

37. Mather, J.; Rainville, P. D.; Spooner, N.; Evans, C. A.; Smith, N. W.; Plumb, R. S., Rapid analysis of dried blood spot samples with sub-2-microm LC-MS/MS. *Bioanalysis* **2011**, *3* (4), 411-20.

38. Olah, E.; Fekete, S.; Fekete, J.; Ganzler, K., Comparative study of new shell-type, sub-2 micron fully porous and monolith stationary phases, focusing on mass-transfer resistance. *J Chromatogr A* **2010**, *1217* (23), 3642-53.

39. Abraham, A.; Al-Sayah, M.; Skrdla, P.; Bereznitski, Y.; Chen, Y.; Wu, N., Practical comparison of 2.7 microm fused-core silica particles and porous sub-2 microm particles for fast separations in pharmaceutical process development. *J Pharm Biomed Anal* **2010**, *51* (1), 131-7.

40. Grayson, M. A., *Measuring Mass: From Positive Rays to Proteins*. Chemical Heritage Press: 2002; p 149.

41. De Hoffmann, E.; Stroobant, V., *Spectrométrie de masse*. 3ème ed.; DUNOD: Paris, 2005; p 425.

42. Kaufmann, R.; Heinen, H. J.; Schiirmann, M.; Wechsung, R., Recent advances of laser microprobe masse analysis as applied to biological and technical specimen. *Microbeam Analysis* **1979**, 63.
43. Thompson, J. J., *Rays of positive Electricity and their Application to Chemical Analysis*. 1913.
44. Makarov, A., Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem* **2000**, 72 (6), 1156-62.
45. Dempster, A. J., Positive Ray Analysis of Lithium. *Science* **1921**, 53 (1372), 363-4.
46. Cameron, A. E.; Eggers, D. F., An Ion "Velocitron". *Review of Scientific Instruments* **1948**, 19 (9).
47. Stephens, W., New type of mass spectrometer: Time-of-flight mass spectrometer. *Physical Review Journals* **1946**, 69 (691).
48. Beynon, J. H., The use of the mass spectrometer for the identification of organic compounds. *Microkimia Acta* **1955**, 437.
49. McLafferty, F. W., Mass Spectrometry in Chemical Research and Production. *Applied Spectroscopy* **1957**, 11 (4).
50. Gohlke, R. S., Time-of-Flight Mass Spectrometry and Gas-Liquid Partition Chromatography. *Analytical Chemistry* **1959**, 31 (4).
51. McLafferty, F. W.; Bryce, T. A., Metastable-ion characterisation: characterization of isomeric molecules. *Chemical Communications* **1967**, (23), 2015-2017.
52. Jennings, K. R., Collision-induced decompositions of aromatic molecular ions. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* **1968**, 1 (3), 227-235.
53. Arpino, P.; Baldwin, M. A.; McLafferty, F. W., Liquid chromatography-mass spectrometry. II. Continuous monitoring. *Biomed Mass Spectrom* **1974**, 1 (1), 80-2.

54. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T., Analyses up to m/z 100000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1988**, 2, 151-153.
55. Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F., Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass spectrometry Ion Processes* **1987**, 78 (53).
56. Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **1989**, 246 (4926), 64-71.
57. Peters, F. T.; Drummer, O. H.; Musshoff, F., Validation of new methods. *Forensic Science International* **2007**, 165 (2-3), 216-24.
58. Lynch, K. L., CLSI C62-A: A New Standard for Clinical Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* **2016**, 62 (1), 24-9.
59. Tomczak, E.; Wozniak, M. K.; Kata, M.; Wiergowski, M.; Szpiech, B.; Biziuk, M., Blood concentrations of a new psychoactive substance 4-chloromethcathinone (4-CMC) determined in 15 forensic cases. *Forensic Toxicol* **2018**, 36 (2), 476-485.
60. Hoiseth, G.; Tuv, S. S.; Karinen, R., Blood concentrations of new designer benzodiazepines in forensic cases. *Forensic Sci Int* **2016**, 268, 35-38.
61. Fenn, J. B., Electrospray ionization mass spectrometry: How it all began. *J Biomol Tech* **2002**, 13 (3), 101-18.
62. Griffiths, W. J.; Jonsson, A. P.; Liu, S.; Rai, D. K.; Wang, Y., Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochem J* **2001**, 355 (Pt 3), 545-61.
63. Siuzdak, G., The emergence of mass spectrometry in biochemical research. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, 91 (24), 11290-7.
64. Kulkarni, P.; Baron, P.; Willeke, K., *Aerosol Measurement : Principles, Techniques, and Applications*. 2011.

65. Banerjee, S.; Mazumdar, S., Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int J Anal Chem* **2012**, *2012*, 282574.
66. King, R.; Bonfiglio, R.; Fernandez-Metzler, C.; Miller-Stein, C.; Olah, T., Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom* **2000**, *11* (11), 942-50.
67. Jagerdeo, E.; Schaff, J. E., Rapid screening for drugs of abuse in biological fluids by ultra high performance liquid chromatography/Orbitrap mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2016**, *1027*, 11-8.
68. Rauniyar, N., Parallel Reaction Monitoring: A Targeted Experiment Performed Using High Resolution and High Mass Accuracy Mass Spectrometry. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16* (12), 28566-81.
69. Pusch, W.; Flocco, M. T.; Leung, S. M.; Thiele, H.; Kostrzewa, M., Mass spectrometry-based clinical proteomics. *Pharmacogenomics* **2003**, *4* (4), 463-76.
70. Mollerup, C. B.; Dalsgaard, P. W.; Mardal, M.; Linnet, K., Targeted and non-targeted drug screening in whole blood by UHPLC-TOF-MS with data-independent acquisition. *Drug Test Anal* **2017**, *9* (7), 1052-1061.
71. Chindarkar, N. S.; Wakefield, M. R.; Stone, J. A.; Fitzgerald, R. L., Liquid chromatography high-resolution TOF analysis: investigation of MSE for broad-spectrum drug screening. *Clinical Chemistry* **2014**, *60* (8), 1115-25.
72. Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Graham Cooks, R., The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *40*, 430-443.
73. Makarov, A.; Denisov, E.; Kholomeev, A.; Balschun, W.; Lange, O.; Strupat, K.; Horning, S., Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem* **2006**, *78* (7), 2113-20.

Chapitre 2

Approches de criblage par couplage LC-HRMS

Approches de criblage par couplage LC-HRMS

Le couplage GC-MS est le premier outil véritablement efficace qui a permis à la fois une détection et une identification rapide et fiable des substances d'intérêt toxicologique dans des matrices complexes, répondant ainsi aux besoins de l'ensemble de l'étape de criblage en une seule analyse. L'efficacité de ce procédé dans ce contexte est intimement liée à la reproductibilité de la fragmentation des molécules offerte par l'ionisation par impact électronique (EI), et à l'utilisation de bibliothèques spectrales riches et fiables¹. Cependant, le développement des approches de couplage LC-MS plus polyvalentes, facilitant les étapes de préparation d'échantillons, et réduisant le temps d'analyse prennent petit à petit le pas sur les systèmes GC-MS pour les approches de criblage toxicologique². L'utilisation de la spectrométrie de masse haute-résolution permet de renforcer l'intérêt de la LC-MS pour ces approches en renforçant le pouvoir d'identification³.

En effet, le développement de ces approches sensibles et sélectives permet également de compenser la concentration plus faible des analytes dans le sang, et d'utiliser d'autres matrices que l'urine jusqu'alors matrice de référence pour les approches de criblage. Le gain de performance est tel qu'il permet même de développer des approches de criblage large-échelle, basées sur des microéchantillons visant à réduire les volumes de matrices biologiques et de solvants utilisés. Le gain de performance permet également dans certains cadres d'application de s'affranchir totalement de l'étape séparative de chromatographie et de réduire de ce fait considérablement les temps d'analyse⁴⁻⁶.

Ce chapitre sera dans un premier temps dédié aux stratégies analytiques possibles en ce qui concerne le criblage LC-HRMS, et notamment aux approches dépendantes et indépendantes des données. Par la suite une application de criblage LC-HRMS large échelle ciblant plus de 1'000 substances à partir de microéchantillons sanguins sera présentée.

1. Stratégie analytiques, acquisition dépendante et indépendante des données

La diversité des instruments et des analyseurs de masse associée aux développements technologiques permet une multitude de stratégies analytiques possibles. En raison du grand nombre de substances potentiellement impliquées dans un cas de toxicologie forensique et de la diversité de leurs propriétés physico-chimiques, le développement d'une approche de screening sensible et non-biaisée constitue une tâche complexe⁷. L'évolution des instruments hybrides basés sur l'Orbitrap a notamment permis le développement d'approches d'acquisition de données complexes par MS. Dans ces approches plusieurs scans sont utilisés en parallèle dans le but de maximiser l'information obtenue lors d'une même acquisition. On retrouve ici des stratégies dépendantes des données (*data dependent acquisition*, DDA) basées sur différents critères, ou des approches indépendantes des données (*data independent acquisition*, DIA). Ces deux stratégies sont disponibles pour les instruments de types QExactive® (Thermo Scientific). L'acquisition DDA se base sur une première acquisition en mode balayage (ou *full-scan*), suivie d'une 2^{ème} étape de fragmentation basée sur la première acquisition (Figure 2-1). Cette 2^{ème} acquisition peut s'effectuer soit selon des critères objectifs, à savoir principalement des seuils d'intensités, soit de manière ciblée en utilisant une liste d'inclusion. Le défaut de l'approche DDA basée sur des critères d'intensité, dont la principale limite est le temps de cycle dédié à l'étape de fragmentation, réside dans le risque de fragmenter des interférences liées à la matrice en lieu et place des analytes d'intérêt. L'utilisation d'une liste d'inclusion permet ainsi de focaliser l'instrument sur l'acquisition de données pertinentes pour l'identification des substances présentant un intérêt toxicologique. Cette stratégie comporte néanmoins un désavantage puisqu'une substance absente de la liste d'inclusion pourra être détectée dans le *full-scan* mais ne sera pas fragmentée.

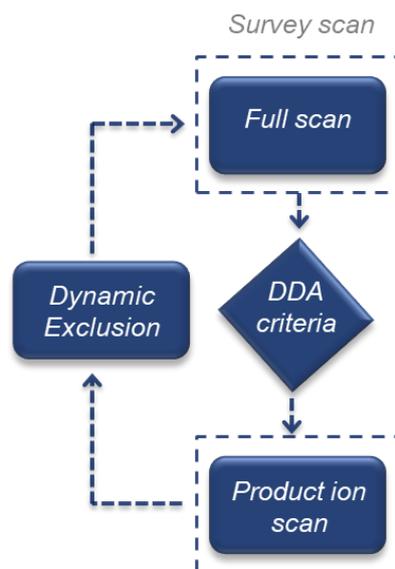


Figure 2-1 : Stratégie d'acquisition en données dépendantes

Lors d'une acquisition en DIA tel que le SWATH (*sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion spectra*) ou le MSX (*multiplexed*, appelé aujourd'hui msxDIA)⁸⁻¹⁰. Ces approches sont également basées sur une première acquisition en full-scan. Par la suite, une étape de fragmentation va être réalisée de façon systématique et exhaustive. En effet, l'ensemble des précurseurs présents dans des fenêtres de masses définies préalablement (de 25 daltons par exemple) vont être fragmentés (Figure 2-2). Par la suite, des algorithmes de déconvolution sont appliqués afin de réattribuer *a posteriori* les fragments à leurs précurseurs. Cette approche gagne progressivement en popularité, notamment pour les approches protéomiques et ce principalement grâce aux progrès de ces algorithmes de déconvolution.

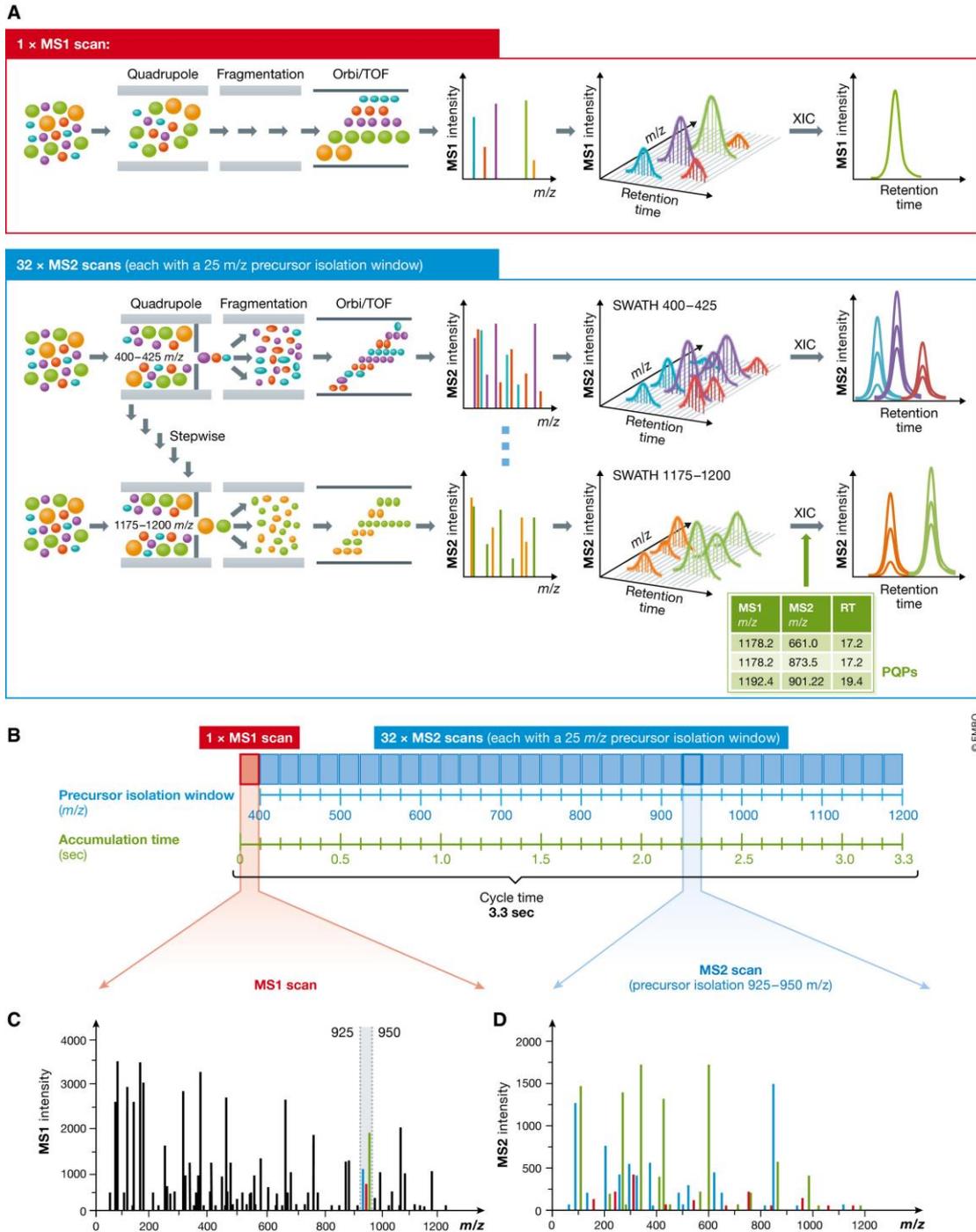


Figure 2-2 : Présentation des approches DIA telles que le SWATH¹¹

D'un point de vue théorique, les approches DIA semblent particulièrement appropriées pour les approches de criblage puisque l'ensemble des précurseurs est fragmenté, réduisant les risques de faux négatifs. Une étude récente a d'ailleurs mis en évidence l'intérêt du SWATH par rapport aux approches DDA classiques dans des cas de coélutions de substances pour l'analyse de

matrices complexes¹². En pratique cependant, la génération de ces spectres de fragmentation composites complexes présente des difficultés pour la détection et l'identification dans les gammes basses de concentration. Ce genre d'approches nécessitent donc encore l'amélioration des algorithmes de déconvolution avant de pouvoir être utilisées pour des aspects de criblage toxicologique de routine¹³.

Bien que l'utilisation d'une approche DDA ciblée en utilisant une liste d'inclusion limite la possibilité de recherche d'une substance *a posteriori* sans réanalyse de l'échantillon, cette approche couplée à l'utilisation d'une liste d'inclusion de plus de 1000 composés a fait ses preuves dans notre laboratoire. En effet, elle permet à l'instrument de se focaliser sur l'acquisition de donnée pertinentes. Nos expériences ont d'ailleurs démontré que l'utilisation d'une liste d'inclusion permet d'augmenter de manière importante l'identification des substances d'intérêt par rapport à une approche DDA basée sur les critères d'intensité, spécialement aux concentrations les plus basses liées aux gammes thérapeutiques et aux seuils légaux. L'utilisation de cette stratégie comportant une liste d'inclusion permet également un ajout et une adaptation rapide à l'arrivée d'une nouvelle substance, augmentant le pouvoir d'identification de la méthode.

2. Criblage large-échelle par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute-résolution

2.1. Présentation de la problématique

Une fois la stratégie analytique sélectionnée, à savoir une acquisition en DDA basée sur une liste d'inclusion, il a fallu sélectionner les critères d'identification avec l'objectif principal de maximiser l'efficacité de la méthode et de limiter les faux négatifs (substance présente dans l'échantillon mais non détectée par l'approche utilisée). Quatre critères ont été considérés comme paramètres d'identification, à savoir le rapport masse sur charge (m/z), le ratio isotopique (IP), le temps de rétention (RT) et la comparaison des spectres de fragmentation

MS/MS obtenus avec ceux contenus dans une base de données (LS ou *library search*). La recherche en librairie a été considérée comme satisfaisante lorsque le *match* entre le spectre de référence et le spectre acquis était supérieur à 50 %. Le ratio isotopique devait correspondre à la base de données à plus de 65 % avec une précision de masse inférieure à 10 ppm. Enfin le temps de rétention devait correspondre avec une précision de 30 secondes. Pour que nous puissions détecter un composé dont nous ne connaissons pas le temps de rétention ou pour compenser certains défauts de l'algorithme de comparaison des spectres, des choix ont dû être effectués. En effet, afin de remplir notre objectif principal, l'utilisateur doit investiguer plus particulièrement les cas où le temps de rétention ou la comparaison spectrale MS/MS n'est pas en adéquation avec notre base de données (Figure 2-3). L'élargissement de ces critères d'identification implique également un plus grand risque de faux positifs qui doivent être examinés par l'opérateur. L'ajout de seuils d'intensité pour l'identification de certaines substances (la cocaïne par exemple), permet également de s'affranchir d'un certain nombre de faux positifs.

Exact Mass (m/z)	Isotopic Pattern (IP)	Retention Time (RT)	Library Search (LS)	Confirmed Identification
✓	✓	✓	✓	✓
✓	✓	✓	✗	~
✓	✓	✗	✓	~

Figure 2-3 : Critères d'identification sélectionnés pour l'approche de criblage LC-HRMS sur DBS

Afin d'évaluer les performances de la méthode développée, 104 cas de toxicologie forensique et clinique ont été analysés sans connaissances *a priori* sur DBS avec l'approche développée ainsi qu'avec une méthode ciblée basée sur un instrument de type QTrap® (AB Sciex) sur des prélèvements DBS, et une méthode basée sur un Toxtyper® (LC-LIT-MS system, Bruker) sur des échantillons de sang complet. L'analyse de ces cas a mené à 271 identifications uniques de composés. L'approche LC-HRMS sur DBS développée durant ce travail a permis de mettre en

évidence 99 % des identifications contre 72 % pour l'approche Toxtyper et 57 % pour l'approche QTrap® (Figure 2-4 A).

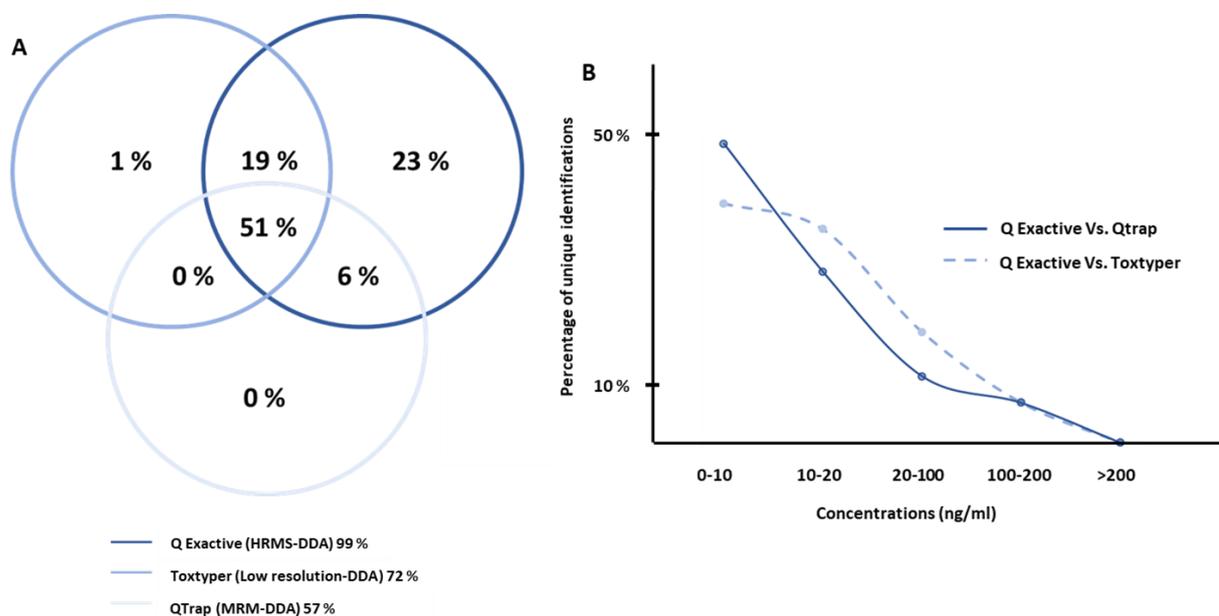


Figure 2-4 : Comparaison des performances de 3 approches de criblages toxicologique après analyses de 104 cas menant à 271 identifications (A). Et pourcentage de substances non identifiées par les approches classiques en fonction de la gamme de concentration (B)

Une évaluation plus en profondeur des résultats a permis de mettre en évidence que ces différences étaient très majoritairement liées à la capacité de détection et d'identification de la méthode aux gammes de concentration les plus basses (Figure 2-4 B). L'autre partie des différences étaient liées à l'aspect large-échelle de la méthode développée qui cible un nombre plus important de substances que les autres approches. Ces résultats ont permis de mettre en exergue la plus-value en termes de sensibilité et de sélectivité associées à l'utilisation d'un instrument HRMS de type Orbitrap et ce malgré l'utilisation de microéchantillons de sang. À la suite de cette étude, la méthode a été implémentée en routine et plus d'une centaine d'échantillons par mois sont analysés avec cette approche. L'article lié à ces développements, et publié dans *Analytica Chimica Acta*, est présenté dans la section suivante.

2.2. Article : Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for broad-spectrum screening of dried blood spot as microsampling procedure



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

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

Liquid chromatography–high resolution mass spectrometry for broad-spectrum drug screening of dried blood spot as microsampling procedure

Timothée Joye^a, Jonathan Sidibé^a, Julien Déglon^a, Abderrahim Karmime^b, Frank Sporkert^a, Christèle Widmer^a, Bernard Favrat^c, Pierre Lescuyer^b, Marc Augsburger^a, Aurélien Thomas^{a,d,*}

^a Forensic Toxicology and Chemistry Unit, CURML, Lausanne University Hospital, Geneva University Hospitals, Switzerland

^b Division of Laboratory Medicine, Geneva University Hospitals, Switzerland

^c Unit of Medicine and Traffic Psychology, CURML, Lausanne University Hospital, Geneva University Hospitals, Switzerland

^d Faculty Unit of Toxicology, CURML, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Switzerland

HIGHLIGHTS

- Application of DBS microsampling hyphenated with LC and Orbitrap technology for toxicology screening.
- Minimal blood volume requirement for powerful screening and identification using high resolution MS.
- Validation of the developed method according to guidelines for qualitative approaches.
- Great relevance for practice in toxicology opening new opportunities towards sampling processes in non-medical environments.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 November 2018

Received in revised form

28 January 2019

Accepted 4 February 2019

Available online 19 February 2019

Keywords:

Dried blood spot

High resolution mass spectrometry

General unknown screening

ABSTRACT

Background: Hyphenation of liquid chromatography (LC) with high-resolution mass spectrometry (HRMS) offers the potential to develop broad-spectrum screening procedures from low volumes of biological matrices. In parallel, dried blood spot (DBS) has become a valuable tool in the bioanalysis landscape to overcome conventional blood collection issues. Herein, we demonstrated the applicability of DBS as micro-sampling procedure for broad-spectrum toxicological screening.

Methods: A method was developed on a HRMS system in data dependant acquisition (DDA) mode using an extensive inclusion list to promote collection of relevant data. 104 real toxicology cases were analysed, and the results were cross-validated with one published and one commercial screening procedures. Quantitative MRM analyses were also performed on identified substances on a triple quadrupole instrument as a complementary confirmation procedure.

Abbreviations: STA, systematic toxicological analysis; GUS, general unknown screening; LC, liquid chromatography; HRMS, high resolution mass spectrometry; DDA, data-dependent acquisition; DBS, dried blood spot; DMS, dried matrix spot; MRM, multiple reaction monitoring; LOI, limit of identification; LOD, limit of detection; DIA, data-independent acquisition; SWATH, sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion spectra; MSX, multiplexed.

* Corresponding author. Faculty Unit of Toxicology, CURML, Vulliette 04 street, 1000 Lausanne 25, Switzerland.

E-mail address: Aurelien.Thomas@chuv.ch (A. Thomas).

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.011>

0003-2670/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Microsampling
Data dependent acquisition

Results: The method showed limits of identification (LOIs) in appropriateness with therapeutic ranges for all the classes of interest. Applying the three screening approaches on 104 real cases, 271 identifications were performed including 14 and 6 classes of prescribed and illicit drugs, respectively. Among the detected substances, 23% were only detected by the proposed method. Based on confirmatory analyses, we demonstrated that the use of blood micro-samples did not impair the sensitivity allowing more identifications in the low concentration ranges.

Conclusion: A LC-HRMS assay was successfully developed for toxicological screening of blood micro-samples demonstrating a high identification power at low concentration ranges. The validation procedure and the analysis of real cases demonstrated the potential of this assay by supplementing screening approaches of reference.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Systematic toxicological analysis (STA) is of primary importance in both clinical and forensic toxicology. It generally consists of a combination of analytical strategies including immunoassays, and chromatography hyphenated to mass spectrometry [1–3]. In STA, orientation tests and preliminary screening are performed, which can be referred as general unknown screening (GUS) [4]. The goal of this procedure is to conclude in a precise and unambiguous way if any substance of toxicological interest has been consumed or not prior confirmatory quantitative analysis [5,6]. This challenging task depends on the biological matrix, sample preparation, analytical technique, and the compound database.

Currently, liquid chromatography (LC) hyphenated with mass spectrometry (MS) is partially replacing gas chromatography (GC)-MS approaches regarding GUS in blood and urine and numerous applications have been mentioned [6,7].

The introduction of high-resolution MS (HRMS) analyser and especially Orbitrap technology, gives the opportunity to investigate several analytical strategies including full scan data dependent acquisition (DDA) [8–10]. The latest generation of Fourier transform MS, routinely reaches mass resolution above 70,000 at 1-ppm mass accuracy and high spectral resolution capacities. Continual improvement of scan rate frequencies and dynamic range lead to instruments particularly adapted for large-scale comprehensive screening in complex matrices [11–13]. The increased mass accuracy allows to facilitate identification by reducing the number of possible chemical formulas [6]. Lastly, this technology offers fast positive/negative polarity switching at high scan rates allowing the simultaneous analysis of a wide range of substances [14]. Therefore, HR full-scan methods are very suitable for the development of large-scale screening procedure and especially for drug screening [3,15]. By improving the mass resolution power, HRMS increases the selectivity, therefore reducing the potential interferences [10]. The associated improvement in terms of sensitivity could allow to reduce the volume of biological matrices used for the screening procedure.

Currently, urine is the gold standard regarding screening approaches since its sampling is simple and non-invasive. Moreover, urine is relatively poor in proteins and lipids that could interfere with the analytes' signal and concentrate most analytes reducing potential sensitivity issues [16]. Compared to urine, blood sampling presents significant advantages since it is difficult to counterfeit, and the toxicological interpretation of concentration is facilitated making it the gold standard for confirmatory analysis [17]. However, blood sampling induces several logistical and analytical issues. Indeed, classical venepuncture is invasive, requires special logistic and medical supervision [18]. In addition, in some situations, especially concerning problematic and vulnerable patient population, only limited volumes of blood are available [19]. To bypass those issues,

the use of cellulose paper cards has been mentioned [20]. The first use of dried blood spot (DBS) has been reported by Guthrie and Susie more than 50 years ago, for paediatric purpose [21]. Among advantages, DBS sampling requires the collection of a small volume of blood (5–10 μ L). Moreover, it is performed by finger or heel pricking that can be performed in a non-hospital environment by a technician or by the patient himself after minimal training [22]. The adsorption and drying of blood on a solid phase makes analytes less reactive, leading to facilitated shipment and storage and reducing the costs [23]. Lastly, during blood adsorption and drying most pathogenic agents are deactivated leading to a safer samples' handling [24].

Various applications of drugs' detection using dried matrix spots (DMS) [14,27] and especially DBS sampling have already been presented [7,23,28,29]. For instance, DBS analyses have been used for both quantitative (quantification of benzodiazepines) [22] and screening approaches either for doping screening [7] or for toxicological analyses using a targeted strategy [30]. Indeed, DBS presents several advantages for MS-based analyses since samples preparation can be accelerated and facilitated. Moreover, using organic solvents, lipids and proteins are mostly being retained on the paper-card allowing the reduction of matrix effects, making this sampling support particularly adapted to MS-based strategies [22,31–33]. We previously demonstrated the potential of DBS for targeted drug screening using a multiple reaction monitoring (MRM)-DDA approach [30]. In the present study, we extend the screening capabilities from DBS samples using the analytical advantages brought by the HRMS, notably by broadening the number of possible identifications. In this way, a full-scan-DDA LC-HRMS method was developed using an inclusion list of more than 1000 compounds including all classes of interest. The developed assay requires limited sample preparation and allows the identification of a wide-range of compounds. Representative substances were tested for the chromatographic and MS parameters optimisation including non-exhaustively amphetamines, benzodiazepines, cocaine, antidepressants, neuroleptics, opioids, NPS, anticonvulsants, and THC-COOH. In a second time, a subset of 30 substances was used for the determination of the limits of identification (LOIs). This method was then assessed using 104 behavioural toxicology real cases. The results were cross-validated by two published screening methods used in routine [30,34]. Confirmation assessment were also performed using quantitative analysis as a complementary approach to evaluate the efficiency of the developed routine screening method presented herein.

2. Methods

2.1. Standards and reagents

Water, methanol, formic acid (FA), dichloromethane,

hydrochloric acid, hexane and ethyl acetate UPLC, potassium and sodium chloride, boric acid, and ammonium formate were purchased from Biosolve, Sigma-Aldrich or Merck. Drug standards were purchased at 1 mg/mL either from Cerilliant or Lipomed. Blank, lyophilized whole blood for method development was purchased from ACQ Science. Protein saver cards for DBS sampling were purchased from Whatman. Whole blood external quality control (EQC) PM100 for pain management and drug of abuse (DoA-I VB low) were purchased from UTAK[®] (Supplemental Table 1) and Medidrug[®] (Supplemental Table 2) respectively.

2.2. Sample preparation

For method development, blank whole blood was spiked with drugs at different concentrations (1, 5, 10, 20 and 50 ng mL⁻¹). Methanolic standard were evaporated under a nitrogen flow at room temperature before reconstitution in blood. Then 10 µL were deposited on a DBS filter paper card. Drugs were tested for limits of identification and detection determination, chromatography and identification optimisation including benzodiazepines, NPS, neuroleptics, opioids, antidepressants, synthetic cannabinoids, amphetamines, anticonvulsant, cocaine and cannabinoids. A double extraction process on DBS was developed. One spot was extracted using 100 µL of methanol and mixed for 2 min. A second spot was extracted using 100 µL of borate buffer 0.5 M pH 9.5, after mixing for 2 min, 300 µL of DCM: Hexane: Ethyl Acetate (5:4:1) were added. This second spot was then centrifugated and the organic phase was mixed with the 100 µL of methanol extract from the first extraction in a new tube. Organic solvents were then evaporated at room temperature using a nitrogen flow, and samples were reconstituted with 50 µL of water.

2.3. LC-HRMS method

All samples were injected (10 µL injection volume) using partial loop injection mode on the LC-Q Exactive Plus system (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Chromatographic separation was performed using a Thermo Scientific Ultimate 3000 LC system with a Phenomenex 2.6 µm C18 (2.1 × 50 mm) maintained at 45 °C. Mobile phase A consisted of ammonium formate 10 mM pH 3.3 and mobile phase B of MeOH with 0.1% FA. Phase B was ramped linearly from 2 to 98% over 6 min. The column was washed at 98% of B for 3 min, followed by a 3.5 min reequilibration at 2% of B. The LC was coupled to the MS via a heated ESI source associated with a Q Exactive Plus operating in full-scan DDMS² positive polarity with a Tsim DDMS² negative polarity switching between min 6 and 7 only for the specific detection of THC-COOH (Supplemental Fig. 1A). The ionisation spray voltage was set to 3 kV, sheath gas flowrate was set to 40 and auxiliary gas flowrate to 10 (both in arbitrary unit). HCD fragmentation was performed with an inclusion list containing 1008 compounds using NCE at 70 eV in positive polarity and 30 eV in negative polarity. No dynamic exclusion was set. Resolution was set to 70'000 for the full scan experiment in positive polarity while it was set to 17'500 during the polarity switching and the fragmentation experiments.

2.4. Data analysis

Data analysis was performed using TraceFinder (Thermo Scientific) and a database containing more than 1000 compounds (Supplemental Table 3). Four criteria were used for substance identification including the mass over charge ration (m/z), the isotopic pattern (IP), the retention time (RT) and the library search (LS) based on the fragmentation spectra comparison. Peak detection was based on a S/N threshold of 10 with a 10 ppm tolerance.

Library search was considered successful with a match greater or equal to 50%. IP needed to fit over 65% allowing 10 ppm mass and 20% intensity deviations and RT was considered with a 30 seconds precision. Substances identification was still possible if either the RT or the LS did not match.

2.5. Method evaluation

LOIs were measured using a list of 30 substances including most classes of interest (Table 1). LOIs were evaluated by injecting 5 spiked replicates at 1, 5, 10 and 20 ng mL⁻¹. To minimise the risk of false negative and as described elsewhere, LOI was considered as the lowest concentration at which the substances are detected and identified in all five replicates based on the four criteria previously described [35,36]. Limits of detection (LODs) were defined as the minimal concentration at which at least the accurate mass precursor ion is detectable [14]. Method reproducibility and instrument response were then evaluated using whole blood controls EQC UTAK[®] pain management PM 100 (Supplemental Table 1) and the lowest concentration Medidrug[®] for drug of abuse (Supplemental Table 2) spotted on a filter paper card. Each QC was injected at the beginning and the end of each sequence. A QC was considered acceptable when all its substances targeted by the method were identified regarding the four criteria. Selectivity was assessed by injecting ten different blood samples spotted on DBS. Matrix effect (ME) and recovery (RE) was evaluated according to the approach described by Matuszewski et al. [37], three sample sets were prepared including 30 representative substances (Table 1). Five different blank blood sample or neat standard were spiked with those substances at two concentration levels (20 and 200 ng mL⁻¹). Sample set 1 represented neat standards. Sample set 2 blank blood matrix spots spiked after extraction while sample set 3 represented blank blood matrix spiked and spotted before extraction.

To evaluate and confirm the efficiency of the whole process, 104 samples from forensic and clinical toxicology were analysed. Those samples were also analysed by two other routine LC-MS methods. The first one was developed for forensic toxicology using one 10 µL DBS sample. The spot was introduced into a vial with 100 µL of methanol and injected on the LC-MS/MS system. The analysis was performed on a Qtrap[®] 5500 (AB, Sciex) working in targeted multiple reaction monitoring (MRM)-DDA. The chromatography was performed both on a reverse phase (RP) and a Hilic column in parallel [30]. The second one was developed for clinical toxicology on a Toxtyper LC-IT-MS System (Brucker). Sample preparation was based on alkaline liquid/liquid extraction with sodium carbonate 1 M and butyl acetate from 500 µL of whole blood. The method was based on low-resolution ion trap technology after a standard RP chromatographic separation. The MS experiment was performed in full-scan DDA with continuous positive/negative ionisation mode switching [34]. Identifications performed by the 3 methods were compared as a cross-validation step. The detection of a substance was confirmed either if it was detected by at least two of the assessed methods or if its identification was unambiguous. Carry-over was evaluated by injecting a methanol sample after each analysed blood sample and by analysing 10 different blank whole blood samples after the injection of the 104 real cases. In addition, sensitivity assessment and identification confirmation has been processed using quantitative analysis.

3. Results and discussion

3.1. Sample preparation

DBS provides several well-known advantages toward sample

Table 1

List of the 30 substances used for the method evaluation with their respective limits of identification (LOIs), limits of detection (LODs) and therapeutic ranges or legal thresholds. Matrix effect (ME) and recovery (RE) were evaluated at two concentration levels (20 and 200 ng mL⁻¹) on those substances involving a representative panel of the classes of the molecules of interest.

Substance	LOI (ng mL ⁻¹)	LOD (ng mL ⁻¹)	RE (CV) (20 ng mL ⁻¹)	ME (CV) (20 ng mL ⁻¹)	RE (CV) (200 ng mL ⁻¹)	ME (CV) (200 ng mL ⁻¹)	Therapeutic range/Legal threshold (ng mL ⁻¹)
6-MAM	5	1	90% (6%)	5% (7%)	57% (19%)	-5% (3%)	–
Aminoclonazepam	10	10	72% (10%)	-27% (4%)	41% (10%)	-19% (5%)	–
Amitriptyline	1	<1	94% (10%)	208% (23%)	46% (20%)	100% (12%)	50–300
Amphetamine	10	1	49% (5%)	-5% (7%)	25% (5%)	48% (4%)	15
Benzoyllecgonine	1	<1	36% (5%)	-16% (5%)	24% (6%)	-8% (2%)	–
Benzylpiperazine	1	<1	88% (5%)	-3% (8%)	38% (27%)	-16% (5%)	–
Butylone	1	<1	65% (5%)	-4% (7%)	30% (24%)	-5% (5%)	–
Carbamazepine	1	<1	89% (4%)	-18% (4%)	55% (10%)	-10% (3%)	200–800
Citalopram	1	<1	110% (10%)	31% (18%)	61% (17%)	-14% (11%)	50–110
Cocaine	1	<1	121% (5%)	29% (9%)	60% (11%)	-2% (7%)	15
Codeine	5	1	72% (6%)	-5% (5%)	52% (8%)	-3% (2%)	30–250
Diazepam	1	<1	88% (8%)	-20% (7%)	47% (7%)	-16% (2%)	100–2000
Fluoxetine	1	<1	113% (19%)	319% (28%)	71% (19%)	178% (10%)	120–500
Gabapentin	20	5	57% (15%)	-35% (42%)	39% (6%)	-22% (21%)	50–600
Haloperidol	1	<1	106% (19%)	170% (19%)	57% (19%)	114% (11%)	5–17
Hydroxymidazolam	1	<1	90% (8%)	-28% (4%)	49% (15%)	-23% (4%)	–
Ketamine	5	1	71% (2%)	6% (7%)	34% (13%)	-3% (3%)	1000–6000
MDMA	1	<1	68% (3%)	-9% (6%)	33% (34%)	-9% (5%)	15
Methadone	1	<1	99% (11%)	21% (21%)	48% (21%)	-15% (9%)	100–500
Methamphetamine	1	<1	49% (5%)	-10% (8%)	22% (6%)	-13% (4%)	15
Methedrone	1	<1	68% (3%)	-9% (6%)	33% (34%)	-9% (5%)	–
Methylone	1	<1	58% (4%)	-17% (9%)	25% (31%)	-17% (4%)	–
Mianserin	1	<1	84% (6%)	122% (16%)	37% (17%)	36% (9%)	15–70
Midazolam	1	<1	73% (7%)	-18% (3%)	51% (9%)	-11% (3%)	40–100
Morphine	10	5	56% (5%)	-10% (4%)	19% (41%)	38% (9%)	15 (free form)
Quetiapine	1	<1	98% (3%)	85% (7%)	57% (13%)	31% (3%)	100–500
Risperidone	1	<1	107% (11%)	111% (16%)	57% (19%)	30% (10%)	6–20
THC-COOH	10	5	49% (6%)	-53% (6%)	28% (16%)	-41% (6%)	–
Trimipramine	5	1	89% (14%)	166% (26%)	43% (17%)	66% (15%)	10–30
Zolpidem	1	<1	90% (7%)	32% (4%)	51% (7%)	9% (4%)	80–150

collection. Moreover, the use of blood micro-sampling is described as a promising technique to simplify sample preparation prior to the analysis and reduce the solvent volumes [30,38]. Using only two 10 μ L spots and a limited sample preparation was sufficient to sensitively detect all the classes of drugs of interest in their therapeutic or legal range. The development of such micro-sampling strategies presents an alternative for blood collection in non-hospital environment facilitating potential large cohort studies [25]. In addition, the combination of simplified sampling with large-scale adaptive screening approaches could be a public health asset for monitoring habits of consumption and for targeted prevention. For instance, the emergence of quickly evolving novel psychoactive substances (NPS) emphasize the risk for the population requiring large-scale adaptive analytical strategies [26].

The method was validated according to the recommendations regarding qualitative approaches [39,40]. Water was selected as reconstitution solvent based on a compromise between specificity for a maximum of compounds with different physico-chemical properties and chromatography. Selectivity was investigated using ten blank blood samples spotted on DBS and ten clean filter paper cards. No effects were observed extracting and analysing clean paper spots, suggesting that no substances were released from the paper during the extraction procedure. No interfering compounds impaired the detection of the substances of interest analysing blank DBS samples. The systematic injection of a blank methanol after every analysed samples did not reveal carry-over even after injection of the highest EQC level (i.e. no remaining peaks were observed in the injected methanol for those exact masses). This was confirmed from real cases analyses since no carryover was observed after the injection of samples containing high concentrations of benzoyllecgonine (2900 ng mL⁻¹), tramadol (1400 ng mL⁻¹) or zolpidem (1200 ng mL⁻¹). The RE and ME results

for the DBS extraction process are depicted in Table 1. The mean ME at 20 ng mL⁻¹ was 34% ranging from -53% to 319% and 13% at 200 ng mL⁻¹ ranging from -42% to 178%. RE was ranging from 36% to 121% for respectively benzoyllecgonine and cocaine at 20 ng mL⁻¹ and from 22 to 71% for respectively methamphetamine and fluoxetine at 200 ng mL⁻¹. Maximal ion suppression was observed for THC-COOH while maximal ion enhancement was observed for fluoxetine. Those ME and RE values are in accordance with previous studies [7,32,41].

3.2. Detection and identification

Despite several advantages provided by DBS, the use of micro-sampling requires highly sensitive instruments. LODs and LOIs for the 30 model compounds are listed in Table 1. As described above, LOI was defined as the lowest concentration where at least 3 of the 4 identification criteria (*m/z*, IP, RT and LS) were fulfilled while LOD was based only on the parent peak detection explaining the slight differences between those parameters [11,14]. LOIs were determined to be equal or lower than 20 ng mL⁻¹ for all the 30 substances tested including 11 different classes of molecules, which was the initial goal. LOI was measured at 20 ng mL⁻¹ for one substance (Gabapentin), while 4 substances have been successfully identified in all 5 replicates at 5 and 10 ng mL⁻¹. For most of the tested substances (63%) the LOI was assessed to be 1 ng mL⁻¹. Determined LOIs were confirmed by the identification of all substances in the lowest EQC levels (Supplemental Tables 1 and 2). LODs and LOIs were found to be in adequation with the therapeutic ranges [42] or the legal thresholds from the Swiss legislation [43]. Regarding identification, parameters were selected to maximise the method efficiency and reduce the potential number of false negatives. Further investigation by the operator is required when either

the library spectra or the retention time does not match. The use of such an approach allows identifications by post-processing after database adjustments. By relaxing those identification criteria, the sensitivity is increased leading to a higher risk of false positive identification. Therefore, a careful data handling is performed by the operator to assess whether it is a true or false positive.

3.3. Application of the method on real cases

From the three different screening methods, 271 identifications were validated among the 104 clinical and forensic toxicology blood samples (Supplemental Table 4). In total, six classes of illicit drugs (amphetamines, cannabinoids, opioids, NPS and LSD) and 14 classes of prescribed drugs including non-exhaustively antifungals, antimalarials, antidiabetics, antihistaminic, beta-blockers, or proton-pump inhibitors were detected. The prescribed drugs were summarized as five classes of prescribed drugs (benzodiazepines, neuroleptics, antidepressants, anaesthetics/analgesics and other drugs) for better representation. In 24 cases, no compound was detected and identified while in the 80 other cases, a total of 79 different substances were confirmed. The targeted MRM-DDA approach on DBS allowed the identification of 57% of the substances while using the Toxtyper[®] on whole blood this number increased to 72%. Using the HRMS-DDA full-scan approach, 99% of the “hits” were identified on DBS confirming the efficiency of the developed method (Fig. 1 A). As expected THC-COOH was the most detected substance being present in more than 46% of all the cases (104) (Fig. 2). Without considering THC-COOH which is targeted only by the HRMS-DDA approach, the percentage of identification respectively increases to 87% and 69% for the Toxtyper and the MRM-DDA. Cocaine, benzodiazepines and amphetamines were respectively detected in 19%, 17% and 8% of the cases (Fig. 2). A total of 18% of the cases were containing either an anaesthetic or an analgesic including ketamine or lidocaine. Other drugs were responsible for 13% of all identifications while one case of NPS

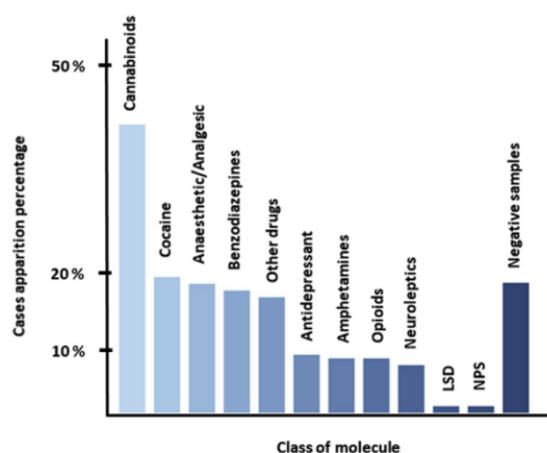


Fig. 2. The case apparition percentage in the 104 real cases is represented by bar charts.

(mephedrone) and one containing LSD were listed. The differences between the percentage of detected substances and the occurrence in cases (reaching more than 170%) can be explained by the concomitant consumption of 2 or more drugs (55% of the positive cases). Cannabinoids (represented only by THC-COOH) were the most single-drug consumed (80% of the cases positive to only one substance). Quantitative confirmations were performed on qualitatively identified substances targeted by the 3 methods. As confirmed by the quantitative results, the number of identifications using HRMS is increased in the lowest concentration ranges (see Fig. 1B). As an illustration, at concentrations between 0 and 10 ng mL⁻¹, 40% and 50% of the confirmed substances detected by

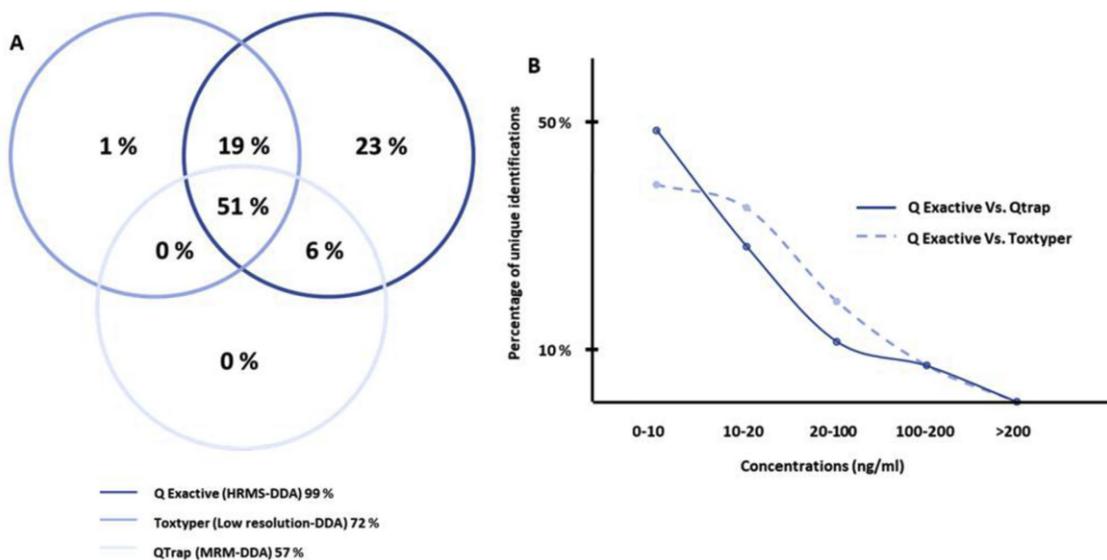


Fig. 1. 104 real cases have been analysed by the developed method and two other routine methods. The Venn diagram represents the percentage of identification performed by each method (A). The results were confirmed by quantitative analysis of the substances targeted by all 3 methods. The percentage of identification not performed by the routine approaches is represented depending on the concentration (B).

the HRMS-DDA procedure were respectively not identified by the MRM-DDA and the Toxtyper approaches. At the opposite, the 3 methods were able to detect all the compounds of interest from concentrations higher than 200 ng mL⁻¹. The HRMS improvement in terms of selectivity also results in an increase of sensitivity for full-scan approaches allowing to work with blood micro-samples. Nevertheless, the demonstrated gain of sensitivity also results in higher risks of false positive. Peak area thresholds have been implemented for well-ionised substances and classic contaminants such as cocaine or methadone.

Due to the number of substances to cover and the diversity of physico-chemical properties, the development of an unbiased and sensitive screening procedure is a difficult task³⁰. Current HRMS technologies offer the possibility to use either DDA [41] or data independent acquisition (DIA) including sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion spectra (SWATH) [44,45] or multiplexed (MSX) [46]. A recent study demonstrated the interest of SWATH in comparison to conventional DDA for the analysis of coeluting substances in complex matrices [47]. Despite the theoretical advantages of DIA strategies for toxicological screening, these approaches generate complex composite MS/MS spectra, which may hinder the identification of substances in the low concentration ranges. These issues would be overcome with the development of more efficient search algorithms and deconvolution processes for DIA routine applications [48].

Unlike DIA approaches, a limiting factor of DDA using intensity threshold as the main criteria would be the cycle time for fragmentation in case of coelution which can lead to prioritize MS/MS acquisitions of matrix interferences over pertinent compounds [47]. Even if DDA limits retrospective data evaluation because only known precursors are selected for fragmentation, by producing better fragmentation spectra than DIA [47,49], the use of DDA with a large inclusion list (i.e. more than 1000 substances as demonstrated herein) thus allow the instrument to spend time only on collecting relevant data. Besides, the inclusion list flexibility allows the fast and easy adaptation to any new substances increasing the method identification power.

4. Conclusion

In summary, a large-scale HRMS toxicology screening strategy was developed on DBS samples. The method operating in full-scan DDA using an inclusion list of more than 1000 compounds showed a high identification power in which new substances can easily be implemented. The method was cross-validated with one published and one commercial screening procedures. Confirmation quantitative analyses on identified compounds have demonstrated that despite the use of blood micro-samples the sensitivity was not impaired providing several advantages. Regarding the importance of screening procedures within the STA, rapid and comprehensive GUS tools are necessary and should be proposed. The hyphenation of DBS with HRMS might be an attractive solution combining a friendly sampling process with highly selective and sensitive MS-based detection. This method that was validated [39] and implemented for its use in routine opens notably new toxicological perspectives towards population monitoring in non-hospital environment. In a near future, the development of online shared libraries such as *m/z* cloud and bioinformatic tools should allow to broaden the number of efficient large-scale screening strategies especially regarding non-targeted approaches.

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have

appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from the Swiss Federal Office of Public Health (contract no. 14.013792/204.0001/-1300)

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.011>.

References

- [1] F. Versace, J. Deglon, P. Mangin, C. Staub, Application of direct-infusion ESI-MS/MS for toxicological screening, *Bioanalysis* 6 (2014) 2043–2055.
- [2] F. Versace, F. Sporkert, P. Mangin, C. Staub, Rapid sample pre-treatment prior to GC-MS and GC-MS/MS urinary toxicological screening, *Talanta* 101 (2012) 299–306.
- [3] A.H. Wu, J. Colby, High-resolution mass spectrometry for untargeted drug screening, *Methods Mol. Biol.* 1383 (2016) 153–166.
- [4] L. Roche, J. Pinguet, P. Herviou, F. Libert, C. Chenaf, A. Eschaliere, N. Authier, D. Richard, Fully automated semi-quantitative toxicological screening in three biological matrices using turbulent flow chromatography/high resolution mass spectrometry, *Clin. Chim. Acta* 455 (2016) 46–54.
- [5] M.R. Meyer, A.G. Helfer, H.H. Maurer, Current position of high-resolution MS for drug quantification in clinical & forensic toxicology, *Bioanalysis* 6 (2014) 2275–2284.
- [6] E. Jagerdeo, J.E. Schaff, Rapid screening for drugs of abuse in biological fluids by ultra high performance liquid chromatography/Orbitrap mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1027 (2016) 11–18.
- [7] A. Thomas, H. Geyer, W. Schanzer, C. Crone, M. Kellmann, T. Moehring, M. Thevis, Sensitive determination of prohibited drugs in dried blood spots (DBS) for doping controls by means of a benchtop quadrupole/Orbitrap mass spectrometer, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 1279–1289.
- [8] W. Jia, X. Chu, J. Chang, P.G. Wang, Y. Chen, F. Zhang, High-throughput untargeted screening of veterinary drug residues and metabolites in tilapia using high resolution orbitrap mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 957 (2017) 29–39.
- [9] S.B. Turnipseed, J.M. Storey, J.J. Lohne, W.C. Andersen, R. Burger, A.S. Johnson, M.R. Madson, Wide-scope screening method for multiclass veterinary drug residues in fish, shrimp, and eel using liquid chromatography-quadrupole high-resolution mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017) 7252–7267.
- [10] N.S. Chindarkar, M.R. Wakefield, J.A. Stone, R.L. Fitzgerald, Liquid chromatography high-resolution TOF analysis: investigation of MSE for broad-spectrum drug screening, *Clin. Chem.* 60 (2014) 1115–1125.
- [11] A.G. Helfer, J.A. Michely, A.A. Weber, M.R. Meyer, H.H. Maurer, Liquid chromatography-high resolution-tandem mass spectrometry using Orbitrap technology for comprehensive screening to detect drugs and their metabolites in blood plasma, *Anal. Chim. Acta* 965 (2017) 83–95.
- [12] A. Makarov, E. Denisov, O. Lange, S. Horning, Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17 (2006) 977–982.
- [13] J. Ivanisevic, A. Thomas, Metabolomics as a tool to understand pathophysiological processes, *Methods Mol. Biol.* 1730 (2018) 3–28.
- [14] A.G. Helfer, J.A. Michely, A.A. Weber, M.R. Meyer, H.H. Maurer, Orbitrap technology for comprehensive metabolite-based liquid chromatographic-high resolution-tandem mass spectrometric urine drug screening - exemplified for cardiovascular drugs, *Anal. Chim. Acta* 891 (2015) 221–233.
- [15] K.M. Ostermann, A. Luf, N.M. Lutsch, R. Dieplinger, T.P. Mechtler, T.F. Metz, R. Schmid, D.C. Kasper, MALDI Orbitrap mass spectrometry for fast and simplified analysis of novel street and designer drugs, *Clin. Chim. Acta* 433 (2014) 254–258.
- [16] M. Sundstrom, A. Pelander, I. Ojanpera, Comparison between drug screening by immunoassay and ultra-high performance liquid chromatography/high-resolution time-of-flight mass spectrometry in post-mortem urine, *Drug Test. Anal.* 7 (2015) 420–427.
- [17] G. Skopp, Preanalytic aspects in postmortem toxicology, *Forensic Sci. Int.* 142 (2004) 75–100.
- [18] J.D. Freeman, L.M. Rosman, J.D. Ratcliff, P.T. Strickland, D.R. Graham, E.K. Silbergeld, State of the science in dried blood spots, *Clin. Chem.* 64 (2018) 656–679.
- [19] C.P. Stove, A.S. Ingels, P.M. De Kesel, W.E. Lambert, Dried blood spots in toxicology: from the cradle to the grave? *Crit. Rev. Toxicol.* 42 (2012) 230–243.
- [20] M. Bosilkovska, C. Samer, J. Deglon, A. Thomas, B. Walder, J. Desmeules, Y. Daali, Evaluation of mutual drug-drug interaction within Geneva cocktail for cytochrome P450 phenotyping using innovative dried blood sampling

- method, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 119 (2016) 284–290.
- [21] R. Guthrie, A. Susi, A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants, *Pediatrics* 32 (1963) 338–343.
- [22] J. Deglon, F. Versace, E. Lauer, C. Widmer, P. Mangin, A. Thomas, C. Staub, Rapid LC-MS/MS quantification of the major benzodiazepines and their metabolites on dried blood spots using a simple and cost-effective sample pre-treatment, *Bioanalysis* 4 (2012) 1337–1350.
- [23] M. Wagner, D. Tonoli, E. Varesio, G. Hopfgartner, The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots, *Mass Spectrom. Rev.* 35 (2016) 361–438.
- [24] S.P. Parker, W.D. Cubitt, The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies, *J. Clin. Pathol.* 52 (1999) 633–639.
- [25] J. Deglon, L.A. Leuthold, A. Thomas, Potential Missing Steps for a Wide Use of Dried Matrix Spots in Biomedical Analysis, *Bioanalysis*, 2015.
- [26] P. Adamowicz, B. Tokarczyk, Simple and rapid screening procedure for 143 new psychoactive substances by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Drug Test. Anal.* 8 (2016) 652–667.
- [27] J.A. Michely, M.R. Meyer, H.H. Maurer, Power of Orbitrap-based LC-high resolution-MS/MS for comprehensive drug testing in urine with or without conjugate cleavage or using dried urine spots after on-spot cleavage in comparison to established LC-MSn or GC-MS procedures, *Drug Test. Anal.* 10 (1) (2017) 158–163.
- [28] L. Tretzel, A. Thomas, T. Piper, M. Hedeland, H. Geyer, W. Schanzer, M. Thevis, Fully automated determination of nicotine and its major metabolites in whole blood by means of a DBS online-SPE LC-HR-MS/MS approach for sports drug testing, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 123 (2016) 132–140.
- [29] H. Lee, Y. Park, J. Jo, S. In, Y. Park, E. Kim, J. Pyo, S. Choe, Analysis of benzodiazepines and their metabolites using DBS cards and LC-MS/MS, *Forensic Sci. Int.* 255 (2015) 137–145.
- [30] F. Versace, J. Deglon, E. Lauer, P. Mangin, C. Staub, Automated DBS extraction prior to HILIC/RP LC-MS/MS target screening of drugs, *Chromatographia* 76 (2013) 1281–1293.
- [31] R. Zakaria, K.J. Allen, J.J. Koplin, P. Roche, R.F. Greaves, Advantages and challenges of dried blood spot analysis by mass spectrometry across the total testing process, *EJIFCC* 27 (2016) 288–317.
- [32] T. Gaissmaier, M. Siebenhaar, V. Todorova, V. Hullen, C. Hopf, Therapeutic drug monitoring in dried blood spots using liquid microjunction surface sampling and high resolution mass spectrometry, *Analyst* 141 (2016) 892–901.
- [33] P. Abu-Rabie, N. Spooner, B.Z. Chowdhry, F.S. Pullen, DBS direct elution: optimizing performance in high-throughput quantitative LC-MS/MS analysis, *Bioanalysis* 7 (2015) 2003–2017.
- [34] M. Ott, K. Berbalk, T. Plecko, E. Wieland, M. Shpikova, Detection of drugs of abuse in urine using the Bruker Toxtyper™: experiences in a routine clinical laboratory setting, *Clin. Mass Spectrom.* 4–5 (2017) 11–18.
- [35] N. Fabresse, I.A. Larabi, T. Stratton, R. Mistrik, G. Pfau, G. Lorin de la Grandmaison, I. Etting, S. Grassin Delyle, J.C. Alvarez, Development of a sensitive untargeted LC-HRMS screening devoted to hair analysis through a shared MS2 spectra database: a step towards early detection of new psychoactive substances, *Drug Test. Anal.* (2018) 1–12.
- [36] V. Viette, D. Guilleme, R. Mylonas, Y. Mauron, M. Fathi, S. Rudaz, D. Hochstrasser, J.L. Veuthey, A multi-target screening analysis in human plasma using fast liquid chromatography-hybrid tandem mass spectrometry (Part I), *Clin. Biochem.* 44 (2011) 32–44.
- [37] 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.
- [38] A. Thomas, J. Deglon, T. Steimer, P. Mangin, Y. Daali, C. Staub, 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. Separ. Sci.* 33 (2010) 873–879.
- [39] F.T. Peters, O.H. Drummer, F. Musshoff, Validation of new methods, *Forensic Sci. Int.* 165 (2007) 216–224.
- [40] K.L. Lynch, CLSI C62-A: a new standard for clinical mass spectrometry, *Clin. Chem.* 62 (2016) 24–29.
- [41] K.L. Thoren, J.M. Colby, S.B. Shugarts, A.H. Wu, K.L. Lynch, Comparison of information-dependent acquisition on a tandem quadrupole TOF vs a triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for broad-spectrum drug screening, *Clin. Chem.* 62 (2016) 170–178.
- [42] M. Schulz, S. Iwersen-Bergmann, H. Andresen, A. Schmoltd, Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics, *Crit. Care* 16 (2012) R136.
- [43] Ordonnance de l'OFROU concernant l'ordonnance sur le contrôle de la circulation routière, *Art* 34 (2008).
- [44] K. Arnhard, A. Gottschall, F. Pitterl, H. Oberacher, Applying 'sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ion mass spectra' (SWATH) for systematic toxicological analysis with liquid chromatography-high-resolution tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 405–414.
- [45] T. Bruderer, E. Varesio, A.O. Hidasi, E. Duchoslav, L. Burton, R. Bonner, G. Hopfgartner, Metabolomic spectral libraries for data-independent SWATH liquid chromatography mass spectrometry acquisition, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 1873–1884.
- [46] S. Sidoli, R. Fujiwara, B.A. Garcia, Multiplexed data independent acquisition (MSX-DIA) applied by high resolution mass spectrometry improves quantification quality for the analysis of histone peptides, *Proteomics* 16 (2016) 2095–2105.
- [47] A.T. Roemmelt, A.E. Steuer, M. Poetzsch, T. Kraemer, Liquid chromatography, in combination with a quadrupole time-of-flight instrument (LC QTOF), with sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion spectra (SWATH) acquisition: systematic studies on its use for screenings in clinical and forensic toxicology and comparison with information-dependent acquisition (IDA), *Anal. Chem.* 86 (2014) 11742–11749.
- [48] A. Bilbao, E. Varesio, J. Luban, C. Strambio-De-Castilla, G. Hopfgartner, M. Muller, F. Lisacek, Processing strategies and software solutions for data-independent acquisition in mass spectrometry, *Proteomics* 15 (2015) 964–980.
- [49] X. Zhu, Y. Chen, R. Subramanian, Comparison of information-dependent acquisition, SWATH, and MS(All) techniques in metabolite identification study employing ultrahigh-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 1202–1209.

3. Conclusions du chapitre

Plusieurs stratégies analytiques adaptées aux approches de criblage basées sur l'HRMS ont été présentées dans ce chapitre. Le développement d'une méthode LC-HRMS et la comparaison des performances avec les approches classiques (GC et LC-MS) ont permis de mettre en évidence le gain de performance apporté par l'utilisation d'appareils hybrides basés sur la technologie Orbitrap. Ces techniques ont permis de réduire significativement le temps de préparation des échantillons et d'analyse sans péjorer les résultats analytiques apportant même un gain important de sélectivité.

L'étude présentée a montré des résultats surpassant ceux obtenus avec les approches utilisées en routine. La technique de criblage LC-HRMS présenté à la section 2.2 a d'ailleurs été implémentée en routine au sein de notre laboratoire, remplaçant ainsi une partie des approches classiques utilisées jusqu'alors. Les tests immunologiques sanguins, ainsi que les screenings par HPLC-DAD ont, par exemple, été abandonnés au profit de cette approche de screening LC-HRMS. À l'heure actuelle c'est environ 2000 cas de routine par an qui sont analysés par cette approche.

D'autres applications sont à envisager dans un futur proche avec ces approches. En effet, des résultats préliminaires prometteurs ont été obtenus en adaptant le processus d'extraction prévu pour l'analyse de DBS à des tissus biologiques (tissus adipeux viscéraux et sub-cutanés, foies, muscles, et cortex cérébraux) pour les approches de criblage LC-HRMS (Figure 2-5)¹⁴. Des résultats préliminaires ont également été obtenus concernant les approches qualitative/quantitative MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation*) pour la résolution de cas d'intoxication sur des matrices alternatives telles que la bile ou le contenu gastrique (données internes non publiées). Ces approches permettent de simplifier grandement la préparation d'échantillon et de s'affranchir de l'étape séparative qu'est la LC et de réduire ainsi significativement le temps d'analyse.

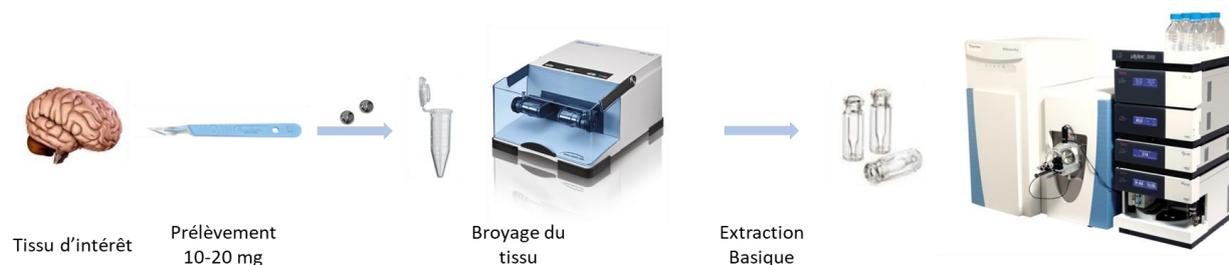


Figure 2-5 : Protocole d'extraction lié à l'approche de criblage large-échelle par HRMS adapté pour l'analyse de tissus biologiques

4. Références du chapitre

1. Aebi, B.; Bernhard, W., Advances in the use of mass spectral libraries for forensic toxicology. *J Anal Toxicol* **2002**, 26 (3), 149-56.
2. Gergov, M.; Ojanpera, I.; Vuori, E., Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography-ion spray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2003**, 795 (1), 41-53.
3. Ojanpera, I.; Kolmonen, M.; Pelander, A., Current use of high-resolution mass spectrometry in drug screening relevant to clinical and forensic toxicology and doping control. *Anal Bioanal Chem* **2012**, 403 (5), 1203-20.
4. Fuhrer, T.; Zamboni, N., High-throughput discovery metabolomics. *Curr Opin Biotechnol* **2015**, 31, 73-8.
5. Zampieri, M.; Sekar, K.; Zamboni, N.; Sauer, U., Frontiers of high-throughput metabolomics. *Curr Opin Chem Biol* **2017**, 36, 15-23.
6. Ostermann, K. M.; Luf, A.; Lutsch, N. M.; Dieplinger, R.; Mechtler, T. P.; Metz, T. F.; Schmid, R.; Kasper, D. C., MALDI Orbitrap mass spectrometry for fast and simplified analysis of novel street and designer drugs. *Clinica Chimica Acta* **2014**, 433, 254-258.
7. Versace, F.; Deglon, J.; Lauer, E.; Mangin, P.; Staub, C., Automated DBS Extraction Prior to Hilic/RP LC-M/MS Target Screening of Drugs. *Chromatographia* **2013**, 76, 1281-1293.

8. Arnhard, K.; Gottschall, A.; Pitterl, F.; Oberacher, H., Applying 'Sequential Windowed Acquisition of All Theoretical Fragment Ion Mass Spectra' (SWATH) for systematic toxicological analysis with liquid chromatography-high-resolution tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2015**, *407* (2), 405-14.
9. Bruderer, T.; Varesio, E.; Hidasi, A. O.; Duchoslav, E.; Burton, L.; Bonner, R.; Hopfgartner, G., Metabolomic spectral libraries for data-independent SWATH liquid chromatography mass spectrometry acquisition. *Anal Bioanal Chem* **2018**, *410* (7), 1873-1884.
10. Sidoli, S.; Fujiwara, R.; Garcia, B. A., Multiplexed data independent acquisition (MSX-DIA) applied by high resolution mass spectrometry improves quantification quality for the analysis of histone peptides. *Proteomics* **2016**, *16* (15-16), 2095-105.
11. Ludwig, C.; Gillet, L.; Rosenberger, G.; Amon, S.; Collins, B. C.; Aebersold, R., Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol* **2018**, *14* (8), e8126.
12. Roemmelt, A. T.; Steuer, A. E.; Poetsch, M.; Kraemer, T., Liquid chromatography, in combination with a quadrupole time-of-flight instrument (LC QTOF), with sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion spectra (SWATH) acquisition: systematic studies on its use for screenings in clinical and forensic toxicology and comparison with information-dependent acquisition (IDA). *Anal Chem* **2014**, *86* (23), 11742-9.
13. Bilbao, A.; Varesio, E.; Luban, J.; Strambio-De-Castillia, C.; Hopfgartner, G.; Muller, M.; Lisacek, F., Processing strategies and software solutions for data-independent acquisition in mass spectrometry. *Proteomics* **2015**, *15* (5-6), 964-80.
14. Lauer, E.; Widmer, C.; Versace, F.; Staub, C.; Mangin, P.; Sabatasso, S.; Augsburger, M.; Deglon, J., Body fluid and tissue analysis using filter paper sampling support prior to LC-MS/MS: application to fatal overdose with colchicine. *Drug Test Anal* **2013**, *5* (9-10), 763-72.

Chapitre 3

Approches quantitatives

Approches quantitatives

S'il existe une diversité de matrices biologiques possibles pour la réalisation des approches de criblage, le sang est clairement la matrice de référence concernant les approches quantitatives de confirmation. Comme mentionné, le sang est la seule matrice pour laquelle il est possible d'établir une relation claire entre les concentrations de substances psychoactives et l'effet sur un individu.

Dans l'optique des analyses quantitatives, le couplage LC-MS est largement la technique analytique la plus répandue. Parmi les stratégies possibles, l'utilisation du mode SRM (*selected reaction monitoring*) est considérée comme l'approche de référence sur des instruments de type quadripolaire ou QTrap®. Ces instruments sont réputés pour être robustes tout en ayant une très bonne sensibilité associée à un temps de cycle très court permettant de développer des approches multi-analytes.

Toutefois, l'utilisation de l'Orbitrap permet également de développer des approches quantitatives en mode PRM (*parallel reaction monitoring*). Ce mode d'acquisition proche dans son concept de l'utilisation du mode SRM, permet néanmoins de bénéficier des avantages technologiques apportés par l'utilisation d'instruments HRMS.

Ce troisième chapitre décrira quelques concepts théoriques liés à l'utilisation de ces approches quantitatives. Dans un 2^{ème} temps, certains aspects pratiques auxquels il a fallu faire face durant le développement de ces méthodes quantitatives seront présentés. Il sera notamment question des aspects techniques liés à l'analyse des cannabinoïdes, ainsi que ceux liés au développement de méthodes multi-analytes. Dans un 3^{ème} temps, des approches quantitatives en mode PRM seront présentés pour l'analyse de molécules liée à des cas MDV.

1. Aspects théoriques

1.1. Stratégies analytiques

Les sections suivantes seront dédiées aux analyses quantitatives par couplage LC-MS. Dans un premier temps, un bref rappel sera proposé sur le mode d'analyse SRM qui est l'approche de référence dans l'optique des analyses quantitatives LC-MS et qui est régulièrement appliquée sur des instruments de type triple-quadrupolaire (QqQ). Les caractéristiques de ce mode seront évaluées puis comparées à l'approche alternative qu'est le mode PRM sur les instruments HRMS.

1.1.1. Selected reaction monitoring (SRM)

Lors d'une analyse SRM, un précurseur d'intérêt est sélectionné par le premier quadrupôle (Q1) du système QqQ, avant d'être fragmenté en CID dans le q2. Enfin, le Q3 va permettre d'analyser un des fragments obtenus lors de cette étape de fragmentation (Figure 3-1 A). La relation entre l'acquisition de ce fragment et un ion précurseur sera défini comme une transition. Le fait d'avoir deux étapes de sélection d'un m/z d'intérêt (pour l'ion précurseur et pour la transition) est la raison de la popularité de l'utilisation de ce mode. En effet, cette approche va permettre d'obtenir une grande sélectivité et d'augmenter le rapport signal sur bruit. L'utilisation de ce genre d'instrument permet également d'obtenir une grande efficacité d'acquisition (temps de cycles courts)¹. Cette capacité à différencier le signal du bruit de fond, spécialement aux basses concentrations, permet d'augmenter la sensibilité et la gamme dynamique². Ce mode, basé sur l'acquisition de transition permet également, en théorie, de différencier deux composés coéluants. Le principe d'acquisition de transition plutôt qu'une acquisition en mode balayage, permet de dédier tout le temps d'acquisition à des données pertinentes. Cet aspect couplé aux développements électroniques des instruments modernes qui permettent de passer très rapidement d'une transition à une autre, rendant l'approche très efficace, permet la quantification d'un nombre important de composés³. Le principal défaut réside dans le temps

nécessaire au développement d'une approche SRM, ainsi qu'à son manque de flexibilité si l'ajout d'une nouvelle substance est nécessaire. En effet, des étapes d'infusion des composés d'intérêt sont nécessaires afin d'optimiser les transitions sur lesquelles sont basées la quantification. Il semble également que malgré les aspects théoriques, la précision sur la masse des fragments d'intérêt ne soit pas suffisante pour éviter la co-isolation de substances interférentes, détériorant ainsi la qualité de la quantification notamment lors de l'analyse de matrice complexes⁴⁻⁶. Ces aspects ouvrent donc la porte à l'utilisation d'alternatives, bénéficiant des récents développements technologiques.

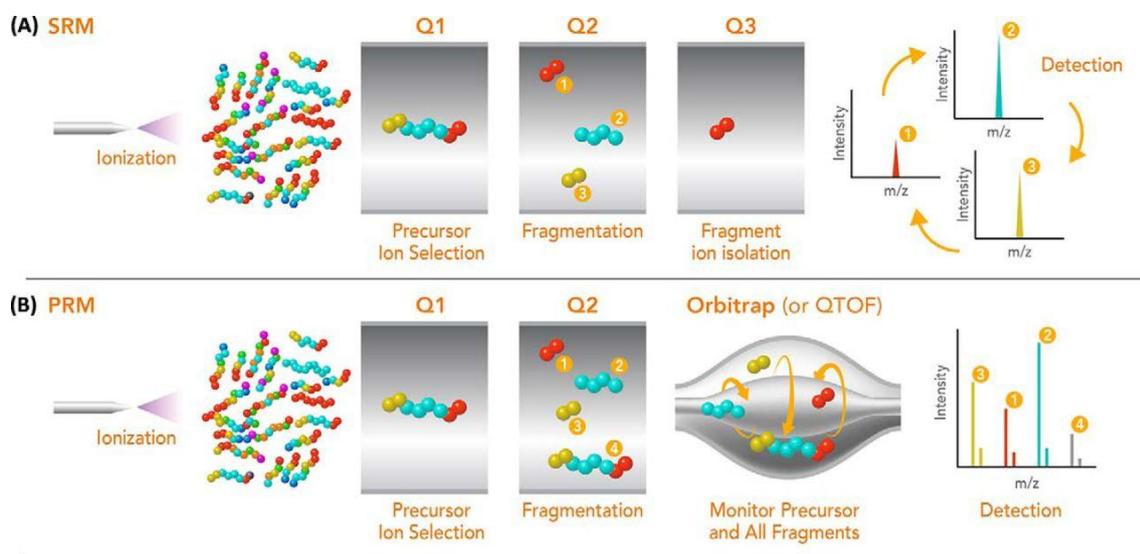


Figure 3-1 : Approches de quantification SRM développée sur des instruments de type triple quadripolaires et PRM développée sur Orbitrap⁷

1.1.2. Parallel reaction monitoring (PRM)

Le principe du mode PRM développé sur les instruments hybrides HRMS est très proche de celui du mode SRM. La configuration de l'instrument est la même à la différence que le Q3 des QqQ est remplacé par l'analyseur à haute résolution qu'est l'Orbitrap. En bref, le Q1 est également dédié à la sélection ciblée de précurseurs d'intérêt qui seront fragmentés dans une cellule de fragmentation à haute énergie (high-energy collisional dissociation ou HCD) (q2). Les fragments seront ensuite analysés par l'Orbitrap faisant office de Q3⁸. Cette utilisation présente certaines particularités en plus du gain de sélectivité apporté par la haute résolution

spectrale. Premièrement, le mode PRM (aussi appelé MRM-HR, pour *multiple reaction monitoring high-resolution* en fonction du type de technologie HRMS) permet l'analyse de l'ion précurseur ainsi que de l'ensemble des fragments de celui-ci en simultané (Figure 3-1).

Une comparaison de ces deux approches permet de se rendre compte qu'elles possèdent des performances similaires en termes de linéarité, de gamme dynamique, de précision et de répétabilité⁹. Cependant, comme mentionné, l'usage d'une approche HRMS par nature permet d'augmenter la sélectivité¹⁰. Le remplacement d'un quadripôle par une trappe ionique permet également d'échantillonner les précurseurs peu abondants pendant un temps plus important menant à un gain de sensibilité¹¹. Enfin, le principe d'acquisition de la totalité des fragments d'un précurseur donné facilite le développement d'approches multi-analytes. En effet, seul le rapport m/z du précurseur est nécessaire comme connaissance *a priori* pour le développement d'une méthode.

Les approches PRM ont notamment été largement décrites pour des applications de protéomique¹²⁻¹³. Le développement de méthodes utilisant ce mode de quantification pour l'analyse de petites molécules gagne également en popularité. Des études ont reporté l'utilisation de ce mode pour des analyses métabolomiques non-ciblées, ainsi que la quantification de stérols¹⁴⁻¹⁵. Des analyses de médicaments basées sur l'utilisation de ce mode de quantification ont également été publiées. Les quantifications d'un anti-cancéreux (abiratérone), d'un traitement pour l'hépatite C (beclabuvir), ainsi que d'anticoagulants ont ainsi été reportées¹⁶⁻¹⁸.

Aux vues de ces considérations, il est raisonnable de penser que l'utilisation du mode PRM pour les analyses toxicologiques présente une alternative solide aux approches de référence. Plusieurs approches quantitatives basées sur l'utilisation du mode PRM ont donc été développées avec succès au cours de cette thèse.

1.2. Validation de méthode

De nombreuses recommandations sont disponibles concernant la procédure à suivre pour la validation d'une méthode analytique. Ces recommandations sont d'ailleurs toutes relativement comparables.

En ce qui concerne les approches quantitatives, les critères de validation d'une méthode sont clairement définis¹⁹⁻²⁰. Dans les approches décrites dans cette thèse, la validation a été adaptée des recommandations de la Société Française des Sciences et des Techniques Pharmaceutiques (SFSTP)²¹.

L'évaluation de l'exactitude, comprenant l'étude de la justesse et de la précision, a été effectuée par l'utilisation d'un traitement statistique basé sur l'analyse de la variance (ANOVA). Cette évaluation est basée sur 3 jours d'analyses non consécutifs pendant lesquels des contrôles qualités internes (IQCs) sont mesurés à 4 niveaux de concentration en 4 réplicas par niveau. Ces analyses permettent également de déterminer la linéarité dans pour une gamme de concentrations précise et la LOQ de la méthode. L'exactitude représente l'incertitude de mesure totale ; elle comprend 2 paramètres. La justesse représente le biais ou l'erreur systématique, elle se calcule en comparant une différence en pourcent entre les valeurs obtenues pour les différents QCs et les valeurs théoriques attendues. La précision, quant à elle, peut être définie comme l'erreur aléatoire ou la déviation standard et contient deux composantes. La répétabilité (ou déviation standard) représente la fidélité d'une analyse réalisée dans des conditions similaires, à savoir par le même opérateur, utilisant les mêmes solvants et réactifs. La fidélité intermédiaire représente la précision d'une analyse réalisée dans différentes conditions, à savoir sur plusieurs jours non consécutifs et avec différentes solutions. La combinaison de la justesse et de la précision peut être représentée de façon graphique à l'aide du profil d'exactitude (Figure 3-2). La justesse est représentée par les lignes rouges continues, alors que la précision est représentée

par la ligne bleue pointillée. Les lignes rouges pointillées représentent la limite d'exactitude tolérée de $\pm 20\%$

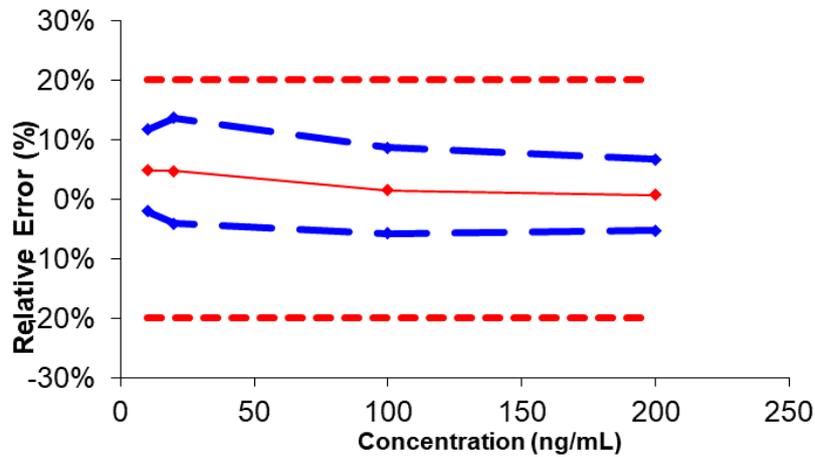


Figure 3-2 : Exemple de profil d'exactitude. La justesse est représentée par la ligne rouge continue, alors que la fidélité est représentée par la ligne bleue pointillée. La ligne rouge pointillée représente la limite d'exactitude tolérée de $\pm 20\%$

La linéarité se définit comme la capacité de la méthode à rendre un résultat proportionnel à la concentration réelle de l'échantillon sur l'intervalle de dosage. Pour ce faire, un modèle de régression linéaire basée sur la méthode des moindres carrés est appliqué sur la droite obtenue en considérant les valeurs de concentrations obtenues en fonction des concentrations attendues.

Les composés présents dans les matrices biologiques telles que le sang peuvent créer des effets d'enrichissements ou de suppression d'ions, spécialement lors du couplage LC-MS utilisant l'ESI comme mode d'ionisation. Pour s'assurer de la robustesse d'une approche quantitative, il convient d'évaluer ces effets de matrice (ME) ainsi que le rendement d'extraction (*recovery* ou RE) des divers composés d'intérêt. La stratégie la plus couramment utilisée pour déterminer ces aspects est celle décrite par Matuszewski²². Cette stratégie nécessite la préparation de 3 groupes d'échantillons en 5 réplicas à deux niveaux de concentrations. Un groupe A est composé des analytes sous forme de standards. Le groupe B est représenté par des échantillons blancs de la matrice qu'on extrait selon la procédure établie avant de rajouter les solutions standards. Enfin le groupe C représente des échantillons blancs de matrice auxquels sont ajoutés

les standards avant l'étape d'extraction. Le rapport B/A permettra de calculer les ME alors que le rapport C/B permettra d'obtenir la valeur de RE.

Enfin, la stabilité a été établie sous différentes conditions en utilisant 5 réplicas à deux niveaux de concentration. Parmi les conditions testées, les échantillons ont subi 3 cycles de congélation/décongélation (*freeze-thaw*) à -20°C, ils ont également été laissés 6 heures à température ambiante (*bench-top*). La stabilité sur le passeur d'échantillon (*autosampler*) a également été mesurée (24h, 5°C). Enfin la stabilité à court terme (*short-term*) a été évaluée en conservant les échantillons pendant 1 semaine à -20°C.

2. Applications

Lors du déroulement de ce travail, l'ensemble des stratégies quantitatives effectuées au laboratoire étaient réalisées avec des méthodes classiques, à savoir grâce au couplage GC-MS dans certains cas et majoritairement avec des approche LC-MS en SRM sur des instruments de type quadripolaire ou QTrap®. Les premiers développements de méthodes quantitatives en PRM ont été réalisés avec pour objectif de décharger certains instruments et de posséder une méthode de *back-up* en cas de panne de l'un ou l'autre des systèmes. Les premiers développements se sont donc concentrés sur la mise à jour d'approches de routine sur un instrument hybride de type QExactive. À la suite des premiers résultats prometteurs de ces développements, il a été décidé d'utiliser les performances instrumentales afin de regrouper les procédures d'analyse de diverses classes de molécules liées aux cas MDV en une seule approche afin de simplifier le travail de laboratoire.

Les sections suivantes sont dédiées à la présentation de ces développements.

2.1. Analyse des cannabinoïdes

2.1.1. Présentation de la problématique

Le cannabis est une plante complexe qui contient plus de 400 composés dont au moins 60 cannabinoïdes²³. Son usage est très largement répandu dans le monde et sa consommation a tendance à devenir de plus en plus culturellement et légalement acceptable dans plusieurs pays²⁴. En dehors de ses effets psychoactifs, plusieurs hypothèses concernant des usages cliniques du cannabis ont été décrits et publiés. Son usage a été proposé dans le cadre de la recherche pour le traitement de multiples pathologies comme la sclérose en plaque, l'épilepsie, les douleurs neuropathiques, l'arthrite, les nausées et vomissements, la stimulation de l'appétit, l'anxiété et les désordres du sommeil, la psychose, les glaucomes, et le syndrome de la Tourette²⁵⁻²⁸. D'un point de vue toxicologique, on s'intéressera principalement à l'acide tétrahydrocannabinolique (THC-A) et l'acide cannabidiolique (CBD-A) des composés sans effets psychoactifs qui sont transformés respectivement en Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC) et cannabidiol (CBD) sous l'effet de la chaleur²⁹. C'est le THC qui est responsable de la plupart des effets psychoactifs, de ce fait, sa quantification dans le sang est crucial pour les aspects de toxicologie clinique et forensique, afin d'interpréter précisément son impact sur le comportement³⁰.

Chez les humains, le THC est principalement métabolisé dans le foie par le cytochrome P450, afin de former le 11-hydroxy-tétrahydrocannabinol (THC-OH) et le 11-nor-9-carboxy-tétrahydrocannabinol (THC-COOH)³¹. La quantification de ces trois substances permet également l'application de modèles mathématiques aptes à prédire le moment de la consommation³².

D'un point de vue analytique, les propriétés physico-chimiques des cannabinoïdes compliquent leur détection par LC-MS dans les fluides biologiques. De plus, le seuil légal concernant la quantification du THC dans le sang complet, dans le cadre de la circulation routière, est

relativement bas (1.5 ng/ml), ce qui nécessite des méthodes sensibles. Cet aspect est d'autant plus important que ces substances ont du mal à s'ioniser, ce qui complique la détection.

D'un point de vue du choix de la méthode analytique, les approches GC-MS sont actuellement les méthodes de référence pour l'analyse des cannabinoïdes³³⁻³⁵. Toutefois, une étape préliminaire de dérivation est nécessaire pour améliorer la stabilité thermique et la volatilité des cannabinoïdes avant l'analyse augmentant de façon considérable le temps nécessaire à la préparation d'échantillons.³⁶ A l'inverse, le développement et l'amélioration de ces approches LC-MS ont permis l'émergence de méthodes sensibles et robustes pour l'analyse des cannabinoïdes, réduisant sensiblement le temps nécessaire à la préparation d'échantillon et à l'analyse^{29, 37}. L'article publié dans le *Journal of Analytical Toxicology* qui s'appuie sur l'utilisation du mode PRM pour la quantification rapide des cannabinoïdes en LC-HRMS, est présenté ci-après.

**2.1.2. Article : Parallel reaction monitoring-based quantification of
cannabinoids in whole blood**



Article

Parallel Reaction Monitoring-Based Quantification of Cannabinoids in Whole Blood

Timothée Joye^{1,2}, Christèle Widmer¹, Bernard Favrat³,
Marc Augsburger¹ and Aurélien Thomas^{1,2,*}

¹Unit of Forensic Toxicology and Chemistry, CURML, Lausanne University Hospital-Geneva University Hospitals, 4 Chemin de la Vulliette, 1000, Lausanne, Switzerland,

²Faculty Unit of Toxicology, CURML, Lausanne University Hospital, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, 4 Chemin de la Vulliette, 1000, Lausanne, Switzerland and

³Unit of Medicine and Traffic Psychology, University Centre of Legal Medicine, Lausanne-Geneva, 26 Rue Saint-Martin, 1005, Lausanne, Switzerland

*Author to whom correspondence should be addressed. Email: Aurelien.Thomas@chuv.ch

Abstract

Cannabis is the most consumed drug of abuse, making it the primary target for identification and quantification in human whole blood regarding forensic and clinical toxicology analyses. Among biological matrices, blood is the reference for toxicological interpretation. A highly sensitive and selective liquid chromatography (LC) hyphenated with high-resolution mass spectrometry (HRMS) was developed for the quantification of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxytetrahydrocannabinol (THC-OH), 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) and cannabidiol (CBD). Those cannabinoids were extracted from 1 mL of whole blood by a simple liquid–liquid extraction (LLE) in acidic conditions. HRMS was performed on an Orbitrap-based instrument using its trapping capabilities and increased selectivity for parallel reaction monitoring (PRM) quantification in positive polarity with a negative polarity switching for THC-OH and THC-COOH. Although selected reaction monitoring (SRM) and PRM-targeted methods have similar performance in terms of linearity, dynamic range, precision and repeatability, Orbitrap-based PRM provides a higher specificity due to the use of high-resolution mode separating background ions from the targeted molecules. The method was fully validated according to guidelines set forth by the “Société Française des Sciences et des Techniques Pharmaceutiques” (SFSTP). Trueness was measured below 107% for all tested concentrations. Repeatability and intermediate precision were found to be lower than 12% while the assay was found to be linear in the concentration range of 0.4–20 ng/mL for THC, THC-OH and CBD and of 2–100 ng/mL for THC-COOH. Recovery (RE) and matrix effect (ME) ranged from 70.6 to 102.5% and from –40 to 6.6%, respectively. The validated method provides an efficient procedure for the simultaneous and rapid quantification of cannabinoids in PRM mode providing an alternative over classical SRM.

Introduction

Cannabis is a complex plant containing more than 400 compounds including at least 60 cannabinoids (1). Cannabis is the most widespread drug of abuse in the world, and its consumption is gaining acceptance both culturally and legally in many countries

(2). Despite its psychoactive effects, various uses of cannabis have been described in the clinical world. Indeed, its use has been proposed for the treatment of multiple pathologies, such as multiple sclerosis, epilepsy, neuropathic pain, arthritis, nausea and vomiting, appetite stimulation, anxiety and sleep disorders, psychosis, glaucoma and

Tourette syndrome (3–7). Cannabis plant extracts contain many substances including tetrahydrocannabinolic acid (THC-A) and cannabidiolic acid (CBD-A) non-psychoactive substances that are being decarboxylated into Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) under heat (8). THC is responsible for most of the psychoactive effects, and in this context, its accurate quantification is crucial for forensic and clinical purposes to realistically determine its behavioral impact (9).

In humans, THC is mainly metabolized in the liver by cytochrome P450 into two main metabolites: 11-hydroxytetrahydrocannabinol (THC-OH) and 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) (10). The quantification of THC and its two main metabolites in plasma allows the application of mathematical models predicting the time of marijuana consumption (11). In the past years, gas (GC) and high-performance liquid (HPLC) chromatography approaches coupled with mass spectrometry (MS) have been the gold standard regarding cannabinoids analyses (12–14). The heating procedure required for GC analyses leads to unavoidable decarboxylation of the cannabinoid's acids (14). Therefore, a preliminary derivatization step is required to improve the thermal stability and volatility of the compounds of interest (8, 15). On the other hand, LC analyses are performed at limited temperature preserving the cannabinoids acids in the extracted sample (15). The development of LC–MS systems has allowed the emergence of sensitive and robust methods for the detection of cannabinoids reducing the sample preparation and injection time in a significant manner (16).

Improvements regarding instrumentation and bioinformatics have broadened the number of possible MS-based analytical strategies (17, 18). High-resolution (HR) MS-based parallel reaction monitoring (PRM) has emerged as an alternative method of targeted quantification especially in the field of proteomics. Up to now, selected reaction monitoring (SRM) performed on either triple-quadrupole (QQQ) or hybrid quadrupole-linear ion trap (QTrap) mass spectrometers has been the gold standard regarding targeted quantitative analyses (19, 20). SRM and PRM targeted methods have similar performance in terms of linearity, dynamic range, precision and repeatability (21). Yet, among other advantages, Orbitrap-based PRM provides a higher specificity due to the use of high-resolution mode separating background ions from the targeted molecules (22). An Orbitrap instrument, by nature, is a trapping device where low abundant precursors can be sampled for longer periods of time to measure low abundant precursors and increase the sensitivity (23). PRM implies the acquisition of all selected precursors' fragments facilitating multi-fragment approaches. Therefore, very limited *a priori* information (only precursor ion mass-to-charge ratio) is required regarding the targeted analytes making this approach more flexible.

PRM applications have been widely described regarding proteomics approaches (17, 22–24); the use of such approaches for the quantitation of small molecules receives a growing interest. Targeted metabolite quantitation in PRM has been described in parallel of untargeted metabolomics (25). Studies in PRM mode have also been reported for the quantitation of drugs such as anticancer (abiraterone) (26) and antiviral drug for the treatment of hepatitis C (beclabuvir) in plasma (27). Anticoagulant rodenticides (28) and sterols quantitation (29) have also been performed using this analytical strategy.

Herein, we present a fully developed and validated procedure for cannabinoids quantification in whole blood, being the matrix of choice regarding driving under the influence of drugs (DRUID) in Switzerland. The validated procedure is performed on a LC–HRMS

system seizing the advantages of PRM that have been assessed for proteomic studies for drugs of abuse.

Materials and Methods

Standards and reagents

Water, methanol, formic acid (FA) and ammonium formate were purchased from Biosolve, and n-hexane, ethyl acetate and acetic acid were purchased from Sigma-Aldrich. Drug standards were furnished by Cerilliant or Lipomed, at either 1 mg/mL or 100 μ g/mL. Blank lyophilized whole blood was acquired from ACQ Science.

Solution preparation

A standard solution of THC, THC-OH and CBD was prepared at 100 ng/mL for calibration curve and quality control preparation. In the same purpose, a solution of THC-COOH at 1 μ g/mL was made. Finally, a solution containing THC- d_3 , THC-OH- d_3 , CBD- d_3 at 100 ng/mL and THC-COOH- d_9 at 500 ng/mL was prepared as internal standard (IS).

Calibration samples were prepared by spiking lyophilized whole blood at 7 concentration levels ranging from 0.4 to 20 ng/mL for THC, THC-OH and CBD and from 2 to 100 ng/mL for THC-COOH.

Sample pre-treatment

One hundred microliters of IS was spiked and evaporated to dryness before adding 1 mL of whole blood. After the addition of 200 μ L of acetic acid (10%), liquid–liquid extraction was performed with 5 mL of hexane/ethyl acetate (9:1, v/v) by slow horizontal shaking for 10 min. After centrifugation for 10 min at 4350 rpm, the upper organic phase was transferred into a glass tube and evaporated to dryness under nitrogen. Reconstitution was performed by adding 50 μ L of methanol; after vortexing, 50 μ L of water was added, and 10 μ L was injected into the LC–MS system.

LC–HRMS method

Chromatographic separation was performed using a Thermo Scientific Ultimate 3000 LC system with a Phenomenex 2.6 μ m C18 (2.1 \times 5 mm) maintained at 45°C. Mobile phase A consisted of ammonium formate 5 mM pH 7.7 while mobile phase B consisted of methanol with 0.1% FA. Phase B was ramped linearly from 50 to 95% over 5 min. The column was washed at 98% of B for 1 min, followed by a 2-min re-equilibration at 2% of B for a total analysis time of 8 min with a 300 μ L/min flowrate. The LC was coupled to a Q Exactive Plus system (Thermo Scientific, Bremen, Germany) via a heated electro spray ionization (ESI) source. The ionization spray voltage was set to 3 kV, sheath gas flowrate to 40 and auxiliary gas flowrate to 10 (both in arbitrary unit). The method operated in PRM using an inclusion list for the specific detection of THC and CBD in positive polarity and THC-OH and THC-COOH in negative polarity with HCD fragmentation using NCE at 50 eV. Polarity was set to positive for the first 4.6 min and then switched to negative for the last 3.4 min. Resolution was set at 17,500 for the fragmentation experiments with an AGC target of 1e5 and a maximum IT of 100 ms.

Method validation

The performance of the analytical process was evaluated according to the validation criteria based on the “Société Française des Sciences et des Techniques Pharmaceutiques” (SFSTP) directives regarding bioanalytical methods and adapted to our specific requirements

Table 1. Validation Results for Trueness, Precision and Linearity (k is the Number of Concentration Levels, n the Number of Repetitions by Levels, and p the Number of Non-consecutive Days)

Trueness (%)				
$(k = 4; n = 4; p = 3)$				
Calibration level (ng/mL)	THC	CBD	THC-OH	THC-COOH
0.4	100.2	102.2	103.1	-
1	101.9	101.5	98.7	-
2	-	-	-	106
5	-	-	-	102.9
10	100.6	99.7	99.6	-
20	100.2	99.2	99.5	-
50	-	-	-	101.7
100	-	-	-	101.6
Precision				
Repeatability/intermediate precision (RSD %)				
0.4	8.3/8.9	8.1/8.1	7.0/7.0	-
1	3.3/9.9	3.9/11.2	6.9/9.7	-
2	-	-	-	2.6/4.9
5	-	-	-	3.8/4.7
10	2.9/6.5	2.8/7.2	4.1/4.8	-
20	1.6/2.2	2.5/4.3	3.0/3.0	-
50	-	-	-	1.6/1.8
100	-	-	-	1.5/3.6
Linearity				
Range (ng/mL)	0.4–20	0.4–20	0.4–20	2–100
Slope	1.0014	0.9917	0.9945	1.013
Intercept	0.0155	0.0252	0.0058	0.1066
R^2	0.9981	0.9964	0.9979	0.9987
LOQ (ng/mL)	0.4	0.4	0.4	2

(30–32). The validation was carried out over three non-consecutive days ($p = 3$). The method's precision and trueness were established using a statistical treatment based on variance analysis (ANOVA).

During this validation procedure, the analysis of both calibration (Cal) and quality control (QC) whole blood samples was performed. Both the Cal and the QC were prepared in quadruplicate ($n = 4$). Cal were prepared at seven concentration levels ($k = 7$; Cal = 0, 0.4, 1, 2, 5, 10 and 20 ng/mL for THC, THC-OH and CBD and Cal = 0, 2, 5, 10, 25, 50, 100 ng/mL for THC-COOH) while QC were prepared independently at four concentration levels ($k = 4$; Cal = 0.4, 1, 10 and 20 ng/mL for THC, THC-OH and CBD and Cal = 2, 5, 50 and 100 ng/mL for THC-COOH). The samples were then analyzed according to the procedure detailed earlier. This way, trueness, precision, accuracy, linearity, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were determined.

Selectivity was assessed analyzing six different blank bloods and investigating potential interfering peaks for the reaction monitoring of the substances of interest. Recovery (RE) and matrix effect (ME) were evaluated according to the approach described by Matuszowski et al. (33); five replicates of three samples sets were prepared including the four substances of interest at two concentration levels (1 and 10 ng/mL for THC, THC-OH and CBD and 5 and 50 ng/mL for THC-COOH). Sample set 1 represented neat standards spiked after extraction. Sample set 2 represented blank matrix spiked after extraction, while sample set 3 represented blank matrix spiked before extraction. Specificity was established as the absence of interfering peaks at the retention time (RT) of the analyte and IS. Stability was also evaluated at the two concentration levels used for ME and RE

evaluation in five replicates. Three cycles of freeze-thaw (-20°C), benchtop (6 h, room temperature), autosampler (24 h, 5°C) and short-term (1 week, -20°C) conditions were performed in this assay (1, 2). Longer-term stability was evaluated by comparing real cases analysis in PRM mode with MRM analysis performed on the same samples between 2 and 4 months before after a conservation at -20°C .

Finally, 187 DRUID samples from forensic toxicology were analyzed using both the developed procedure and an MRM-based published one used in routine using the same extraction procedure (12, 34, 35).

Results and Discussion

Method development

Cannabis is the most consumed drug of abuse, and cannabinoid-based medication use is growing reinforcing the need for accurate, sensitive and robust cannabinoid quantification. Cannabinoid quantification is quite challenging mainly due to the high retention on a reversed-phase column, and the poor extraction yield due to its binding to active surfaces/matrices (36). In this study, THC, THC-OH, THC-COOH and CBD being the primary cannabinoids targeted for forensic analyses were selected to successfully develop an Orbitrap-based PRM quantification method with a sensibility in adequation with the forensic threshold. The process involves a single LLE in acidic conditions as a simple sample preparation (35, 37). The procedure's optimization allows the rapid analysis of those molecules of interest (8 minutes per run) and an

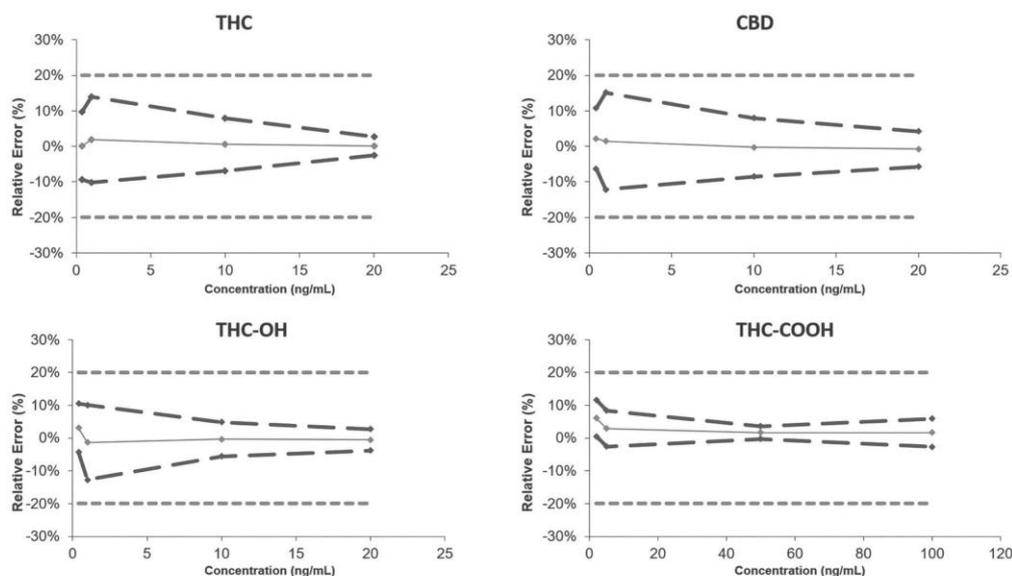


Figure 1. Accuracy profiles for THC, CBD, THC-OH and THC-COOH with a weighted linear regression model of $1/X$. Trueness is represented by a continuous line, while the upper and lower accuracy limits and the tolerance limits are represented by dashed lines and dotted lines, respectively.

Table II. Results for Recovery and Matrix Effect Performed at Low- and High-Quality Control Concentrations

Matrix effect and recovery	Low concentration				High concentration			
	THC (1 ng/mL)	CBD (1 ng/mL)	THC-OH (1 ng/mL)	THC-COOH (5 ng/mL)	THC (10 ng/mL)	CBD (10 ng/mL)	THC-OH (10 ng/mL)	THC-COOH (50 ng/mL)
ME (%)	-34.0	-22.4	6.4	5.2	-40	-21.0	6.60	4.70
CV (%)	18.7	11.3	10.5	12.3	10.0	8.3	16.9	12.3
RE (%)	70.6	75.3	90.7	100.2	87.2	85.0	93.6	102.5
CV (%)	7.0	7.0	13.2	9.3	15.8	13.0	5.4	9.6

increase in the signal to noise ratio (S/N) compared to the MRM analyses (34). The method transfers the widely described PRM advantages for proteomic for small molecule quantification and confirms that PRM is a solid alternative towards classical MRM analysis.

Method validation

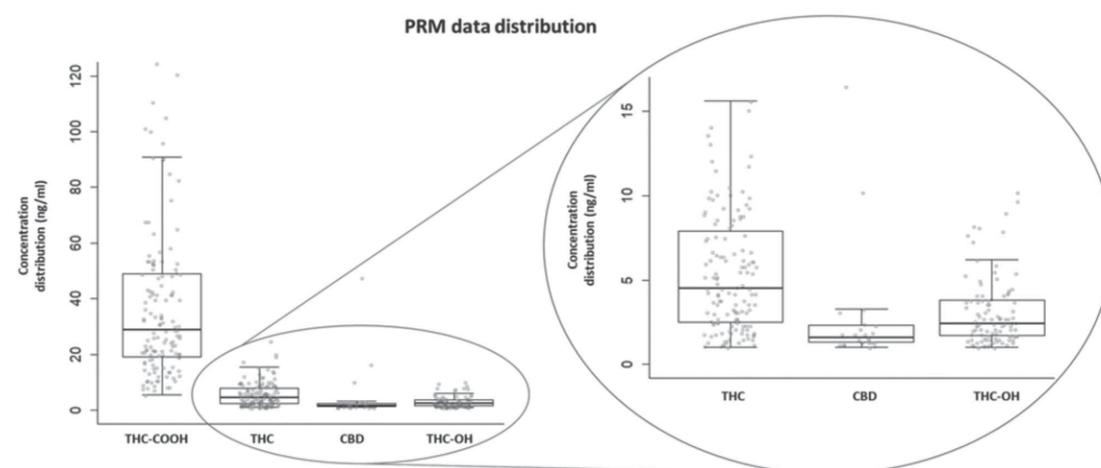
In preliminary experiments, a simple linear regression model based on the least square method and different weighted linear regression models were evaluated. The goal was to select the most suitable response function by calculating the existing relationship between drug to IS ratio and the expected concentration. The best results were obtained using a regression model with a weight of $1/X$, considering the relationship between the natural logarithm of the response variance and the expected concentration (12). As expected, this regression model showed an interest to increase the statistical weight of the lower concentrations, the simple linear regression model being generally more influenced by the upper concentrations.

Trueness and precision

As previously mentioned, trueness and precision were determined by independent QC samples at four different concentration levels injected in quadruplicate over three non-consecutive days. The accuracy refers to the total error and comprises two components (38). Trueness indicates the “bias” or systematic errors and can be calculated by comparing the percentage difference between the experimental and the expected theoretical values. The systematic error of the developed method varied from 0.2 to 6% (Table I). Precision can be referred to random errors or standard deviation. Two parameters were calculated regarding precision including the relative standard deviation (repeatability) and the between day variability (intermediate precision) (39). Repeatability ($R_{R,S,D}$) represents the precision under similar conditions when analyses are performed by the same operator using the same reagents and samples. The intermediate precision ($IP_{R,S,D}$) is calculated using analyses of the same samples under different conditions (different days and reagents). For both those parameters, values were comprised between 1.5 and 11.2% (Table I).

Table III. Three Cycles of Freeze-Thaw (−20°C), Benchtop (6 h, Room Temperature), Autosampler (24 h, 5°C) and Short-Term (1 week, −20°C) Conditions Were Performed in This Stability Assay at Low- and High-Quality Control Concentrations

Stability	Low concentration				High concentration			
	THC (1 ng/mL)	CBD (1 ng/mL)	THC-OH (1 ng/mL)	THC-COOH (5 ng/mL)	THC (10 ng/mL)	CBD (10 ng/mL)	THC-OH (10 ng/mL)	THC-COOH (50 ng/mL)
Auto-sampler (%)	99.0	99.4	101.4	98.8	99.0	98.5	104.0	96.7
Freeze-thaw (%)	99.1	100.4	97.7	97.7	102.1	93.5	98.0	95.4
Bench-top (%)	94.1	97.5	97.3	95.5	92.2	99.4	97.5	92.8
Short term (%)	97.0	92.4	98.8	92.0	99.2	95.6	92.1	95.1

**Figure 2.** Concentration distribution of the 139 real samples PRM analysis for the four cannabinoids of interest.

Accuracy considers the total error including both the systematic and the random errors. Accuracy profiles illustrate the uncertainty measurement represented using trueness, confidence limits at 95% of the total measurement error (precision) calculated for each concentration level and the acceptance limits of $\pm 20\%$ suggested for method validation at the LLOQ ($\pm 15\%$ at other concentration levels) (30). All analyzed QCs were within the acceptance limits (Figure 1).

Linearity and LOQ

Linearity is defined as the method capacity to deliver a result proportional to the concentration within the sample (12). A linear regression model based on the least square method was applied on the fit of the back-calculated concentration as a function of the expected concentration. Values for the coefficient of determination were above 0.9964 for the four substances of interest (Table I). Slope values were comprised between 0.9917 and 1.013 confirming the method linearity within the concentration ranges of interest. For the method forensic purpose, LOQ was fixed at 0.4 ng/mL for THC, CBD and THC-OH and 2.5 ng/mL for THC-COOH. At those concentrations, the accuracy profiles were comprised within the $\pm 20\%$ acceptance limit at LLOQ.

Selectivity, recovery and matrix effect

Selectivity is defined as the method ability to measure unambiguously and to differentiate the analyte of interest towards potential

interferences. No effects were observed extracting and analyzing six different blank blood samples meaning that no interfering compounds did impair the detection nor the quantification of the substances of interest. One of the reasons might be the use of HRMS, since by improving the mass resolution power, this technology increases the selectivity, therefore reducing the number of potential interferences (40). Nevertheless, selectivity is often challenged due to ion suppression or enhancement caused by the matrix especially using ESI ion sources (33). Therefore, the assessment of such ME is crucial especially regarding quantitative approaches. ME was determined to be between 40% (10% CV) of ion suppression for THC in high concentration and 6.6% of ion enhancement (16.9% CV) for THC-OH. The values for both ME and RE are summarized in Table II. Those results characterized by an ion suppression for THC and CBD are in adequation with the existing literature (41–43). Those relatively high values of ME can be due to residual matrix components in the final extract affecting the ionization process. The addition of an isotopically labeled IS with similar physico-chemical properties is used herein to efficiently compensate those ME.

Stability

The results of stability evaluation are presented in Table III. Stability of the method was assessed at two different concentrations (1 and 10 ng/mL for THC, CBD and THC-OH and 5 and 50 ng/mL for THC-COOH). The mean stability in terms of accuracy ranged from

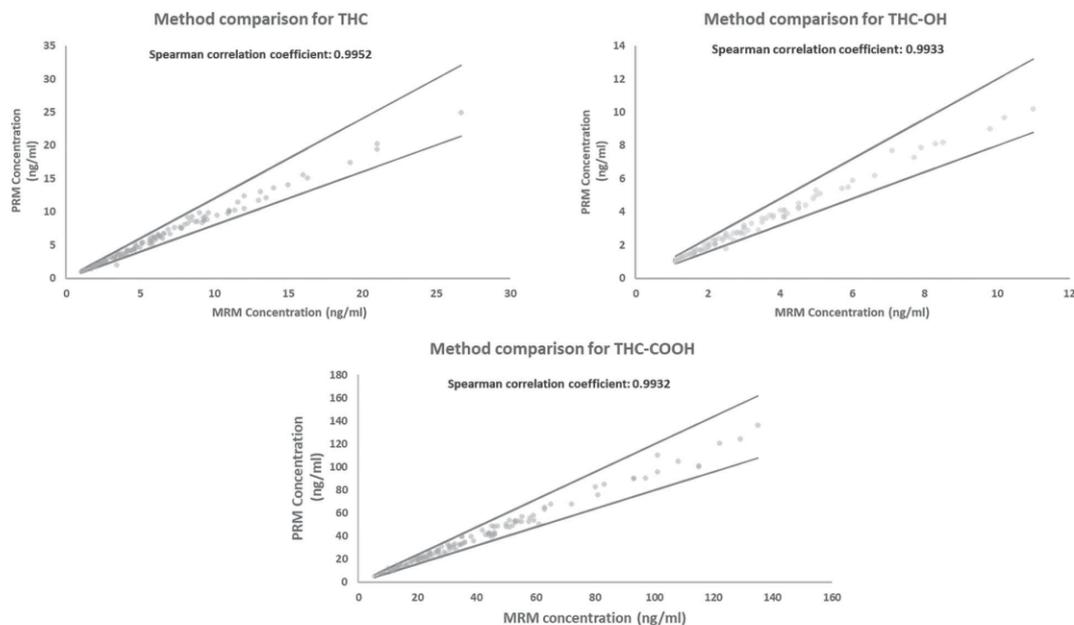


Figure 3. Method comparison for THC, THC-OH and THC-COOH. PRM measured concentrations are plotted as a function of MRM measured concentration using a similar linear regression model. The red lines represent the tolerance limits.

96.7 to 104%, 93.5 to 102.1%, 92.2 to 99.4% and 92 to 99.2% for auto-sampler (24 h, 5°C), 3 cycles of freeze-thaw (−20°C), bench-top (6 h, room temperature) and short-term stability (1 week, −20°C) respectively.

Real sample analysis

Among the 187 analyzed samples, THC was above the used limits of decision (1 ng/mL for THC, CBD and THC-OH and 5 ng/mL for THC-COOH) in 139 cases while this number of positive cases decreases to 136, 99 and 25 regarding THC-COOH, THC-OH and CBD, respectively. The concentration distribution of all four molecules of interest after PRM analysis is represented in Figure 2. Results comparisons between the described method and a previously published MRM method (35) are represented in Figure 3 for THC, THC-OH and THC-COOH. CBD was measured above the used limits of detection in only 25 cases; therefore, we did not represent the correlation regarding CBD in Figure 3. A good correlation was observed between the PRM and the MRM values. The relative standard deviation was lower than 20% for all four substances in almost every compared sample confirming the suitability of PRM quantitative approaches for small molecules analysis. The calculated Spearman correlation coefficients measuring the linear correlation between the two conditions were above 0.993 for all four measured cannabinoids.

Conclusion

A rapid, sensitive, reproducible and robust method was developed for the detection and quantification of THC, THC-OH, THC-COOH and CBD. This study present PRM as an interesting alternative to MRM classical quantitative approaches constituting a true force for

toxicological analysis with forensic purpose. It confirms that MRM and PRM targeted methods provide comparable sensitivity, linearity, dynamic range, precision and repeatability (22). PRM analyses give access to full MS-MS spectra not focusing on a specific transition allowing to work without *a priori* knowledge of the fragments of interest and leading to an increased control over the quantification experiment. Exploiting Orbitrap high resolving power and their trapping capabilities offer a clear advantage being an alternative over triple quadrupole instruments.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from the Swiss Federal Office of Public Health (contract no. 14.013792.204.0001/1300).

Conflict of interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

1. Ravula, A., Chandasana, H., Setlow, B., Febo, M., Bruijzeel, A.W., Derendorf, H. (2018) Simultaneous quantification of cannabinoids tetrahydrocannabinol, cannabidiol and CB1 receptor antagonist in rat plasma: An application to characterize pharmacokinetics after passive cannabis smoke inhalation and co-administration of rimonabant. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 160, 119–125.
2. Jamwal, R., Topletz, A.R., Ramratnam, B., Akhlaghi, F. (2017) Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry for simple and simultaneous quantification of cannabinoids. *Journal of Chro-*

- matography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1048, 10–18.
- Koppel, B.S., Brust, J.C., Fife, T., Bronstein, J., Youssof, S., Gronseth, G. et al. (2014) Systematic review: Efficacy and safety of medical marijuana in selected neurologic disorders: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 82, 1556–1563.
 - Borgelt, L.M., Franson, K.L., Nussbaum, A.M., Wang, G.S. (2013) The pharmacologic and clinical effects of medical cannabis. *Pharmacotherapy*, 33, 195–209.
 - Blake, D.R., Robson, P., Ho, M., Jubb, R.W., McCabe, C.S. (2006) Preliminary assessment of the efficacy, tolerability and safety of a cannabis-based medicine (Sativex) in the treatment of pain caused by rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 45, 50–52.
 - Whiting, P.F., Wolff, R.F., Deshpande, S., Di Nisio, M., Duffy, S., Hernandez, A.V. et al. (2015) Cannabinoids for medical use: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Medical Association*, 313, 2456–2473.
 - Baron, E.P. (2015) Comprehensive review of medicinal marijuana, cannabinoids, and therapeutic implications in medicine and headache: What a long strange trip it's been. *Headache*, 55, 885–916.
 - Burnier, C., Esseiva, P., Roussel, C. (2019) Quantification of THC in Cannabis plants by fast-HPLC-DAD: A promising method for routine analyses. *Talanta*, 192, 135–141.
 - Lupica, C.R., Riegel, A.C., Hoffman, A.F. (2004) Marijuana and cannabinoid regulation of brain reward circuits. *British Journal of Pharmacology*, 143, 227–234.
 - Watanabe, K., Yamaori, S., Funahashi, T., Kimura, T., Yamamoto, I. (2007) Cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of tetrahydrocannabinols and cannabidiol by human hepatic microsomes. *Life Sciences*, 80, 1415–1419.
 - Huestis, M.A., Barnes, A., Smith, M.L. (2005) Estimating the time of last cannabis use from plasma delta9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol concentrations. *Clinical Chemistry*, 51, 2289–2295.
 - 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. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45, 495–503.
 - Leghissa, A., Hildenbrand, Z.L., Schug, K.A. (2018) A review of methods for the chemical characterization of cannabis natural products. *Journal of Separation Science*, 41, 398–415.
 - Citti, C., Braghiroli, D., Vandelli, M.A., Cannazza, G. (2018) Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 565–579.
 - Hazekamp, A., Peltenburg, A., Verpoorte, R., Giroud, C. (2005) Chromatographic and spectroscopic data of cannabinoids from Cannabis sativa L. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28, 2361–2382.
 - Teixeira, H., Verstraete, A., Proenca, P., Corte-Real, F., Monsanto, P., Vieira, D.N. (2007) Validated method for the simultaneous determination of Delta9-THC and Delta9-THC-COOH in oral fluid, urine and whole blood using solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization. *Forensic Science International*, 170, 148–155.
 - Hoffman, M.A., Fang, B., Haura, E.B., Rix, U., Koomen, J.M. (2018) Comparison of quantitative mass spectrometry platforms for monitoring kinase ATP probe uptake in lung cancer. *Journal of Proteome Research*, 17, 63–75.
 - Joye, T., Sidibe, J., Deglon, J., Karmime, A., Sporkert, F., Widmer, C. et al. (2019) Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for broad-spectrum drug screening of dried blood spot as microsampling procedure. *Analytica Chimica Acta*, 1063, 110–116.
 - Hopfgartner, G., Varesio, E., Tschappat, V., Grivet, C., Bourgogne, E., Leuthold, L.A. (2004) Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 845–855.
 - Stahl-Zeng, J., Lange, V., Ossola, R., Eckhardt, K., Krek, W., Aebersold, R. et al. (2007) High sensitivity detection of plasma proteins by multiple reaction monitoring of N-glycosites. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6, 1809–1817.
 - Ronsein, G.E., Pamir, N., von Haller, P.D., Kim, D.S., Oda, M.N., Jarvik, G.P. et al. (2015) Parallel reaction monitoring (PRM) and selected reaction monitoring (SRM) exhibit comparable linearity, dynamic range and precision for targeted quantitative HDL proteomics. *Journal of Proteomics*, 113, 388–399.
 - Rauniyar, N. (2015) Parallel reaction monitoring: A targeted experiment performed using high resolution and high mass accuracy mass spectrometry. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 28566–28581.
 - Domon, B., Gallien, S. (2015) Recent advances in targeted proteomics for clinical applications. *Proteomics Clinical Applications*, 9, 423–431.
 - Bourmaud, A., Gallien, S., Domon, B. (2016) Parallel reaction monitoring using quadrupole-Orbitrap mass spectrometer: Principle and applications. *Proteomics*, 16, 2146–2159.
 - Gao, Y., Chen, Y., Yue, X., He, J., Zhang, R., Xu, J. et al. (2018) Development of simultaneous targeted metabolite quantification and untargeted metabolomics strategy using dual-column liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 1037, 369–379.
 - Bhatnagar, A., McKay, M.J., Crumbaker, M., Ahire, K., Karuso, P., Gurney, H. et al. (2018) Quantitation of the anticancer drug abiraterone and its metabolite Delta(4)-abiraterone in human plasma using high-resolution mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 154, 66–74.
 - Jiang, H., Titsch, C., Zeng, J., Jones, B., Joyce, P., Gandhi, Y. et al. (2017) Overcoming interference with the detection of a stable isotopically labeled microtracer in the evaluation of beclabuvir absolute bioavailability using a concomitant microtracer approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 143, 9–16.
 - Gao, X., Li, H., Li, H., Dong, S., Chu, J., Guo, H. et al. (2018) Sensitive determination of nine anticoagulant rodenticides in blood by high resolution mass spectrometry with supported liquid extraction pretreatment. *Forensic Science International*, 292, 39–44.
 - Schott, H.F., Krautbauer, S., Horing, M., Liebisch, G., Matysik, S. (2018) A validated, fast method for quantification of sterols and gut microbiome derived 5alpha/beta-stanols in human feces by isotope dilution LC-high-resolution MS. *Analytical Chemistry*, 90, 8487–8494.
 - Lynch, K.L. (2016) CLSI C62-A: A new standard for clinical mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 62, 24–29.
 - Peters, F.T., Drummer, O.H., Musshoff, F. (2007) Validation of new methods. *Forensic Science International*, 165, 216–224.
 - Boulanger, B., Chiap, P., Dewe, W., Crommen, J., Hubert, P. (2003) An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods: Progress and limitations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32, 753–765.
 - Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., Chavez-Eng, C.M. (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75, 3019–3030.
 - Fabritius, M., Augsburg, M., Chtioui, H., Favrat, B., Giroud, C. (2014) Fitness to drive and cannabis: Validation of two blood THCCOOH thresholds to distinguish occasional users from heavy smokers. *Forensic Science International*, 242, 1–8.
 - Fabritius, M., Chtioui, H., Battistella, G., Annoni, J.M., Dao, K., Favrat, B. et al. (2013) 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*, 405, 9791–9803.
 - Thomas, A., Geyer, H., Schanzer, W., Crone, C., Kellmann, M., Moehring, T. et al. (2012) Sensitive determination of prohibited drugs in dried blood spots (DBS) for doping controls by means of a benchtop quadrupole/Orbitrap mass spectrometer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, 1279–1289.
 - Nadulski, T., Sporkert, F., Schnelle, M., Stadelmann, A.M., Roser, P., Schefer, T. et al. (2005) Simultaneous and sensitive analysis of THC,

- 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, and CBN by GC-MS in plasma after oral application of small doses of THC and cannabis extract. *Journal of Analytical Toxicology*, 29, 782–789.
38. Gonzalez, A.G., Herrador, M.A., Asuero, A.G. (2010) Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards. *Talanta*, 82, 1995–1998.
39. Rozet, E., Hubert, C., Ceccato, A., Dewe, W., Ziemons, E., Moonen, F. et al. (2007) Using tolerance intervals in pre-study validation of analytical methods to predict in-study results. The fit-for-future-purpose concept. *Journal of Chromatography A*, 1158, 126–137.
40. Chindarkar, N.S., Wakefield, M.R., Stone, J.A., Fitzgerald, R.L. (2014) Liquid chromatography high-resolution TOF analysis: Investigation of MSE for broad-spectrum drug screening. *Clinical Chemistry*, 60, 1115–1125.
41. Tiscione, N.B., Miller, R., Shan, X., Sprague, J., Yeatman, D.T. (2016) An efficient, robust method for the determination of cannabinoids in whole blood by LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 40, 639–648.
42. Palazzoli, F., Citti, C., Licata, M., Vilella, A., Manca, L., Zoli, M. et al. (2018) Development of a simple and sensitive liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of cannabidiol (CBD), Delta (9)-tetrahydrocannabinol (THC) and its metabolites in rat whole blood after oral administration of a single high dose of CBD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 150, 25–32.
43. Schwöpe, D.M., Scheidweiler, K.B., Huestis, M.A. (2011) Direct quantification of cannabinoids and cannabinoid glucuronides in whole blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, 1273–1283.

2.2. Approche multi-analyte pour l'analyse des cas drogues et médicaments au volant

2.2.1. Présentation de la problématique

Une deuxième approche quantitative basée sur l'utilisation du mode PRM a été développée dans le cadre de cette thèse. L'objectif de cette étude était de profiter des avantages technologiques de la LC-HRMS pour rassembler l'analyse de 5 grandes classes de substances aux propriétés physico-chimiques diverses impliquées dans les cas MDV, en une seule procédure. En effet, actuellement au sein de l'UTCF, il existe des stratégies GC et LC-MS distinctes pour l'analyse des amphétamines, des cannabinoïdes, de la cocaïne et ses métabolites, des opiacés et opioïdes et des benzodiazépines. Afin de mieux comprendre le l'intérêt de cette étude, il convient de définir le cadre légal Suisse vis-à-vis des drogues et médicaments au volant.

Concernant la conduite sous l'influence de drogues d'abus en Suisse, la tolérance zéro avec des *cut-off* techniques est définie par le gouvernement pour sept substances. Ainsi, des seuils définis par une ordonnance sur la circulation routière de l'OFROU sont appliqués dans le sang pour le THC (1.5 ng/ml), la morphine libre, la cocaïne, l'amphétamine, la méthamphétamine, la MDMA et la MDEA (15 ng/ml) en considérant un intervalle de confiance de $\pm 30\%$ ³⁸. La situation est relativement plus complexe en ce qui concerne toutes les autres substances pouvant influencer la capacité à conduire. Dans le cadre de la consommation d'une de ces substances, une incapacité à conduire doit être mise en évidence par une « expertise des 3 piliers ». Cette mise en évidence se base sur les observations documentées de la police, sur les résultats d'une expertise clinique effectuée par un médecin au moment du prélèvement, et enfin sur les résultats des analyses toxicologiques et principalement les concentrations de diverses substances obtenues dans le sang.

Les laboratoires toxicologiques voulant être reconnus pour effectuer l'analyse toxicologique de cas MDV doivent recevoir une reconnaissance de l'OFROU. Celle-ci vise à garantir la qualité des analyses ainsi qu'une harmonisation dans l'interprétation des résultats. Dans cette optique la Société Suisse de Médecine Légale (SSML), sous la supervision de l'OFROU, évalue les performances analytiques des laboratoires grâce à des contrôles qualités externes. Si toutes les substances pouvant influencer la capacité à conduire doivent être analysables, l'OFROU définit dans le cadre de l'analyse de ces EQCs un certain nombre de substances que les laboratoires doivent être capables de détecter, identifier et de quantifier.

C'est sur la base de cette liste, ainsi que sur les statistiques des occurrences des diverses classes de molécules détectées dans les analyses MDV réalisés au laboratoire en 2018 que les molécules ciblées par l'approche PRM développée au laboratoire (nous parlerons de la méthode OFROU) ont été sélectionnées.

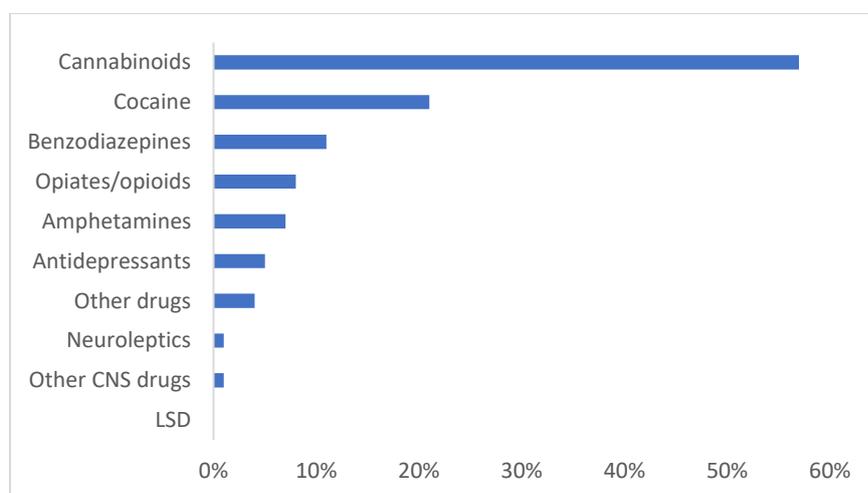


Figure 3-3 : Occurrence des classes de substances présente dans les cas MDV analysés par le CURML en 2018

Ces statistiques montrent clairement que la grande majorité des cas MDV analysés étaient positifs aux cannabinoïdes, l'éthanol n'étant pas intégré à ces statistiques. Les autres classes de molécules choisies pour le développement de l'approche sont les 4 classes suivantes les plus représentées. Ce choix permettra à la vue de ces statistiques de résoudre plus de 85 % des cas

MDV en une seule approche. La liste détaillée des substances présentes dans la méthode OFROU est présentée dans le tableau 3-1.

Internal Standards	Analytes
THC-D3	THC
THC-COOH-D9	THC-COOH
Cocaine-D3	Cocaine, Cocaethylene
Benzoyllecgonine-D3	Benzoyllecgonine
Amphetamine-D8	Amphetamine, Methamphetamine
MDMA-D5	MDA, MDMA,
Methylphenidate-D10	Methylphenidate
Morphine-D3	Morphine
Codeine-D3	Codeine
Méthadone-D3	Méthadone, EDDP
Tramadol- ¹³ C-D3	Tramadol
O-Desmethyltramadol-D6	O-Demethyltramadol
Nordiazepam-D5	Diazepam, Nordiazepam, Oxazepam
Alprazolam-D5	Lorazepam, Bromazepam, Alprazolam
Zolpidem-D6	Zolpidem

Tableau 3-1 : Listes des substances et des standards internes implémentés dans la méthode OFROU

Au total, 23 substances et 15 standards internes, soit un total de 38 substances ont été ainsi sélectionnées. Le nombre élevé de standard internes (SI) inclus dans l'approche a notamment pour but de compenser les effets de matrice très présents lors d'une ionisation ESI. En effet, l'utilisation d'une substance d'intérêt marquée par un isotope comme SI, permettra de normaliser le signal d'intérêt par celui d'un SI possédant les mêmes propriétés-chimiques, et par conséquent réagissant de façon similaire au processus d'extraction ainsi qu'aux effets de matrice lors de l'ionisation. Le développement d'une approche multi-analyte comprenant autant de substances aux propriétés physico-chimiques différentes tout en conservant l'utilisation d'un volume d'échantillon limité, peut s'avérer compliquée. Une des limitations de ce genre d'approches réside dans le temps nécessaire à l'instrument pour l'acquisition de fragments d'intérêt (temps de cycle). En effet, afin d'assurer une quantification précise et robuste des composés, il est nécessaire d'obtenir suffisamment de points d'acquisition par

composé. Dans cette optique, et afin que l'instrument se consacre uniquement à l'acquisition d'informations pertinentes, des fenêtres de temps ont dû être préalablement définies pour les différents composés et standards internes (Figure 3-4).

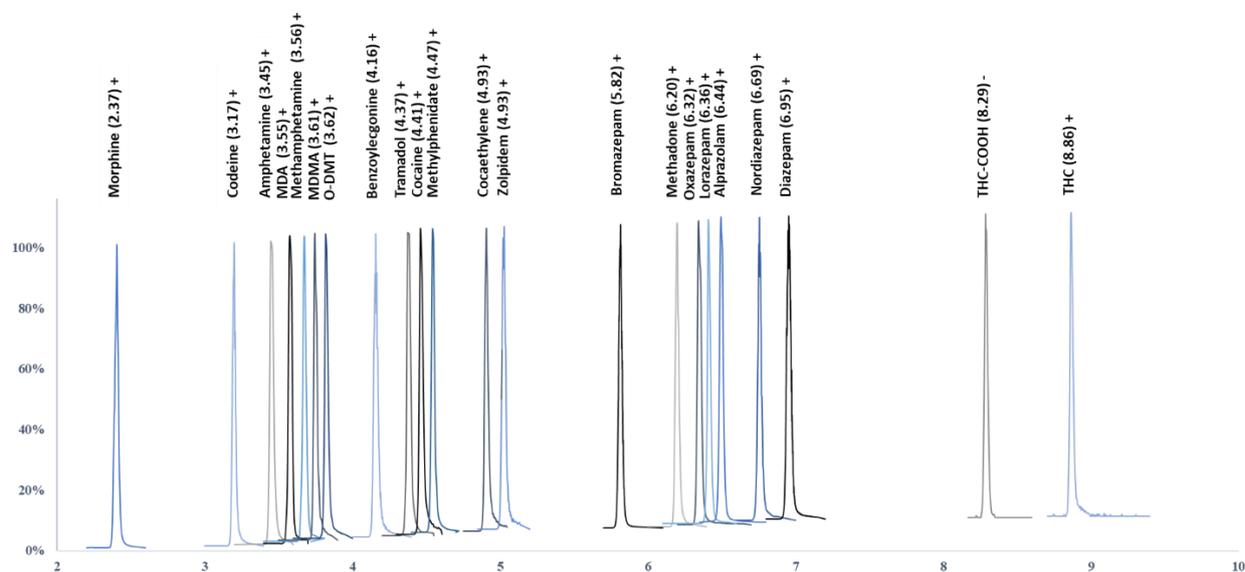


Figure 3-4 : Séparation chromatographique des différents composés implémentés dans la méthode OFROU, des fenêtres de temps de rétention ont été établies afin de garantir un nombre suffisant de points d'acquisition pour garantir une bonne quantification

L'approche développée avec succès à partir de 100 µL de sang pour la résolution de la grande majorité des cas MDV est présentée dans la section suivante. L'article concernant le développement et la validation de cette méthode OFROU qui a été publié dans le journal *Frontiers in Chemistry* est présenté dans la section suivante.

**2.2.2. Article : Driving under the influence of drugs - a single parallel
monitoring-based quantification approach on whole blood**



Driving Under the Influence of Drugs: A Single Parallel Monitoring-Based Quantification Approach on Whole Blood

Timothée Joye^{1,2}, Katell Rocher¹, Julien Déglon¹, Jonathan Sidibé¹, Bernard Favrat^{3,4}, Marc Augsburg¹ and Aurélien Thomas^{1,2*}

¹ Forensic Toxicology and Chemistry Unit, CURML, Lausanne University Hospital, Geneva University Hospitals, Lausanne, Switzerland, ² Faculty Unit of Toxicology, CURML, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland, ³ Unit of Medicine and Traffic Psychology, CURML, Lausanne University Hospital, Geneva University Hospitals, Lausanne, Switzerland, ⁴ Center for Primary Care and Public Health (Unisanté), University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

OPEN ACCESS

Edited by:

Ana de-Castro-Rios,
University of Santiago de
Compostela, Spain

Reviewed by:

Sarah M. R. Wille,
National Institute for Criminalistics and
Criminology (NICC), Belgium
Marilyn A. Huestis,
Thomas Jefferson University,
United States

*Correspondence:

Aurélien Thomas
aurelien.thomas@chuv.ch

Specialty section:

This article was submitted to
Analytical Chemistry,
a section of the journal
Frontiers in Chemistry

Received: 15 April 2020

Accepted: 15 June 2020

Published: 26 August 2020

Citation:

Joye T, Rocher K, Déglon J, Sidibé J,
Favrat B, Augsburg M and
Thomas A (2020) Driving Under the
Influence of Drugs: A Single Parallel
Monitoring-Based Quantification
Approach on Whole Blood.
Front. Chem. 8:626.
doi: 10.3389/fchem.2020.00626

Driving under the influence of psychoactive substances is a major cause of motor vehicle crashes. The identification and quantification of substances most frequently involved in impaired-driving cases in a single analytic procedure could be an important asset in forensic toxicology. In this study, a highly sensitive and selective liquid chromatography (LC) approach hyphenated with Orbitrap high-resolution mass spectrometry (HRMS) was developed for the quantification of the main drugs present in the context of driving under the influence of drugs (DUID) using 100 μ L of whole blood. This procedure involves a simple sample preparation and benefit from the selectivity brought by parallel reaction monitoring (PRM) allowing to solve most DUID cases using a single multi-analyte injection. The method was fully validated for the quantification of the major classes of psychoactive substances associated with impaired-driving (cannabinoids, cocaine and its metabolites, amphetamines, opiates and opioids, and the major benzodiazepines and z-drugs). The validation guidelines set by the "Société Française des Sciences et des Techniques Pharmaceutiques" (SFSTP) were respected for 22 psychoactive substances using 15 internal standards. Trueness was measured to be between 95.3 and 107.6% for all the tested concentrations. Precision represented by repeatability and intermediate precision was lower than 12% while recovery (RE) and matrix effect (ME) ranged from 49 to 105% and from -51 to 3%, respectively. The validated procedure provides an efficient approach for the simultaneous and simple quantification of the major drugs associated with impaired driving benefiting from the selectivity of PRM.

Keywords: parallel reaction monitoring, quantitative analysis, whole blood, driving under the influence of drugs, multi-analyte

INTRODUCTION

Road crashes are a worldwide public health issue, causing a significant number of deaths and injuries each year. Indeed, 1.25 million people died and about 50 million were injured in road traffic crashes in 2015 according to the World Health Organization (2015). In addition, in Europe almost 25% of adults reported at least one instance of illicit drug consumption in their life

(Liakoni et al., 2018). These two issues are closely linked, since one of the major causes of road crashes is the consumption of psychotropic substances, including drugs and alcohol, resulting in driving impairment (Elliott et al., 2009; Favretto et al., 2018). For instance, in Norway, at least 21% of traffic crashes were related to either alcohol or drug use between 2005 and 2015 (Valen et al., 2019). The total number of victims of fatal crashes has significantly decreased in the past years in Western countries thanks to efficient prevention. Yet, the use of medicinal or illicit drug and/or alcohol is an increasing phenomenon in Europe (Snenghi et al., 2018; Pelletti et al., 2019), and the percentage of fatal crashes due to the driver's impairment remain constant (between 17 and 22% from 1995 to 2017) in Switzerland [Office Fédéral de la Statistique (OFS), 2018].

Due to the large variety of drugs and pharmaceuticals with various psychoactive effects, there is a need for medical experts to establish solid statement on a potential driving-impairment and for official quantification of drugs and alcohol levels in blood (Martin et al., 2017). In Switzerland, a zero tolerance with technical cut-offs is implemented regarding classical drugs of abuse (DoA) toward drivers (1.5 ng/ml for THC and 15 ng/ml for morphine, cocaine, amphetamine, methamphetamines, MDEA, and MDMA) (Walsh et al., 2004; Steuer et al., 2016). The situation is more complex regarding the consumption of medicinal drugs and the toxicological interpretation of their concentration (Ravera et al., 2012). With respect to the law, the driving capability under pharmaceuticals is concomitantly determined by a “three pillars expertise” including police assessment, medical expertise, and toxicological analysis in blood, being the biological matrix of reference regarding toxicological interpretation (Steuer et al., 2014). The Swiss Federal Roads Office (FEDRO) defines a list of controlled substances that the laboratories must be able to quantify in the context of external quality controls (EQCs) in whole blood regarding driving under the influence of drugs (DUID). Those recommendations, associated with the knowledge of drug prevalence among suspected drivers, were used to establish a list of substances of interest in the present study.

Improvements regarding instrumentation, notably brought on by the developments of Orbitrap technology, offer new opportunities in terms of analytical strategies (Hoffman et al., 2018; Joye et al., 2019). Indeed, various Orbitrap-based parallel reaction monitoring (PRM) applications have been reported, especially in the field of proteomics (Domon and Gallien, 2015; Rauniyar, 2015; Bourmaud et al., 2016). In a PRM acquisition, a precursor selected by a quadrupole is fragmented in a higher-energy collisional dissociation (HCD) cell (Ronsein et al., 2015). Following this experiment, all product ions are simultaneously acquired in the high-resolution Orbitrap analyzer. Up to now, the use of triple-quadrupole (QQQ) using Selected Reaction Monitoring (SRM) has been the gold standard regarding targeted quantitative analyses (Hopfgartner et al., 2004; Rauniyar, 2015). However, SRM and PRM have comparable sensitivity with similar linearities, dynamic ranges, precision, and repeatability (Domon and Gallien, 2015; Joye et al., 2020). Yet Orbitrap-based PRM offers further advantages, since the acquisition of all selected precursors' fragments is performed, thereby limiting the

a priori information required for method development. Indeed, the selection of quantifying ions is only necessary during the data processing step once the whole fragmentation spectra is acquired. Moreover, HRMS provides a higher specificity, allowing for the separation of the background ions from the targeted molecules (Ronsein et al., 2015).

Drug quantification can easily benefit from the PRM specificities that have been enlightened for proteomic applications. Even though this strategy is relatively recent regarding illicit drug and pharmaceuticals analyses in toxicology, it has received a growing interest. Indeed, PRM quantification has been reported for the quantitative analysis of abiraterone (Bhatnagar et al., 2018), beclabuvir (Jiang et al., 2017), anticoagulant rodenticides (Gao et al., 2018), and sterols (Schott et al., 2018). Regarding drugs of abuse, a first application has been described for the quantification of cannabinoids in whole blood (Joye et al., 2020).

Herein, we present a validated single multi-analyte procedure for the quantification of the main substances regarding DUID cases using 100 μ L of whole blood. The quantified substances were selected based on the FEDRO list and the prevalence of substances consumed by the drivers in Switzerland (Augsburger and Rivier, 1997; Augsburger et al., 2005; Senna et al., 2010). The validated approach uses the advantages provided by HRMS and especially PRM for the simultaneous quantification of 22 DoA and pharmaceuticals alongside 15 internal standards (IS), enabling the solving of most DUID cases with a single injection and a simple sample preparation.

MATERIALS AND METHODS

Standards and Reagents

Water, methanol, formic acid (FA), and ammonium formate were furnished by Biosolve. Drugs standard were purchased from Cerilliant or Lipomed, at either 1 mg/ml or 100 μ g/ml. External quality controls (ECQ) were purchased from Medidrug, ACQ Science, or Clincheck. Blank lyophilized whole blood was acquired from ACQ Science.

Solution Preparation

Standard solutions containing tetrahydrocannabinol (THC), 11-Nor-9-carboxy-THC (THC-COOH), alprazolam, amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA), 3,4-methylene dioxy-amphetamine (MDA), methylphenidate, cocaine, cocaethylene, lorazepam, bromazepam, zolpidem, benzoylcegonine, morphine, codeine, methadone, tramadol, O-desmethyltramadol, diazepam, nordiazepam, oxazepam were prepared for calibration curve and internal quality control (IQC) preparation. In parallel, solutions containing THC-D3, THC-COOH-D9, cocaine-D3, benzoylcegonine-D3, amphetamine-D8, MDMA-D5, methylphenidate-D10, morphine-D3, codeine-D3, methadone-D3, tramadol-¹³C-D3, O-desmethyltramadol-D6, nordiazepam-D5, alprazolam-D5, and zolpidem-D6 were prepared as internal standard (IS) solutions.

Calibration samples were prepared by spiking lyophilized whole blood at 5 concentration levels (Table 1). IS were added to

TABLE 1 | Calibration levels and quantification parameters (IS, polarity, parent ion m/z, and quantifier ions) for the substances of interest. The calibration ranges are in adequacy with the legal thresholds and the therapeutic ranges.

	Calibration levels (ng/ml)										Quantification parameters			
	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5	Polarity	Parent ion (m/z)	quantifier ion	Qualifier ion for data processing (m/z)	IS	IS concentration (ng/ml)	IS parent ion	quantifier ion	
	1	2	5	10	20	+	315.2319 → 193.1222	123.0440	THC-D3	10	318.2507 → 196.1413			
THC	5	10	25	50	100	-	343.1915 → 245.1546	191.1068	THC-COOH-D9	100	352.2479 → 254.2108			
THC-COOH	10	20	50	100	200	+	304.1543 → 182.1177	82.0657	Cocaine-D3	100	307.1731 → 185.1364			
Cocaine	50	100	250	500	1,000	+	318.1699 → 196.1333	82.0651	Cocaine-D3	100	307.1731 → 185.1364			
Cocaine-D3	50	100	250	500	1,000	+	290.1387 → 168.1020	105.0338	Benzylecgonine-D3	100	293.1575 → 171.1204			
Benzylecgonine	10	20	50	100	200	+	136.1121 → 91.0547	119.0857	Amphetamine-D8	100	144.1623 → 97.0921			
Amphetamine	10	20	50	100	200	+	150.1277 → 91.0547	119.0857	Amphetamine-D8	100	144.1623 → 97.0921			
Methamphetamine	10	20	50	100	200	+	180.1019 → 133.0648	105.0702	MDMA-D5	100	199.1489 → 165.0877			
MDA	10	20	50	100	200	+	194.1175 → 163.0753	135.0441	MDMA-D5	100	199.1489 → 165.0877			
MDMA	10	20	50	100	200	+	234.1488 → 84.0813	56.0503	Methyphenidate-D10	100	244.2116 → 93.1376			
Methyphenidate	10	20	50	100	200	+	286.1438 → 201.0908	229.0858	Morphine-D3	1,000	289.1626 → 201.0906			
Morphine	5	50	500	1,000	2,000	+	300.1594 → 215.1061	58.0659	Codeine-D3	1,000	303.1783 → 215.1061			
Codeine	5	50	500	1,000	2,000	+	310.2165 → 105.0339	219.1167	Methadone-D3	1,000	313.2354 → 105.0337			
Methadone	5	50	500	1,000	2,000	+	264.1958 → 58.0659	-	Tramadol- ¹³ C-D3	1,000	269.2287 → 58.0657			
Tramadol	5	50	500	1,000	2,000	+	250.1801 → 58.0659	-	O-Desmethyltramadol-D6	1,000	256.2178 → 64.1033			
O-Desmethyltramadol	5	50	500	1,000	2,000	+	285.0789 → 154.0417	193.0885	Nordiazepam-D5	1,000	276.0947 → 140.0258			
Diazepam	100	200	500	1,000	2,000	+	271.0633 → 140.0262	165.0212	Nordiazepam-D5	1,000	276.0947 → 140.0258			
Nordiazepam	100	200	500	1,000	2,000	+	287.0582 → 241.0527	104.0498	Nordiazepam-D5	1,000	276.0947 → 140.0258			
Oxazepam	100	200	500	1,000	2,000	+	321.0192 → 229.0527	163.0055	Alprazolam-D5	100	314.1215 → 286.1018			
Lorazepam	20	50	100	150	300	+	316.0080 → 182.0839	209.0945	Alprazolam-D5	100	314.1215 → 286.1018			
Bromazepam	20	50	100	150	300	+	309.0902 → 281.0707	274.1208	Alprazolam-D5	100	314.1215 → 286.1018			
Alprazolam	5	10	25	50	100	+	308.1757 → 235.1230	263.1175	Zolpidem-D6	100	314.2134 → 235.1224			
Zolpidem	40	100	200	300	600	+								

reach a final concentration of 10 (THC-D3), 100, or 1,000 ng/ml depending on the specific calibration range.

Sample Pre-treatment

IS solutions were spiked in Eppendorfs and evaporated to dryness before adding 100 μ L of whole blood. The extraction was then performed by protein precipitation using 300 μ L of methanol. After centrifugation for 10 min at 14,000 rpm, the upper methanolic phase was transferred into a new Eppendorf and evaporated to dryness under a nitrogen flow. Reconstitution was performed using 100 μ L of 1:9 methanol: water and 10 μ L were injected into the LC-HRMS system (**Supplemental Figure 1**).

LC-HRMS Method

A Thermo Scientific Ultimate 3000 LC system with a Phenomenex 2.6 μ m C18 (10 cm \times 2.1 mm) maintained at 45°C was used for chromatographic separation. Mobile phases were composed of A, ammonium formate 10 mM at pH 3.3, and B, methanol with 0.1% FA. Phase B was ramped linearly from 2 to 98% over 7.5 min. The column was then washed at 98% of B for 3.5 min, followed by a 6 min re-equilibration at 2% of B at 300 μ L/min for a total analysis run of 17 min. The LC was coupled to a Q Exactive Plus system (Thermo Scientific, Bremen, Germany) via a heated electro spray ionization (ESI) source (H-ESI II probe, Thermo Scientific). The ionization spray voltage was set to 3 kV, sheath gas flowrate was set to 40, and auxiliary gas flowrate to 10 (both in arbitrary units). The method functioned in PRM, using an inclusion list containing the exact mass of the parent ion and the retention time windows for the different analytes. A polarity switch in negative was performed at 7.5 min for the

specific detection of THC-COOH with a switch back in positive polarity at 8.7 min for the detection of THC. Resolution was set to 17,500 for the HCD fragmentation performed using an NCE at 50 eV with an AGC target of 1e5 and a maximum IT of 100 ms.

Method Validation

The validation criteria used to evaluate the analytical process was based on the directives of the "Société Française des Sciences et des Techniques Pharmaceutiques" (SFSTP) regarding bioanalytical methods and adapted to our specific requirements (Boulangier et al., 2003; Peters et al., 2007; Lynch, 2016). Two product ions (one quantifier and one qualifier) were used for data processing (**Table 1**) and full MS/MS spectra were compared with the online advanced mass spectral database *m/z cloud*. The validation was performed over 3 non-consecutive days ($p = 3$). The trueness and precision were evaluated using a variance analysis-based statistical treatment (ANOVA). Calibration (Cal) was performed in duplicate at 5 different concentration levels ($k = 5$) (**Table 1**) while quality controls (QCs) were prepared in quadruplicate at the two lowest and highest concentration levels ($k = 4$). Using the acquired data, trueness, precision, accuracy, linearity, limits of detection (LOD), and quantification (LOQ) were determined. Six different blank bloods were analyzed for selectivity assessment investigating for potential interferences. The approach developed by Matuszowski et al. was used for recovery (RE) and matrix effect (ME) evaluation (Matuszowski et al., 2003). In this optic, three sample sets were prepared, including all the substances of interest at two concentration levels (low being level 2 and high being level 4 described in **Table 1**). Sample set 1 represented neat standards spiked after

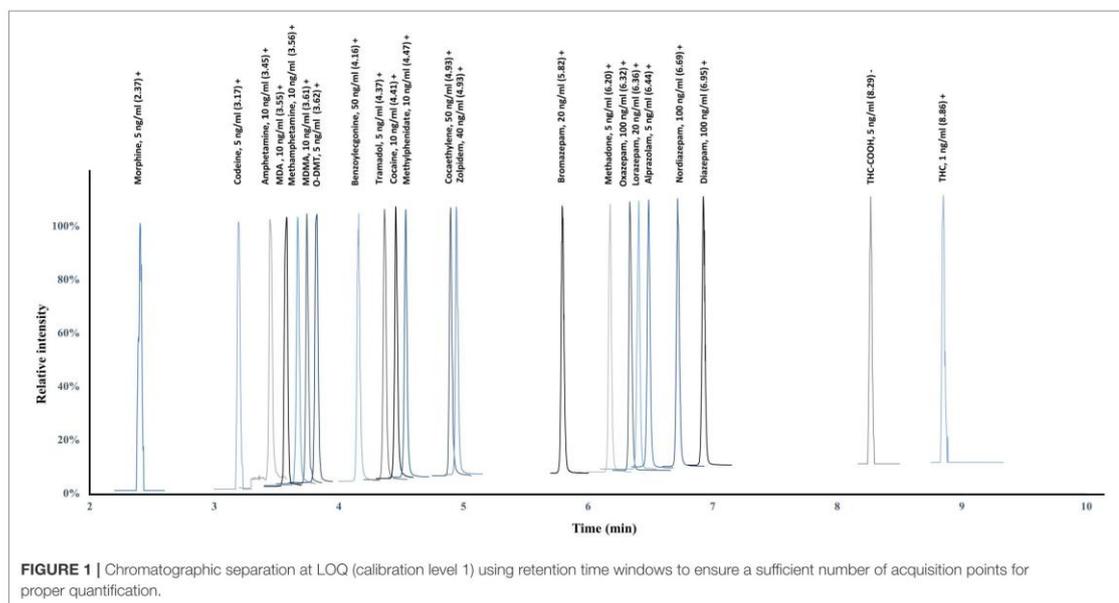


TABLE 2 | Results for trueness, precision, and linearity (k is the number of concentration levels, n the number of repetitions by levels, and p the number of non-consecutive days).

Trueness (%) (k = 4; n = 4; p = 3)				
Calibration level (ng/ml)	Level 1	Level 2	Level 4	Level 5
THC	107.3	98.4	101.8	106.2
THC-COOH	100.9	104.2	102.4	101.9
Cocaine	101.4	102.2	103.0	103.3
Cocaethylene	102.1	106.7	101.1	99.4
Benzoyllecgonine	101.8	103.6	100.6	99.8
Amphetamine	107.7	104.8	101.5	100.7
Methamphetamine	102.9	101.2	100.6	97.2
MDA	104.4	105.3	103.4	98.2
MDMA	107.2	102.2	97.6	98.3
Methylephenidate	104.8	103.4	102.4	100.6
Morphine	101.6	96.1	100.8	100.6
Codeine	103.5	107.6	103.2	102.4
Methadone	107.6	103.5	104.4	100.5
Tramadol	103.8	98.5	100.4	99.6
O-Desmethyltramadol	98.9	100.5	98.1	99.5
Diazepam	97.6	101.7	103.2	96.7
Nordazepam	98.4	102.6	103.0	99.6
Oxazepam	98.7	98.1	100.0	97.0
Lorazepam	101.0	99.5	99.3	102.2
Bromazepam	95.3	101.1	97.1	100.3
Alprazolam	100.9	105.1	101.8	97.2

Repeatability/intermediate precision (RSD %) (k = 4, n = 4, p = 3)

Calibration level (ng/ml)	Level 1	Level 2	Level 4	Level 5
THC	5.6/5.6	3.1/3.9	3.9/4.0	3.2/7.1
THC-COOH	7.4/8.3	7.2/7.2	4.5/4.5	5.7/5.7
Cocaine	7.8/7.8	4.0/7.0	7.0/7.0	3.6/6.3
Cocaethylene	3.6/5.7	4.7/5.0	2.2/2.3	4.5/4.5
Benzoyllecgonine	5.0/5.0	2.4/3.3	2.2/2.2	3.1/3.5
Amphetamine	7.9/7.9	5.6/7.6	4.7/6.5	5.5/5.5
Methamphetamine	6.7/7.0	7.1/7.1	4.0/5.7	5.5/5.5
MDA	4.6/5.6	4.8/7.7	3.0/3.0	3.7/3.7
MDMA	5.2/6.9	6.8/6.8	4.8/4.8	6.4/4.7
Methylephenidate	3.6/4.1	4.1/5.6	3.1/3.7	3.8/3.8
Morphine	3.9/7.9	3.7/3.7	2.2/2.2	1.1/1.5
Codeine	7.2/8.4	5.3/6.3	5.0/6.2	2.8/4.8
Methadone	8.3/8.3	5.3/5.3	7.7/7.7	4.4/4.4
Tramadol	3.6/3.6	6.5/6.5	5.9/5.9	3.1/3.1
O-Desmethyltramadol	6.4/6.9	4.0/4.0	5.6/5.6	3.3/3.3
Diazepam	11.2/11.2	4.6/5.4	3.9/4.2	5.3/5.3
Nordazepam	3.8/4.2	3.1/3.2	2.2/2.2	1.9/2.2
Oxazepam	4.3/4.3	5.9/5.9	6.6/7.4	3.0/4.8
Lorazepam	8.4/11.0	5.5/5.5	9.4/9.8	4.6/6.5
Bromazepam	11.6/11.6	3.7/3.8	3.6/3.6	2.5/2.5
Alprazolam	9.0/9.0	5.2/5.6	7.0/7.0	3.8/4.2

(Continued)

TABLE 2 | Continued

Linearity (k = 4, n = 4, p = 3)				
	Range (ng/ml)	Slope	R ²	LOQ (ng/ml)
THC	1–20	1.0623	0.9928	1
THC-COOH	5–100	1.0188	0.9946	5
Cocaine	10–200	1.0339	0.9933	10
Cocaethylene	50–1,000	0.9905	0.9970	50
Benzoyllecgonine	50–1,000	0.9959	0.9980	50
Amphetamine	10–200	1.0044	0.9937	10
Methamphetamine	10–200	0.9711	0.9944	10
MDA	10–200	0.9802	0.9967	10
MDMA	10–200	0.9779	0.9934	10
Methylephenidate	10–200	1.0046	0.9972	10
Morphine	5–2,000	1.0063	0.9995	5
Codeine	5–2,000	1.0237	0.9962	5
Methadone	5–2,000	1.0077	0.9951	5
Tramadol	5–2,000	0.9966	0.9978	5
O-Desmethyltramadol	5–2,000	0.9934	0.9977	5
Diazepam	5–2,000	0.9688	0.9936	5
Nordazepam	5–2,000	0.9969	0.9987	5
Oxazepam	5–2,000	0.9707	0.9945	5
Lorazepam	20–300	0.9921	0.9921	20
Bromazepam	20–300	1.0032	0.9980	20
Alprazolam	5–100	0.9697	0.9948	5
Zolpidem	40–600	1.0019	0.9983	40

the extraction, while sample set 2 represented blank blood spiked after extraction. Sample set 3 represented blank blood spiked before extraction. The absence of interfering peaks at the established retention times (RT) for the analytes and the IS was used to ensure the specificity. The chemical stability of all analytes was evaluated under sample handling and storage conditions at low and high concentrations in five replicates. Benchtop (6 h, room temperature), autosampler (24 h, 5°C), three cycles of freeze-thaw (–20°C), and short term (1 week, –20°C) conditions were used for stability determination.

In order to evaluate the method, 8 different EQCs were analyzed in duplicates using the exact same procedure.

RESULTS AND DISCUSSION

Method Development

In the present study, 22 analytes (15 IS) included in the main classes of drugs of abuse, as well as the major benzodiazepines, were analyzed using a single simultaneous multi-analyte quantitative approach. This list of substances was established based on the FEDRO recommendations and on the knowledge of the prevalence of psychoactive compounds among suspected impaired drivers. A nationwide study performed on 4,668 samples collected on suspected drivers in 2010 in Switzerland proved cannabinoids (48%), alcohol (35%), cocaine (25%), opiates (15%), amphetamines (7%), and benzodiazepines

(6%) to be the most detected substances (Senna et al., 2010). The use of such multi-analyte approaches is challenging due to the various physico-chemical properties of the substances of interest and requires specific care during method development. To ensure a proper quantification, retention time windows were set for the acquisition ensuring the acquisition of a sufficient number of acquisition points (Figure 1). For good-quality integration and reproducible quantification, a minimum of 10–15 points is necessary to define exactly the peak start, peak apex, and peak end. The method was designed to resolve the wide majority of DUID cases using a single procedure and a limited amount of biological sample (Supplemental Figure 1) (Senna et al., 2010). The method allows the successful PRM-based quantification of cannabinoids, amphetamines, cocaine and its metabolites, opiates and opioids, and the major benzodiazepines at the sensitivity necessary for legal thresholds and therapeutic ranges (OCCCR-OFROU, 2008; Schulz et al., 2012).

Trueness and Precision

Independent QC samples at 4 different calibration levels were injected in 4 replicates over 3 non-consecutive days for the determination of trueness and precision. Accuracy represents the total error and is divided into trueness (representing the “bias” or the systematic error) and precision (referring as the standard deviation or random errors) (Gonzalez et al., 2010). The trueness can be evaluated by calculating the percentage difference between the experimental and the expected theoretical values. In the present study, the systematic error varied from -4.7 to 7.6% (Table 2). Precision was divided into two parameters:

TABLE 3 | Results for Recovery and Matrix Effect performed at low- and high-quality control concentrations.

	Matrix effect and recovery			
	ME low (CV %)	RE low (CV %)	ME high (CV %)	RE high (CV %)
THC	-51% (15)	78% (18)	-34% (16)	81% (12)
THC-COOH	-7% (9)	57% (10)	-4% (3)	49% (4)
Cocaine	-25% (8)	92% (8)	-26% (8)	94% (10)
Cocaethylene	-27% (6)	91% (6)	-21% (6)	95% (9)
Benzoylcegonine	-22% (4)	91% (6)	-19% (8)	92% (8)
Amphetamine	-10% (12)	96% (12)	-13% (7)	86% (12)
Methamphetamine	-12% (11)	76% (10)	-18% (12)	75% (10)
MDA	-32% (8)	106% (8)	-22% (5)	89% (7)
MDMA	-35% (10)	96% (9)	-18% (8)	95% (7)
Methylephenidate	-30% (8)	82% (17)	-25% (16)	81% (10)
Morphine	-23% (9)	96% (5)	-12% (4)	86% (17)
Codeine	-27% (4)	96% (16)	-13% (6)	95% (7)
Methadone	-21% (11)	94% (8)	-13% (10)	97% (9)
Tramadol	-27% (10)	88% (17)	-15% (6)	82% (19)
O-Desmethyltramadol	-29% (14)	81% (12)	-15% (8)	95% (13)
Diazepam	-30% (5)	73% (5)	-10% (11)	67% (10)
Nordazepam	0% (11)	82% (9)	-4% (9)	86% (9)
Oxazepam	-13% (6)	86% (7)	-5% (10)	82% (9)
Lorazepam	-7% (7)	80% (6)	3% (13)	95% (6)
Bromazepam	-18% (9)	96% (8)	-15% (10)	105% (7)
Alprazolam	-4% (12)	81% (6)	-1% (7)	84% (9)
Zolpidem	-16% (7)	73% (15)	-11% (13)	86% (12)

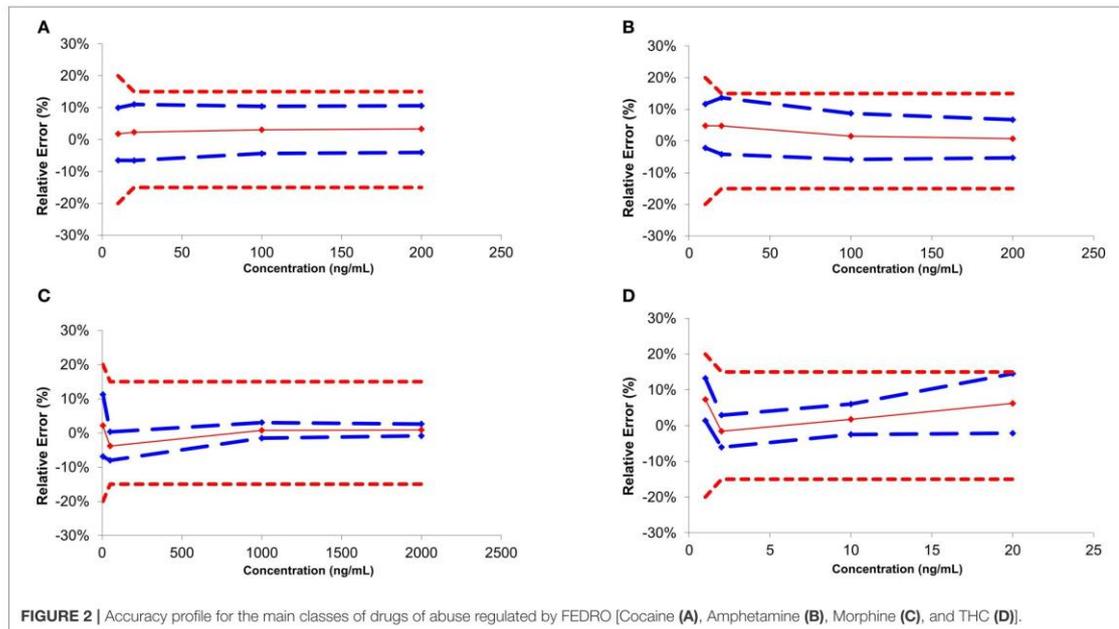
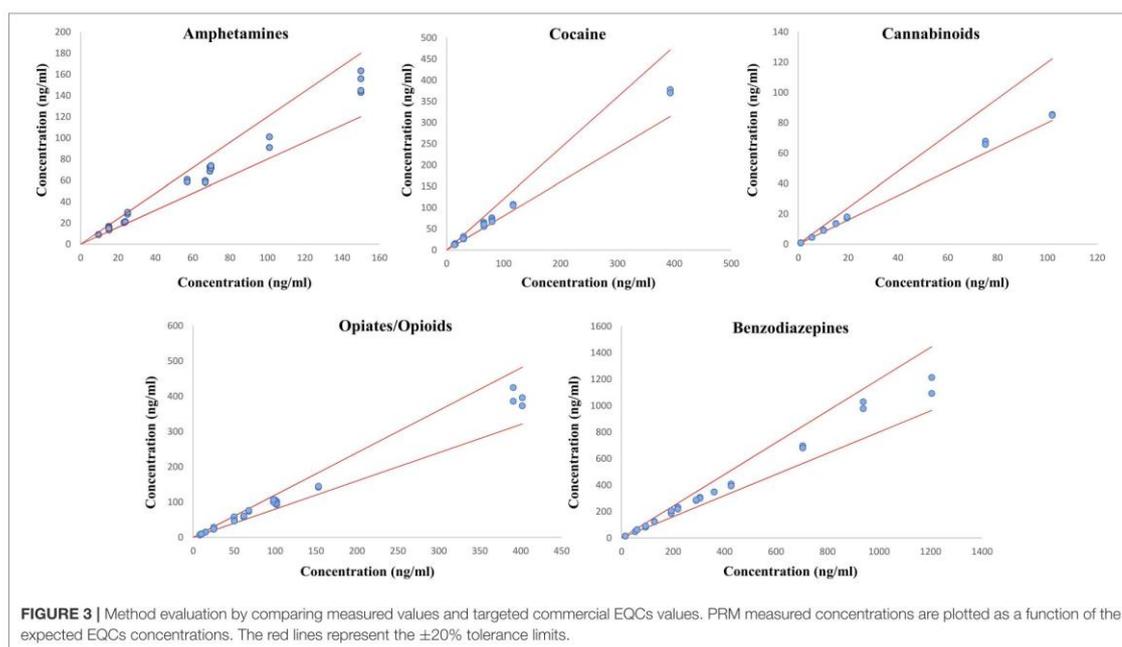


TABLE 4 | Three cycles of freeze-thaw (−20°C), benchtop (6 h, room temperature), autosampler (24 h, 5°C), and short-term (1 week, −20°C) conditions were performed in this stability assay at low- and high-quality control concentrations.

	Stability							
	Autosampler (5°C, 24 h)		Benchtop (Room Temp, 6 h)		Freeze-thaw (−20°C, 3 cycles)		Short term (−20°C, 1 week)	
	Low (CV %)	High (CV %)	Low (CV %)	High (CV %)	Low (CV %)	High (CV %)	Low (CV %)	High (CV %)
THC	100% (13)	93% (3)	92% (7)	95% (5)	108% (11)	98% (2)	99% (17)	98% (4)
THC-COOH	103% (7)	97% (4)	106% (8)	97% (8)	100% (11)	101% (5)	101% (7)	99% (2)
Cocaine	109% (7)	95% (6)	99% (12)	92% (7)	104% (10)	99% (6)	108% (12)	96% (7)
Cocacethyene	107% (12)	96% (6)	99% (12)	92% (16)	93% (6)	95% (14)	88% (9)	94% (8)
Benzoylcegonine	102% (7)	95% (4)	97% (11)	97% (6)	99% (9)	98% (3)	104% (7)	95% (4)
Amphetamine	100% (3)	95% (11)	100% (6)	96% (8)	95% (2)	96% (8)	93% (2)	91% (6)
Methamphetamine	103% (15)	100% (9)	95% (11)	97% (14)	92% (7)	103% (5)	105% (21)	96% (12)
MDA	104% (13)	98% (6)	95% (5)	86% (8)	101% (11)	101% (7)	109% (21)	96% (7)
MDMA	108% (10)	98% (5)	101% (6)	97% (5)	106% (10)	104% (6)	108% (16)	96% (6)
Methylephedate	109% (21)	106% (13)	106% (10)	92% (19)	105% (10)	106% (16)	109% (20)	108% (16)
Morphine	91% (2)	98% (4)	94% (8)	100% (14)	90% (7)	104% (4)	86% (8)	98% (3)
Codeine	108% (10)	104% (6)	97% (5)	106% (7)	104% (8)	110% (9)	103% (9)	105% (9)
Methadone	106% (6)	98% (17)	96% (6)	101% (14)	99% (6)	105% (5)	102% (4)	98% (3)
Tramadol	108% (11)	98% (7)	102% (6)	100% (7)	98% (9)	105% (8)	100% (10)	98% (9)
O-Desmethyltramadol	99% (10)	101% (6)	98% (9)	101% (9)	99% (6)	106% (11)	96% (9)	94% (7)
Diazepam	104% (6)	97% (6)	101% (8)	88% (7)	90% (6)	96% (9)	102% (5)	90% (9)
Nordazepam	107% (4)	103% (4)	105% (7)	104% (3)	94% (7)	102% (5)	99% (7)	97% (5)
Oxazepam	102% (4)	99% (3)	95% (9)	95% (6)	86% (9)	107% (5)	113% (8)	109% (10)
Lorazepam	97% (16)	98% (6)	85% (7)	93% (11)	94% (10)	108% (6)	110% (8)	106% (8)
Bromazepam	98% (10)	95% (4)	91% (3)	91% (6)	104% (17)	97% (7)	97% (7)	98% (4)
Alprazolam	106% (9)	97% (11)	96% (6)	90% (8)	99% (9)	95% (8)	104% (9)	100% (6)
Zolpidem	109% (10)	93% (9)	92% (8)	93% (10)	115% (10)	97% (6)	97% (7)	94% (6)



the relative standard deviation (repeatability or $R_{R,S,D}$) and the inter-day variability (intermediate precision or $IP_{R,S,D}$). $R_{R,S,D}$ represents the variability under similar conditions, meaning that the analyses are performed by the same operator using the same reagents and samples. On the other hand, $IP_{R,S,D}$ represented the variability associated with the use of the same samples on different days with different reagents. Precision parameters were evaluated to be between 1.1 and 11.6% (Table 2). Accuracy profiles are visual representations combining both the trueness and the precision to represent the uncertainty measurement (Figure 2). Precision is represented by the calculated confidence limit at 95% at each concentration level. Accuracy profiles also include the representation of acceptance limits of $\pm 20\%$ at the LLOQ suggested for method validation ($\pm 15\%$ at the other calibration levels). All analyzed QCs were within the acceptance limits.

Linearity and LOQ

The definition of linearity stands as the method capacity to provide a result proportional to the actual sample concentration. To determine this parameter, a linear regression model based on the least square method was applied on the fit of the obtained concentration as a function of the theoretical concentration. Slopes values were comprised between 0.9688 and 1.0623 with coefficients of determination above 0.9921 for all the compounds confirming the method linearity within the concentration ranges of interest (Table 2). LOQs were fixed according to the lowest point of the calibration curve (Table 1).

Selectivity, Recovery, and Matrix Effect

Selectivity is defined as the ability to differentiate the analyte of interest from potential interferences. To assess the good selectivity of the method, six different blank blood samples were analyzed using the complete extraction procedure. No compounds impairing the detection and quantification of the analytes of interest were observed. HRMS technology offers a high selectivity due to its resolving power, therefore reducing the number of potential interferences (Chindarkar et al., 2014). However, ME, including ion suppression or enhancement, are often associated with the use of ESI as ion source challenging the method selectivity. The determination of such ME is therefore crucial to ensure a proper detection and quantification of the substances of interest. ME ranged from -51% (15% CV) of ion suppression for THC at low concentration and 3% (13% CV) of ion enhancement for lorazepam, being consistent with the existing literature (Table 3) (Simonsen et al., 2010; Fernandez Mdel et al., 2013; Montenarh et al., 2014; Steuer et al., 2014; Vaiano et al., 2016; De Boeck et al., 2017). All values concerning RE and ME are summarized in Table 3. To compensate for those undesirable ME, isotopically-labeled internal standards was used for normalization.

Stability

Results regarding analytes' stability are listed in Table 4. Overall, stability ranged between 86 and 115%, assuring that the samples were stables within the tested conditions (auto-sampler, bench-top, 3 cycles of freeze-thaw and short-term stability).

External Quality Control Analysis

Eight commercial EQCs were analyzed in duplicates to ensure the robustness of the developed method and procedure. In total, the quantification was performed on 28 samples of amphetamines, 24 samples of cocaine and its metabolites, 16 samples of cannabinoids, 36 samples of opioids and opiates, and 28 samples of benzodiazepines and z-drugs. Results comparison between the described method and the expected EQCs values are represented in Figure 3 for the different classes of molecules involved in DUID cases. A good correlation was observed between the expected and the obtained values. The relative standard deviation was lower than 20% for all tested substances, confirming the efficiency of the PRM quantitative acquisition mode for toxicological analyses. This method confirms the potential of PRM as a solid alternative to classical MRM approaches (Li et al., 2016; Lv et al., 2018; Joye et al., 2020).

CONCLUSION

A quick and efficient multi-analyte procedure was successfully developed in whole blood for the simultaneous quantification of 37 substances of interest in DUID cases. PRM represents an interesting alternative to classical MRM quantitative analyses, with the capability of precisely quantifying a large panel of substances with similar performance in terms of linearity, dynamic range, precision, and repeatability (Rauniyar, 2015). PRM quantification does not require *a priori* selection of the fragments of interest, leading to a simplified method development and better control over the quantification experiment, especially regarding multi-analyte approaches. The quantitative PRM procedure presented herein benefits the increased selectivity and sensitivity brought by HRMS, offering a clear alternative for quantitative toxicological analyses.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TJ supervised the project, participated in the design of the study, did several analyses, and wrote the manuscript. KR did most of the analytical work and participated to the reflexion toward the project. JD participated in the strategic choices toward the study and its design and critically revised the manuscript. JS participated in the supervision and design of the project and critically revised the manuscript. BF participated in the design of the study and critically revised the manuscript. MA participated in the strategic choices toward the study and its design and critically revised the manuscript. AT is the main contributor to the study design, supervised the project, and critically revised the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

The authors acknowledge financial support from the Swiss Federal Office of Public Health (contract no. 14.013792.204.0001/1300).

REFERENCES

- Augsburger, M., Donze, N., Menetrey, A., Brossard, C., Sporkert, F., Giroud, C., et al. (2005). Concentration of drugs in blood of suspected impaired drivers. *Forensic Sci. Int.* 153, 11–15. doi: 10.1016/j.forsciint.2005.04.025
- Augsburger, M., and Rivier, L. (1997). Drugs and alcohol among suspected impaired drivers in Canton de Vaud (Switzerland). *Forensic Sci. Int.* 85, 95–104. doi: 10.1016/S0379-0738(96)02084-1
- Bhatnagar, A., McKay, M. J., Crumbaker, M., Ahire, K., Karuso, P., Gurney, H., et al. (2018). Quantitation of the anticancer drug abiraterone and its metabolite Delta(4)-abiraterone in human plasma using high-resolution mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 154, 66–74. doi: 10.1016/j.jpba.2018.03.012
- Boulangier, B., Chiap, P., Dewe, W., Crommen, J., and Hubert, P. (2003). An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods: progress and limitations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32, 753–765. doi: 10.1016/S0731-7085(03)00182-1
- Bourmaud, A., Gallien, S., and Domon, B. (2016). Parallel reaction monitoring using quadrupole-orbitrap mass spectrometer: principle and applications. *Proteomics* 16, 2146–2159. doi: 10.1002/pmic.201500543
- Chindarkar, N. S., Wakefield, M. R., Stone, J. A., and Fitzgerald, R. L. (2014). Liquid chromatography high-resolution TOF analysis: investigation of MSE for broad-spectrum drug screening. *Clin. Chem.* 60, 1115–1125. doi: 10.1373/clinchem.2014.222976
- De Boeck, M., Missotten, S., Dehaen, W., Tytgat, J., and Cuypers, E. (2017). Development and validation of a fast ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction procedure combined with LC-MS/MS analysis for the quantification of benzodiazepines and benzodiazepine-like hypnotics in whole blood. *Forensic Sci. Int.* 274, 44–54. doi: 10.1016/j.forsciint.2016.12.026
- Domon, B., and Gallien, S. (2015). Recent advances in targeted proteomics for clinical applications. *Proteomics Clin. Appl.* 9, 423–431. doi: 10.1002/prca.201400136
- Elliott, S., Woolacott, H., and Braithwaite, R. (2009). The prevalence of drugs and alcohol found in road traffic fatalities: a comparative study of victims. *Sci. Justice* 49, 19–23. doi: 10.1016/j.scjus.2008.06.001
- Favretto, D., Visentin, S., Stocchero, G., Vogliardi, S., Snenghi, R., and Montisci, M. (2018). Driving under the influence of drugs: prevalence in road traffic accidents in Italy and considerations on per se limits legislation. *Traffic Inj. Prev.* 19, 786–793. doi: 10.1080/15389588.2018.1500018
- Fernandez Mdel, M., Wille, S. M., Kummer, N., Di Fazio, V., Ruysinckx, E., and Samyn, N. (2013). Quantitative analysis of 26 opioids, cocaine, and their metabolites in human blood by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ther. Drug Monit.* 35, 510–521. doi: 10.1097/FTD.0b013e31828e7e6b
- Gao, X., Li, H., Li, H., Dong, S., Chu, J., Guo, H., et al. (2018). Sensitive determination of nine anticoagulant rodenticides in blood by high resolution mass spectrometry with supported liquid extraction pretreatment. *Forensic Sci. Int.* 292, 39–44. doi: 10.1016/j.forsciint.2018.09.009
- Gonzalez, A. G., Herrador, M. A., and Asuero, A. G. (2010). Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards. *Talanta* 82, 1995–1998. doi: 10.1016/j.talanta.2010.07.071
- Hoffman, M. A., Fang, B., Haura, E. B., Rix, U., and Koomen, J. M. (2018). Comparison of quantitative mass spectrometry platforms for monitoring kinase ATP probe uptake in lung cancer. *J. Proteome Res.* 17, 63–75. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00329
- Hopfgartner, G., Varesio, E., Tschappat, V., Grivet, C., Bourgogne, E., and Leuthold, L. A. (2004). Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. *J. Mass Spectr.* 39, 845–855. doi: 10.1002/jms.659
- Jiang, H., Titsch, C., Zeng, J., Jones, B., Joyce, P., Gandhi, Y., et al. (2017). Overcoming interference with the detection of a stable isotopically labeled microtracer in the evaluation of beclabuvir absolute bioavailability using a concomitant microtracer approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 143, 9–16. doi: 10.1016/j.jpba.2017.04.030
- Joye, T., Sidibe, J., Deglon, J., Karmime, A., Sporkert, F., Widmer, C., et al. (2019). Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for broad-spectrum drug screening of dried blood spot as microsampling procedure. *Anal. Chim. Acta* 1063, 110–116. doi: 10.1016/j.aca.2019.02.011
- Joye, T., Widmer, C., Favrat, B., Augsburger, M., and Thomas, A. (2020). Parallel reaction monitoring-based quantification of cannabinoids in whole blood. *J. Anal. Toxicol.* 44, 541–548. doi: 10.1093/jat/bkz113
- Li, Y., Zhang, J., Jin, Y., Wang, L., Zhao, W., Zhang, W., et al. (2016). Hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry analysis with accurate-mass database and parallel reaction monitoring for high-throughput screening and quantification of multi-xenobiotics in honey. *J. Chromatogr. A* 1429, 119–126. doi: 10.1016/j.chroma.2015.11.075
- Liakoni, E., Yates, C., Dines, A. M., Dargan, P. I., Heyerdahl, F., Hovda, K. E., et al. (2018). Acute recreational drug toxicity: comparison of self-reports and results of immunoassay and additional analytical methods in a multicenter European case series. *Medicine* 97:e9784. doi: 10.1097/MD.00000000000009784
- Ly, X. J., Sun, Z., Wang, P. L., Yang, J., Xu, T. Y., Jia, Q. Q., et al. (2018). Chemical profiling and quantification of Dan-Deng-Tong-Nao-capsule using ultra high performance liquid chromatography coupled with high resolution hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 148, 189–204. doi: 10.1016/j.jpba.2017.09.034
- Lynch, K. L. (2016). CLSI C62-A: a new standard for clinical mass spectrometry. *Clin. Chem.* 62, 24–29. doi: 10.1373/clinchem.2015.238626
- Martin, J. L., Gadegebku, B., Wu, D., Viallon, V., and Laumon, B. (2017). Cannabis, alcohol and fatal road accidents. *PLoS ONE* 12:e0187320. doi: 10.1371/journal.pone.0187320
- Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., and Chavez-Eng, C. M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* 75, 3019–3030. doi: 10.1021/ac020361s
- Montenarh, D., Hopf, M., Maurer, H. H., Schmidt, P., and Ewald, A. H. (2014). Detection and quantification of benzodiazepines and Z-drugs in human whole blood, plasma, and serum samples as part of a comprehensive multi-analyte LC-MS/MS approach. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 803–818. doi: 10.1007/s00216-013-7513-x
- Office Fédéral de la Statistique (OFS) (2018). *Accidents des Transports en 2017*. OCCR-OFROU (2008). *Ordonnance de l'OFROU concernant l'ordonnance sur le contrôle de la circulation routière (art. 34)*. Available online at: <https://www.admin.ch/opc/fr/classified-compilation/20080078/index.html#id-6-6> (accessed May 27, 2020).
- Pelletti, G., Verstraete, A. G., Reyns, T., Barone, R., Rossi, F., Garagnani, M., et al. (2019). Prevalence of therapeutic drugs in blood of drivers involved in traffic crashes in the area of Bologna, Italy. *Forensic Sci. Int.* 302:109914. doi: 10.1016/j.forsciint.2019.109914
- Peters, F. T., Drummer, O. H., and Musshoff, F. (2007). Validation of new methods. *Forensic Sci. Int.* 165, 216–224. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.05.021
- Rauniyar, N. (2015). Parallel reaction monitoring: a targeted experiment performed using high resolution and high mass accuracy mass spectrometry. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 28566–28581. doi: 10.3390/ijms161226120
- Ravera, S., Monteiro, S. P., de Gier, J. J., van der Linden, T., Gomez-Talegon, T., Alvarez, F. J., et al. (2012). A European approach to categorizing medicines for

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2020.00626/full#supplementary-material>

- fitness to drive: outcomes of the DRUID project. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 74, 920–931. doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04279.x
- Ronsein, G. E., Pamir, N., von Haller, P. D., Kim, D. S., Oda, M. N., Jarvik, G. P., et al. (2015). Parallel reaction monitoring (PRM) and selected reaction monitoring (SRM) exhibit comparable linearity, dynamic range and precision for targeted quantitative HDL proteomics. *J. Proteomics* 113, 388–399. doi: 10.1016/j.jprot.2014.10.017
- Schott, H. F., Krautbauer, S., Horing, M., Liebisch, G., and Matysik, S. (2018). A validated, fast method for quantification of sterols and gut microbiome derived 5alpha/beta-stanols in human feces by isotope dilution LC-high-resolution MS. *Anal. Chem.* 90, 8487–8494. doi: 10.1021/acs.analchem.8b01278
- Schulz, M., Iwersen-Bergmann, S., Andresen, H., and Schmoldt, A. (2012). Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Crit. Care* 16:R136. doi: 10.1186/cc11441
- Senna, M. C., Augsburger, M., Aebi, B., Briellmann, T. A., Donze, N., Dubugnon, J. L., et al. (2010). First nationwide study on driving under the influence of drugs in Switzerland. *Forensic Sci. Int.* 198, 11–16. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.02.014
- Simonsen, K. W., Hermansson, S., Steentoft, A., and Linnet, K. (2010). A validated method for simultaneous screening and quantification of twenty-three benzodiazepines and metabolites plus zopiclone and zaleplone in whole blood by liquid-liquid extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 34, 332–341. doi: 10.1093/jat/34.6.332
- Snenghi, R., Pelletti, G., Frigo, A. C., Forza, G., Nalesso, A., Montisci, M., et al. (2018). The dangerous pattern of concurrent use of alcohol and cocaine among drunk-drivers of Northeast Italy. *Alcohol Alcohol* 53, 735–741. doi: 10.1093/alcalc/agy050
- Steuer, A. E., Eisenbeiss, L., and Kraemer, T. (2016). Blood alcohol analysis alone versus comprehensive toxicological analysis - systematic investigation of missed co-ingested other drugs in suspected alcohol-impaired drivers. *Forensic Sci. Int.* 267, 52–59. doi: 10.1016/j.forsciint.2016.08.009
- Steuer, A. E., Forss, A. M., Dally, A. M., and Kraemer, T. (2014). Method development and validation for simultaneous quantification of 15 drugs of abuse and prescription drugs and 7 of their metabolites in whole blood relevant in the context of driving under the influence of drugs-usefulness of multi-analyte calibration. *Forensic Sci. Int.* 244, 92–101. doi: 10.1016/j.forsciint.2014.08.022
- Vaiano, F., Busardo, F. P., Palumbo, D., Kyriakou, C., Fioravanti, A., Catalani, V., et al. (2016). A novel screening method for 64 new psychoactive substances and 5 amphetamines in blood by LC-MS/MS and application to real cases. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 129, 441–449. doi: 10.1016/j.jpba.2016.07.009
- Valen, A., Bogstrand, S. T., Vindenes, V., Frost, J., Larsson, M., Holtan, A., et al. (2019). Driver-related risk factors of fatal road traffic crashes associated with alcohol or drug impairment. *Accid. Anal. Prev.* 131, 191–199. doi: 10.1016/j.aap.2019.06.014
- Walsh, J. M., de Gier, J. J., Christopherson, A. S., and Verstraete, A. G. (2004). Drugs and driving. *Traffic Inj. Prev.* 5, 241–253. doi: 10.1080/15389580490465292
- World Health Organization (2015). *Global Status Report on Road Safety*. Geneva: World Health Organization. Available online at: https://www.who.int/violence_injury_prevention/road_safety_status/2015/en/ (accessed May 27, 2020).

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Joye, Rocher, Déglon, Sidibé, Favrat, Augsburg and Thomas. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

3. Conclusions du chapitre

Plusieurs approches quantitatives, développées dans le cadre de cette thèse, en mode PRM impliquant des instruments de type QExactive, ont été présentées dans ce chapitre. L'objectif premier était simplement d'améliorer des approches déjà existantes au laboratoire afin d'apporter une solution supplémentaire dans l'organisation du laboratoire. Ces méthodes permettent notamment de réduire à plusieurs niveaux le temps nécessaire au rendu du rapport toxicologique (temps de préparation des échantillons, temps d'acquisition, diminution du nombre de processus analytiques).

Ces premiers résultats plus qu'encourageants obtenus grâce aux avantages procurés par les approches LC-HRMS ont rapidement menés à de nouveaux développements. À l'heure actuelle, une méthode non publiée et développée durant ce travail permettant d'effectuer des tests de suivi d'abstinence de la consommation d'alcool est régulièrement utilisée en routine. La méthode basée sur la liste OFROU, permettant la résolution de la grande majorité des cas MDV à partir de 100 µL de sang devrait également être prochainement implémentée en routine. Au vu de ces résultats, il est raisonnable de penser que de nouveaux développements quantitatifs impliquant l'utilisation de méthode LC-HRMS en mode PRM seront effectués dans un futur proche dans plusieurs laboratoires de toxicologie.

4. Références du chapitre

1. Holman, S. W.; Sims, P. F.; Evers, C. E., The use of selected reaction monitoring in quantitative proteomics. *Bioanalysis* **2012**, *4* (14), 1763-86.
2. Anderson, L.; Hunter, C. L., Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol Cell Proteomics* **2006**, *5* (4), 573-88.
3. Boyd, R. K.; Basic, C.; Bethem, R. A., *Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry*. 2008.

4. Gallien, S.; Duriez, E.; Demeure, K.; Domon, B., Selectivity of LC-MS/MS analysis: implication for proteomics experiments. *J Proteomics* **2013**, *81*, 148-58.
5. Sherman, J.; McKay, M. J.; Ashman, K.; Molloy, M. P., How specific is my SRM?: The issue of precursor and product ion redundancy. *Proteomics* **2009**, *9* (5), 1120-3.
6. Abbatiello, S. E.; Mani, D. R.; Keshishian, H.; Carr, S. A., Automated detection of inaccurate and imprecise transitions in peptide quantification by multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Clin Chem* **2010**, *56* (2), 291-305.
7. Burnum-Johnson, K. E.; Nie, S.; Casey, C. P.; Monroe, M. E.; Orton, D. J.; Ibrahim, Y. M.; Gritsenko, M. A.; Clauss, T. R.; Shukla, A. K.; Moore, R. J.; Purvine, S. O.; Shi, T.; Qian, W.; Liu, T.; Baker, E. S.; Smith, R. D., Simultaneous Proteomic Discovery and Targeted Monitoring using Liquid Chromatography, Ion Mobility Spectrometry, and Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **2016**, *15* (12), 3694-3705.
8. Gallien, S.; Duriez, E.; Crone, C.; Kellmann, M.; Moehring, T.; Domon, B., Targeted proteomic quantification on quadrupole-orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics* **2012**, *11* (12), 1709-23.
9. Ronsein, G. E.; Pamir, N.; von Haller, P. D.; Kim, D. S.; Oda, M. N.; Jarvik, G. P.; Vaisar, T.; Heinecke, J. W., Parallel reaction monitoring (PRM) and selected reaction monitoring (SRM) exhibit comparable linearity, dynamic range and precision for targeted quantitative HDL proteomics. *Journal of Proteomics* **2015**, *113*, 388-99.
10. Rauniyar, N., Parallel Reaction Monitoring: A Targeted Experiment Performed Using High Resolution and High Mass Accuracy Mass Spectrometry. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16* (12), 28566-81.
11. Domon, B.; Gallien, S., Recent advances in targeted proteomics for clinical applications. *Proteomics Clinical Applications* **2015**, *9* (3-4), 423-31.

12. Hoffman, M. A.; Fang, B.; Haura, E. B.; Rix, U.; Koomen, J. M., Comparison of Quantitative Mass Spectrometry Platforms for Monitoring Kinase ATP Probe Uptake in Lung Cancer. *Journal of Proteome Research* **2018**, *17* (1), 63-75.
13. Bourmaud, A.; Gallien, S.; Domon, B., Parallel reaction monitoring using quadrupole-Orbitrap mass spectrometer: Principle and applications. *Proteomics* **2016**, *16* (15-16), 2146-59.
14. Gao, Y.; Chen, Y.; Yue, X.; He, J.; Zhang, R.; Xu, J.; Zhou, Z.; Wang, Z.; Zhang, R.; Abliz, Z., Development of simultaneous targeted metabolite quantification and untargeted metabolomics strategy using dual-column liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2018**, *1037*, 369-379.
15. Schott, H. F.; Krautbauer, S.; Horing, M.; Liebisch, G.; Matysik, S., A Validated, Fast Method for Quantification of Sterols and Gut Microbiome Derived 5alpha/beta-Stanols in Human Feces by Isotope Dilution LC-High-Resolution MS. *Analytical Chemistry* **2018**, *90* (14), 8487-8494.
16. Bhatnagar, A.; McKay, M. J.; Crumbaker, M.; Ahire, K.; Karuso, P.; Gurney, H.; Molloy, M. P., Quantitation of the anticancer drug abiraterone and its metabolite Delta(4)-abiraterone in human plasma using high-resolution mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2018**, *154*, 66-74.
17. Jiang, H.; Titsch, C.; Zeng, J.; Jones, B.; Joyce, P.; Gandhi, Y.; Turley, W.; Burrell, R.; Aubry, A. F.; Arnold, M. E., Overcoming interference with the detection of a stable isotopically labeled microtracer in the evaluation of beclabuvir absolute bioavailability using a concomitant microtracer approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2017**, *143*, 9-16.

18. Gao, X.; Li, H.; Li, H.; Dong, S.; Chu, J.; Guo, H.; Zhao, Q., Sensitive determination of nine anticoagulant rodenticides in blood by high resolution mass spectrometry with supported liquid extraction pretreatment. *Forensic Science International* **2018**, 292, 39-44.
19. Peters, F. T.; Drummer, O. H.; Musshoff, F., Validation of new methods. *Forensic Science International* **2007**, 165 (2-3), 216-24.
20. Lynch, K. L., CLSI C62-A: A New Standard for Clinical Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* **2016**, 62 (1), 24-9.
21. Boulanger, B.; Chiap, P.; Dewe, W.; Crommen, J.; Hubert, P., An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods: progress and limitations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2003**, 32 (4-5), 753-65.
22. Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M., Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry* **2003**, 75 (13), 3019-30.
23. Ravula, A.; Chandasana, H.; Setlow, B.; Febo, M.; Bruijnzeel, A. W.; Derendorf, H., Simultaneous quantification of cannabinoids tetrahydrocannabinol, cannabidiol and CB1 receptor antagonist in rat plasma: An application to characterize pharmacokinetics after passive cannabis smoke inhalation and co-administration of rimonabant. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2018**, 160, 119-125.
24. Jamwal, R.; Topletz, A. R.; Ramratnam, B.; Akhlaghi, F., Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry for simple and simultaneous quantification of cannabinoids. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2017**, 1048, 10-18.
25. Koppel, B. S.; Brust, J. C.; Fife, T.; Bronstein, J.; Youssof, S.; Gronseth, G.; Gloss, D., Systematic review: efficacy and safety of medical marijuana in selected neurologic disorders:

report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* **2014**, *82* (17), 1556-63.

26. Borgelt, L. M.; Franson, K. L.; Nussbaum, A. M.; Wang, G. S., The pharmacologic and clinical effects of medical cannabis. *Pharmacotherapy* **2013**, *33* (2), 195-209.
27. Blake, D. R.; Robson, P.; Ho, M.; Jubb, R. W.; McCabe, C. S., Preliminary assessment of the efficacy, tolerability and safety of a cannabis-based medicine (Sativex) in the treatment of pain caused by rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **2006**, *45* (1), 50-2.
28. Whiting, P. F.; Wolff, R. F.; Deshpande, S.; Di Nisio, M.; Duffy, S.; Hernandez, A. V.; Keurentjes, J. C.; Lang, S.; Misso, K.; Ryder, S.; Schmidtkofer, S.; Westwood, M.; Kleijnen, J., Cannabinoids for Medical Use: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of the American Medical Association* **2015**, *313* (24), 2456-73.
29. Burnier, C.; Esseiva, P.; Roussel, C., Quantification of THC in Cannabis plants by fast-HPLC-DAD: A promising method for routine analyses. *Talanta* **2019**, *192*, 135-141.
30. Lupica, C. R.; Riegel, A. C.; Hoffman, A. F., Marijuana and cannabinoid regulation of brain reward circuits. *British Journal of Pharmacology* **2004**, *143* (2), 227-34.
31. Watanabe, K.; Yamaori, S.; Funahashi, T.; Kimura, T.; Yamamoto, I., Cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of tetrahydrocannabinols and cannabiniol by human hepatic microsomes. *Life Sciences* **2007**, *80* (15), 1415-9.
32. Huestis, M. A.; Barnes, A.; Smith, M. L., Estimating the time of last cannabis use from plasma delta9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol concentrations. *Clinical Chemistry* **2005**, *51* (12), 2289-95.
33. 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. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, *45* (3), 495-503.

34. Leghissa, A.; Hildenbrand, Z. L.; Schug, K. A., A review of methods for the chemical characterization of cannabis natural products. *Journal of Separation Science* **2018**, *41* (1), 398-415.
35. Citti, C.; Braghiroli, D.; Vandelli, M. A.; Cannazza, G., Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2018**, *147*, 565-579.
36. Hazekamp, A.; Peltenburg, A.; Verpoorte, R.; Giroud, C., Chromatographic and spectroscopic data of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. *J Liq Chromatogr R T* **2005**, *28* (15), 2361-2382.
37. Teixeira, H.; Verstraete, A.; Proenca, P.; Corte-Real, F.; Monsanto, P.; Vieira, D. N., Validated method for the simultaneous determination of Delta9-THC and Delta9-THC-COOH in oral fluid, urine and whole blood using solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization. *Forensic Science International* **2007**, *170* (2-3), 148-55.
38. Ordonnance de l'OFROU concernant l'ordonnance sur le contrôle de la circulation routière. **2008**, *art. 34*.

Chapitre 4

**Application de l'HRMS au dépistage à large échelle
de la consommation de drogues et de médicaments sur
une population de conducteurs en Suisse romande**

Application de l'HRMS au dépistage à large échelle de la consommation de drogues et de médicaments sur une population de conducteurs en Suisse romande

Outre le développement d'approches analytiques pour améliorer les performances de routine, une étude concernant des aspects de sécurité routière et plus particulièrement la conduite sous l'influence de drogues et de médicaments a été planifiée avec le soutien de l'OFSP. Les objectifs de cette étude étaient doubles. Il s'agissait premièrement et principalement d'évaluer la prévalence de drogues et de médicaments parmi une population de conducteurs sélectionnés au hasard en Suisse romande. Dans un 2^{ème} temps, l'idée était d'évaluer l'utilisation d'un kit de prélèvement au bout du doigt comme méthode de prélèvement systématique lors de contrôles routier.

Avant de pouvoir procéder aux contrôles et aux analyses toxicologiques, il a fallu développer la procédure analytique LC-HRMS sur DBS présentée au Chapitre 2. En parallèle, il a également fallu obtenir l'accord de la commission d'éthique vaudoise (CER-VD 2017-00431, annexe 1).

Par la suite, plusieurs prélèvements ont été effectués lors de contrôles routiers organisés en collaboration avec les polices valaisanne et vaudoise. Les résultats des analyses ont également pu être mis en perspective avec les résultats d'une étude similaire réalisée entre 2006 et 2008 sur des prélèvements salivaires.

Ce 4^{ème} chapitre sera dédié à la présentation des divers aspects liés à cette étude ainsi que des résultats et enseignements majeurs qui ont pu en être tirés.

1. Présentation du projet

1.1. Problématiques de sécurité routière, en particulier la conduite sous l'influence de substances psychoactives

Les accidents de la route représentent une cause importante de blessures et de décès et leur prévention doit être une priorité absolue. Selon les statistiques de l'organisation mondiale de la santé (OMS), 1.35 millions de personnes sont décédées et environ 50 millions ont été blessées dans des accidents de la route à travers le monde en 2018¹. En Suisse, 187 personnes ont été tuées dans des accidents de la route en 2019. À ce chiffre s'ajoute 17641 blessés légers ainsi que 3639 blessés graves (Tableau 4-1)².

Année	Décès	Blessés graves	Blessés légers
1998	597	6213	21577
2002	513	5931	23843
2011	320	4437	18805
2019	187	3639	17641

Tableau 4-1 : Statistiques des victimes d'accidents de la route en 1998, 2002, 2011, et 2019 en Suisse.

Une des premières causes d'accident routier, spécialement dans les pays occidentaux, est liée à une incapacité à conduire causée par les effets d'une substance psychoactive, que ce soit l'alcool, des drogues ou des médicaments³⁻⁴. Aux États-Unis par exemple, l'association nationale des autoroutes et de la sécurité routière (NHTSA), annonçait que les conducteurs/trices sous l'emprise d'alcool étaient responsables de 28 % de tous les morts liés au trafic automobile et que les autres substances psychoactives étaient impliquées dans 16 % de tous les accidents impliquant des véhicules motorisés en 2014⁵. Si ces chiffres sont importants, la prévention améliore régulièrement la situation, notamment en Suisse où le nombre total de victimes d'accidents routiers a diminué significativement ces 26 dernières années (Figure 4-2-A). La situation globale de sécurité routière évolue donc favorablement. Cependant, malgré cette évolution positive, la situation est plus mitigée en ce qui concerne les

décès liés à l'état du conducteur (que ce soit la fatigue ou l'impact d'une substance psychoactive) puisque on dénote une légère augmentation entre 17 et 22 % de l'ensemble des accidents entre 1995 et 2018 (Figure 4-2-B)⁶. De manière intéressante, ces résultats sont comparables avec les statistiques américaines du CBHSQ (*Center for Behavioral Health Statistics and Quality*) qui démontrent une amélioration de la situation relative vis-à-vis de la conduite sous l'influence d'alcool mais une situation relativement stable concernant la conduite sous l'influence de drogues entre 2002 et 2014 (Figure 4-2-C).

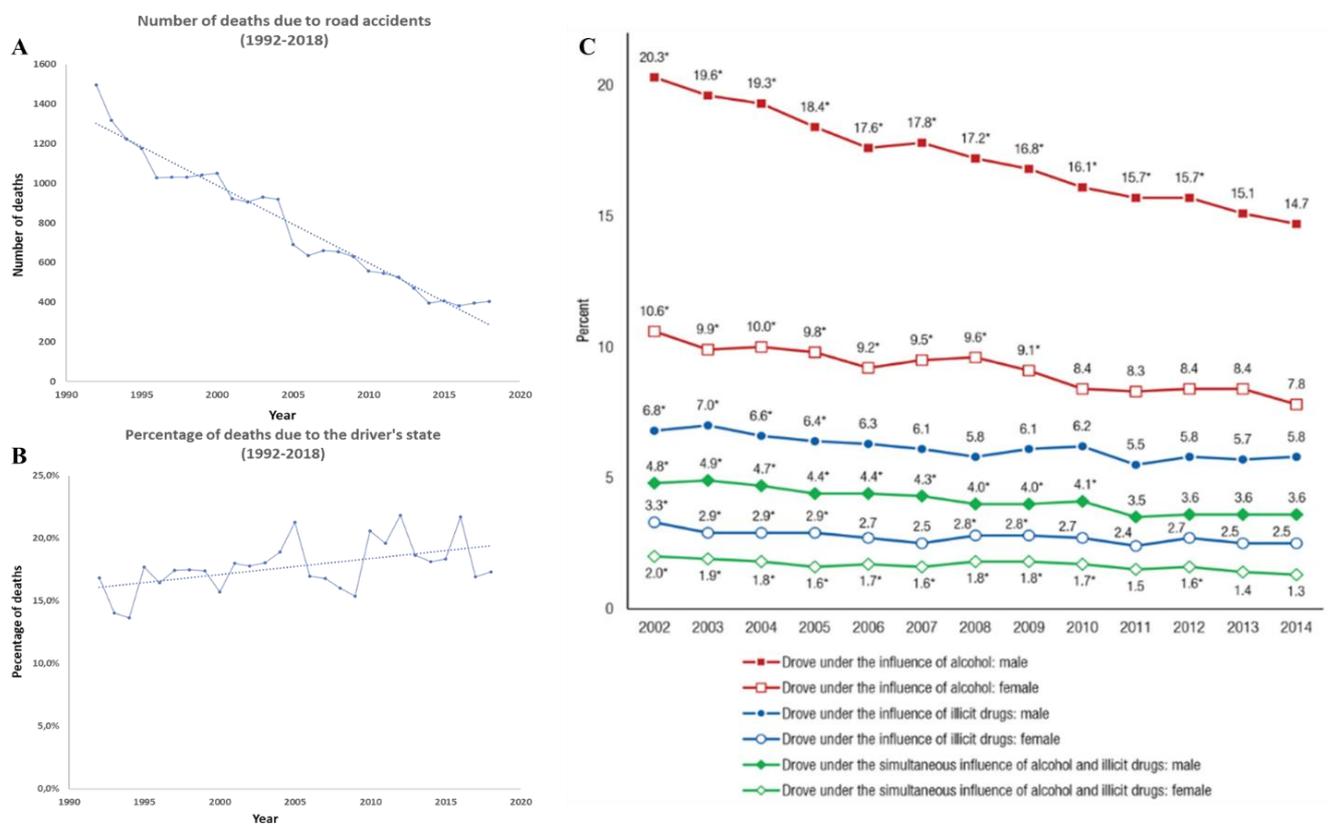


Figure 4-2 : Nombre total de décès liés aux accidents de la route en Suisse entre 1992 et 2018 (A) et pourcentage de cas d'accidents de la route liés à l'état du conducteur (B). Le panel C représente les statistiques américaines de conduite sous l'influence d'alcool, de drogues et des deux en même temps en fonction du sexe entre 2002 et 2014⁷.

S'il paraît évident que la consommation de substances psychoactives mène à une augmentation du risque d'accident, il est difficile d'établir une règle générale quant à leur impact sur la capacité à conduire⁸. Comme mentionné dans le chapitre précédent, la situation en Suisse est clairement définie concernant la consommation de drogues pour lesquelles des seuils

techniques sont établis, mais la consommation d'autres substances psychoactives nécessite une expertise approfondie basée sur 3 piliers. De plus, beaucoup de gens consommant des médicaments pouvant influencer la capacité à conduire ne sont pas conscients du risque associé pour la conduite malgré les recommandations⁹. En Europe, le projet DRUID (Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines), montre une volonté d'harmoniser la classification des substances psychoactives présentant un risque pour la conduite. Ces substances se démarquent par leur diversité et leurs effets. L'objectif du projet DRUID est d'apporter des recommandations, notamment aux décideurs politiques, basées sur des observations scientifiques¹⁰. Afin d'apporter une meilleure compréhension des cas MDV et d'améliorer la prévention, il est nécessaire de mieux connaître les limites du système actuellement en place, ainsi que la prévalence des substances consommées au volant.

1.2. Design de l'étude

En pratique, des conducteurs ont été interpellés de façon systématique par la police dans les cantons de Vaud, Fribourg et Valais (uniquement Vaud et Valais pour la 2^{ème} partie de l'étude) dans le cadre de contrôles routiers classiques. La présence policière sur cette étude était nécessaire afin d'intercepter au hasard les véhicules de manière encadrée. Toutefois, la police n'était impliquée dans aucun des aspects liés à la récolte des données. La police demandait dans un premier temps au conducteur, et spécialement en cas de suspicion de consommation d'alcool, de fournir un échantillon d'air alvéolaire pour l'éthylotest selon leur procédure classique. En cas de suspicion de consommation de drogue également, la procédure classique de police était mise en place (Figure 4-4).

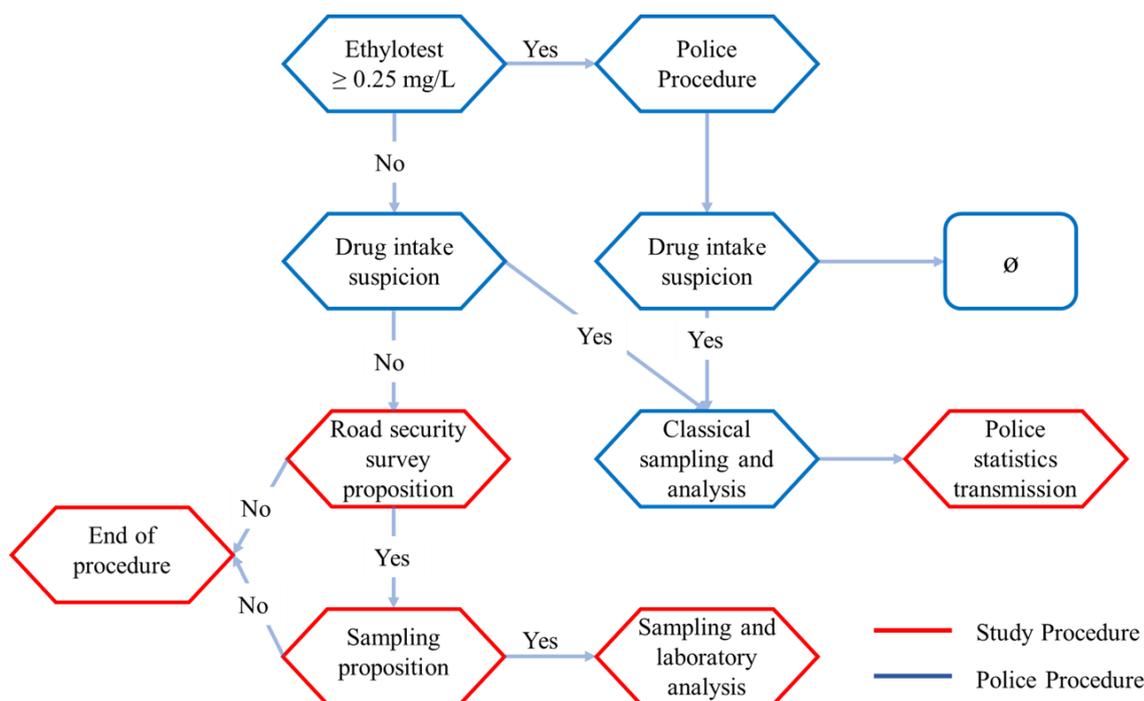


Figure 4-4 Design des parties de l'étude réalisées entre 2006 et 2008 sur des prélèvements de fluides oraux (OF) et entre 2017 et 2019 sur des prélèvements DBS

Une fois la procédure classique effectuée, la police proposait le choix aux conducteurs de disposer ou de répondre à un questionnaire de sécurité routière dans un cadre externe au contrôle policier (Annexe 2). En cas d'accord du conducteur, celui-ci était redirigé vers un interviewer proposant au conducteur de répondre à un questionnaire de sécurité routière sur une base volontaire et anonyme. Afin d'assurer cette base fondamentale de l'étude, la police ne devait en aucun cas être présente lors de la suite des opérations effectuées dès lors à une certaine distance du contrôle de police (Figure 4-5). Le consentement éclairé des participants était systématiquement demandé. Une fois ce consentement et les réponses au questionnaire obtenues sur une base anonyme et volontaire, le prélèvement d'un échantillon salivaire ou d'un spot de sang séché (DBS) était proposé aux conducteurs.

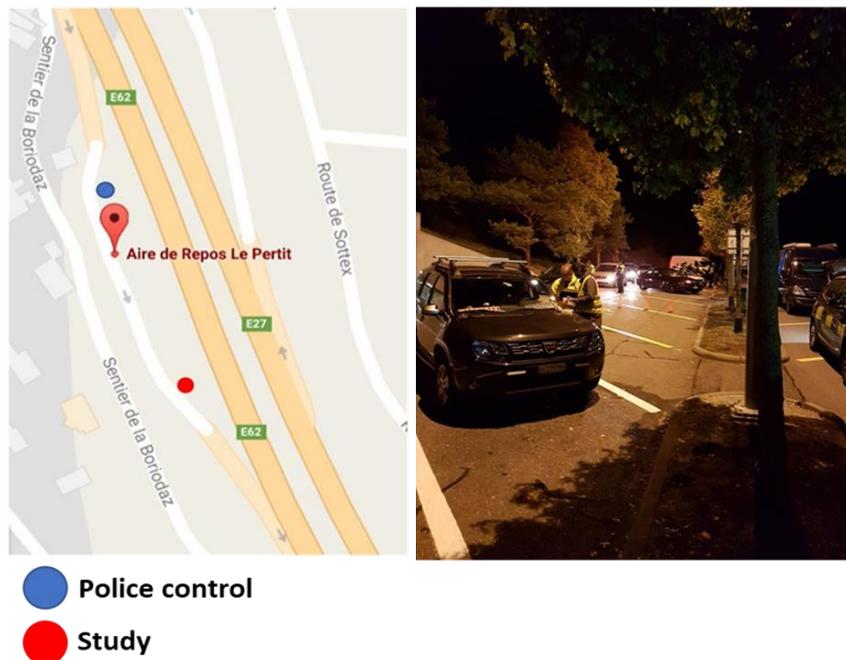


Figure 4-5 : Organisation des contrôles routiers liés à l'étude afin de respecter l'aspect volontaire et anonyme de l'étude

Le prélèvement salivaire était réalisé en utilisant une Salivette®. Le swab de prélèvement était placé dans la bouche du participant, auquel il était demandé de mâcher pendant environ 60 secondes pour stimuler la production de salive. Une fois au laboratoire, les prélèvements ont été centrifugés afin de séparer la salive du mucus et de certaines particules. Les échantillons ont ensuite été préparés grâce à un procédé impliquant une double extraction avant d'être analysés par LC-MS/MS.

En ce qui concerne le prélèvement de sang, une goutte de sang était obtenue au bout du doigt du volontaire à l'aide d'une lancette à usage unique après désinfection. La procédure utilisée est similaire à celle effectuée pour la mesure de la glycémie chez les patients diabétiques. Une fois la goutte de sang générée, celle-ci est portée à l'orifice d'entrée d'un capillaire. Le canal dédié au prélèvement se remplit par capillarité afin d'atteindre précisément un volume de 10 μL . En théorie, l'idée était d'obtenir entre 2 et 4 spots de 10 μL par participant à l'étude. L'analyse a ensuite été effectuée avec la procédure LC-HRMS développée au laboratoire et présentée au chapitre 2. Les sections suivantes sont dédiées à la présentation des résultats majeurs de cette étude. Les deux campagnes de prélèvement réalisés avec un intervalle de 11

ans ont été réalisés avec un design similaire, la seule différence résidant dans le type de prélèvement. Le gain technologique lié à l'utilisation de la LC-HRMS ciblant 1065 substances a permis de mettre en évidence davantage de substances, principalement dans les catégories de médicaments rencontrés peu fréquemment dans les cas MDV. Afin de pouvoir comparer les résultats des deux périodes de prélèvements, les résultats présentés par la suite se focalisent sur une liste de 107 substances majeures ciblées lors de la première période de prélèvement réalisée entre 2006 et 2008.

1.3. Approches de prélèvement systématiques minimalement invasives

Hors prélèvements de police, 1605 personnes ont accepté de participer à l'étude. Parmi les 1281 participants à la première phase de l'étude 1048 (82%) ont accepté de fournir un échantillon salivaire. Lors de la 2^{ème} partie de l'étude focalisée principalement sur les périodes à risque, 324 participants à l'étude ont mené à 299 (92 %) prélèvements. En raison de légers dysfonctionnement lors des prélèvements réalisés parfois dans des conditions difficiles, 1016 et 285 échantillons ont finalement été analysés respectivement. De manière générale, et plus particulièrement concernant le prélèvement DBS au bout du doigt, les gens ont montré une très bonne tolérance vis-à-vis de ces approches de prélèvement systématique peu invasives. Ces résultats ont été surprenants, dans la mesure où nous nous attendions à observer une meilleure tolérance vis-à-vis du prélèvement salivaire que vis-à-vis d'une prise de sang, même effectuée au bout du doigt. Il est intéressant d'observer que ce microprélèvement a ainsi été très bien accepté par les participants. Si on s'intéresse brièvement aux résultats de cette étude et notamment aux réponses au questionnaire (Tableau 4-1), un des résultats a particulièrement retenu notre attention. En effet, lorsqu'il était demandé aux participants quelle était, selon leur perception, quelle était la probabilité (de 1 à 10) d'être contrôlé par la police lors d'une conduite sous l'influence d'alcool, ou de drogues, cette probabilité était relativement faible (3.8 ± 2.3 et 3.3 ± 2.3 respectivement). Ces chiffres démontrent que globalement les gens ont une perception

faible du risque d'être contrôlé après avoir consommé une substance psychoactive. Ces chiffres vont dans le même sens que ceux annoncés par le CDC (Centers for Disease Control and Prevention) qui annonçait que seulement 1 % des 112 millions d'individus ayant eux-mêmes reporté une conduite sous l'influence d'alcool avait été arrêté en 2016 aux USA¹¹, ces chiffres étant d'ailleurs probablement une sous-estimation de la réalité.

	Salivary study 2006-2008 (N=1281)	DBS study 2017-2019 (N=324)
Female/Male drivers	30 % / 70 %	35 % / 65 %
Cars	97 %	93 %
Sampling acceptance	82 % (1048)	92 % (299)
Positive samples	10.5 % (106/1016)	13.3 % (38/285)
People declaring their drug consumption among positive	59 %	50 %
Average age (years)	41 ± 15 (16-90)	39 ± 15 (16-78)
Average age among positive to medicinal drugs	49 ± 16 (18-80)	46 ± 15 (20-74)
Average age among positive to drugs of abuse	33 ± 11 (19-61)	35 ± 11 (21-58)
Perception of the probability of being controlled after alcohol consumption (1 to 10)	-	3.8 ± 2.3
Perception of the probability of being controlled after an illicit drug consumption (1 to 10)	-	3.3 ± 2.3

Tableau 4-1 : Résultats des questionnaires de sécurité associés aux premiers résultats des analyses

L'analyse descriptive des données renforce d'ailleurs ce sentiment. En effet, sans considérer l'alcool, au total plus de 11 % des cas (147 sur 1301) ont été identifiés comme positifs à une substance psychoactive. Ces résultats sont à mettre en perspective avec le design de l'étude et ses limitations (qui seront présentés en détail dans la section 1.5) qui font que les résultats présentés ici sont probablement plutôt sous-estimés. Pourtant ces résultats ont été obtenus à partir de prélèvements réalisés sur des individus ayant préalablement été soumis à un contrôle de police et n'ayant pas été suspectés d'avoir consommé une substance psychoactive. Dans le même temps, la police a effectué 26 prélèvements, dont 100 % était positifs principalement à l'alcool et au cannabis. Ces résultats montrent que les polices ne demandent généralement pas d'analyse pour rien. Ce chiffre correspond à 2 % de positivité par rapport au nombre total de

cas prélevés. Ces informations démontrent qu'un contrôle effectué sur une base systématique pourrait permettre d'augmenter le nombre de cas de conduite sous l'influence d'une substance psychoactive mis en évidence par rapport à une approche basée sur la suspicion très spécifique mais peu sensible. Ces approches pourraient ainsi permettre d'améliorer l'aspect dissuasif des contrôles vis-à-vis de la conduite sous l'influence.

1.4. Comparaison des études sur des conducteurs suspectés avec les études réalisées sur base volontaire

Une comparaison des résultats des deux périodes de prélèvement réalisés sur base volontaire avec d'autres études portant sur des échantillons prélevés par la police sur la base d'une suspicion préalable a été effectuée. Cette comparaison a permis de mettre en évidence des différences importantes entre les deux types d'études. Par exemple, une étude réalisée en Suisse et pilotée par l'UTCF en 2010 basée sur l'analyse de 4668 échantillons collectés sur des conducteurs Suisse suspectés de conduire sous l'influence de substances psychoactives¹² révèlent une grande majorité de cas positifs à l'éthanol et au cannabis, et une très grande minorité de cas positifs à des médicaments (Figure 4-7). Notre étude effectuée sur base volontaire montre des résultats bien différents. En effet, la cocaïne est la substance la plus fréquemment mise en évidence suivie par plusieurs classes de médicaments dont principalement des opioïdes, des benzodiazépines et des antidépresseurs. Il semblerait donc que le système de prélèvements basé sur une suspicion préalable est moins sensible pour mettre en évidence la consommation de certaines substances. Ceci pourrait notamment s'expliquer par le fait qu'il est plus facile pour la police de mettre en évidence une consommation d'alcool ou de cannabis en raison de leurs impacts sur le comportement et sur certaines caractéristiques physiques. Il existe également un biais législatif pour le policier, puisqu'il est plus facile de poursuivre un conducteur sous l'influence d'alcool ou de l'une des 7 substances pour lesquelles il existe un seuil technique que sous l'influence d'une autre substance. Il résulte de ces différents

aspects une vision inexacte de la prévalence des drogues et médicaments consommés par les conducteurs, établie par ces études basées sur la suspicion.

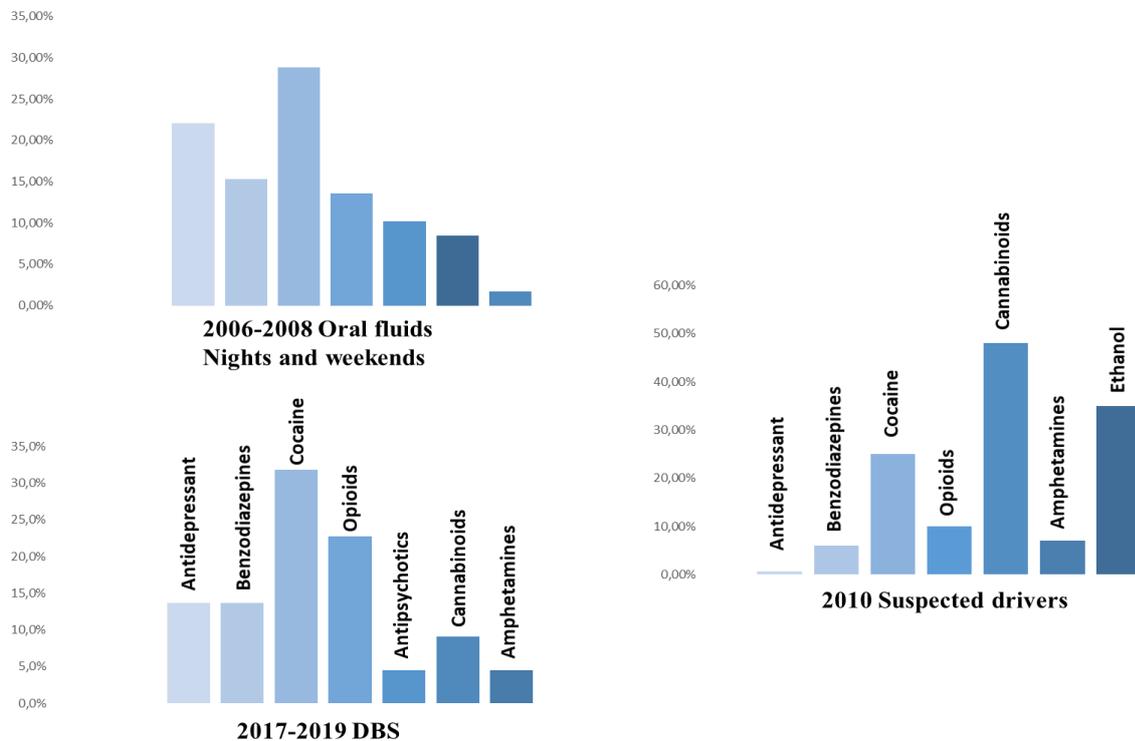


Figure 4-7 Comparaison des classes de substances détectées entre les deux parties de l'étude réalisés sur base volontaire (N=1256) et une étude où les prélèvements ont été réalisés sur la base d'une suspicion en 2010 en Suisse (N=4668)

Un biais de sélection est également observable en comparant la répartition des sexes ainsi que les âges moyens des participants aux différentes études réalisées en Suisse romande (Tableau 4-2). En effet, d'après ces chiffres, il semble que les jeunes et les hommes sont plus facilement suspectés par la police d'avoir conduit sous l'influence d'une substance psychoactive.

	% Homme	Age moyen
Friedrich-Koch et Iten, Suspicion 1994 (N=137)¹³	88%	26
Augsburger et Rivier, Suspicion 1997 (N=641)¹⁴	86%	27±7
Augsburger et al., Suspicion 2005 (N=440)¹⁵	91%	28±10
Senna et al., Suspicion 2010 (N=4794)¹²	89%	31±12
Fluides salivaires, Base volontaire 2006-2008 (N=1281)	70%	41±15
DBS, Base volontaire 2017-2019 (N=324)	66%	39±15

Tableau 4-2 : Pourcentage d'homme et âge moyen des participants aux études sur la prévalence de drogues et de médicaments parmi les conducteurs en Suisse romande

À la vue de ces statistiques, il nous a semblé intéressant d’investiguer les types de substances consommées en fonction des différentes catégories d’âge, sur la base des prélèvements obtenus lors des campagnes de prélèvements réalisées sur base anonyme et volontaire. En effet, ceci nous a permis d’observer que la proportion de conducteurs consommant au moins une drogue d’abus augmente pour les conducteurs de moins de 35 ans. Ces résultats sont en adéquation avec la littérature (Figure 4-8-B)⁷. Aucun cas positif à une drogue n’a été mis en évidence parmi les plus de 65 ans, et ce durant les deux parties de l’étude (Figure 4-8A). De manière intéressante, la tendance est complètement inversée en ce qui concerne la consommation de médicaments. Ces résultats confirment également que la suspicion de la police, ciblée sur des conducteurs d’âge moyen d’environ 30 ans, est adéquate concernant les drogues d’abus. Il semble néanmoins que la problématique des médicaments au volant est ainsi sous-estimée, renforçant l’intérêt des approches de prélèvements systématiques.

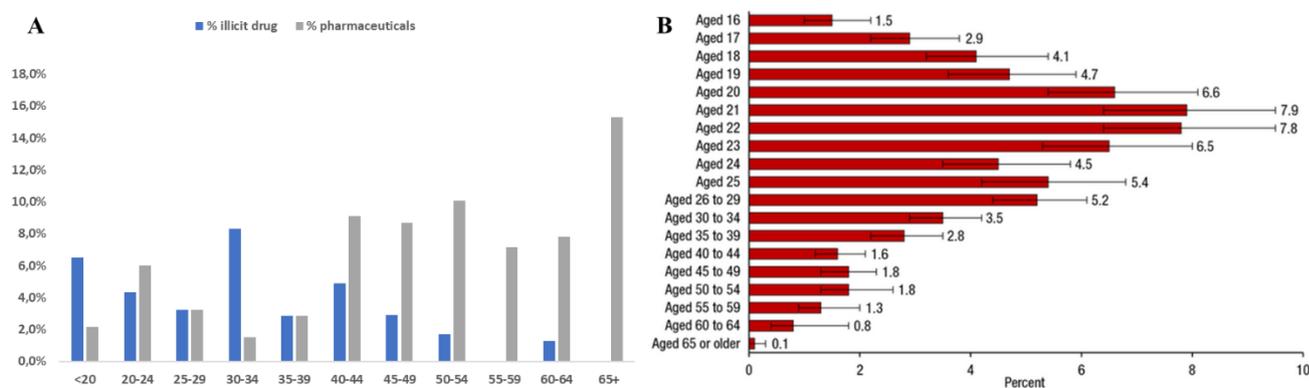


Figure 4-8 : Pourcentage de cas positif à une drogue (histogramme bleu) ou à un médicament (histogramme gris) en fonction de la catégorie d’âge lors des campagnes de prélèvement salivaire et DBS (A). La consommation de drogues parmi les conducteurs en fonction des catégories d’âge en 2014 aux USA est également représentée (B)⁷.

Mondialement, selon l’organisation mondiale de la santé, les accidents de la route représentent d’ailleurs la première cause de décès parmi les jeunes de moins de 30 ans¹. La conduite sous l’influence de substances psychoactives représente un facteur de risque important d’accident lors de la conduite automobile et ce particulièrement chez cette catégorie de conducteurs. La corporation d’assurances de Colombie britannique (ICBC) reporte notamment qu’entre 2013 et

2018, les jeunes de 16 à 25 ans étaient responsables de 26 % des accidents liés à la conduite sous l'influence, alors qu'ils ne représentaient que 13 % des conducteurs¹⁶. De plus, les statistiques générales concernant le risque d'accident de la route permettent de mettre en évidence la nuit et les week-ends (Figure 4-9) comme des périodes particulièrement à risque. Cet aspect est d'autant plus marqué lorsque l'on se focalise sur les statistiques d'accident associés à la conduite sous l'influence. En effet, entre 2013 et 2018, l'ICBC rapporte que 56 % des accidents liés à la conduite sous l'influence ont lieu un vendredi, samedi ou dimanche et que 38 % de ces accidents ont lieu entre 21 heures et 3 heures du matin¹⁶.

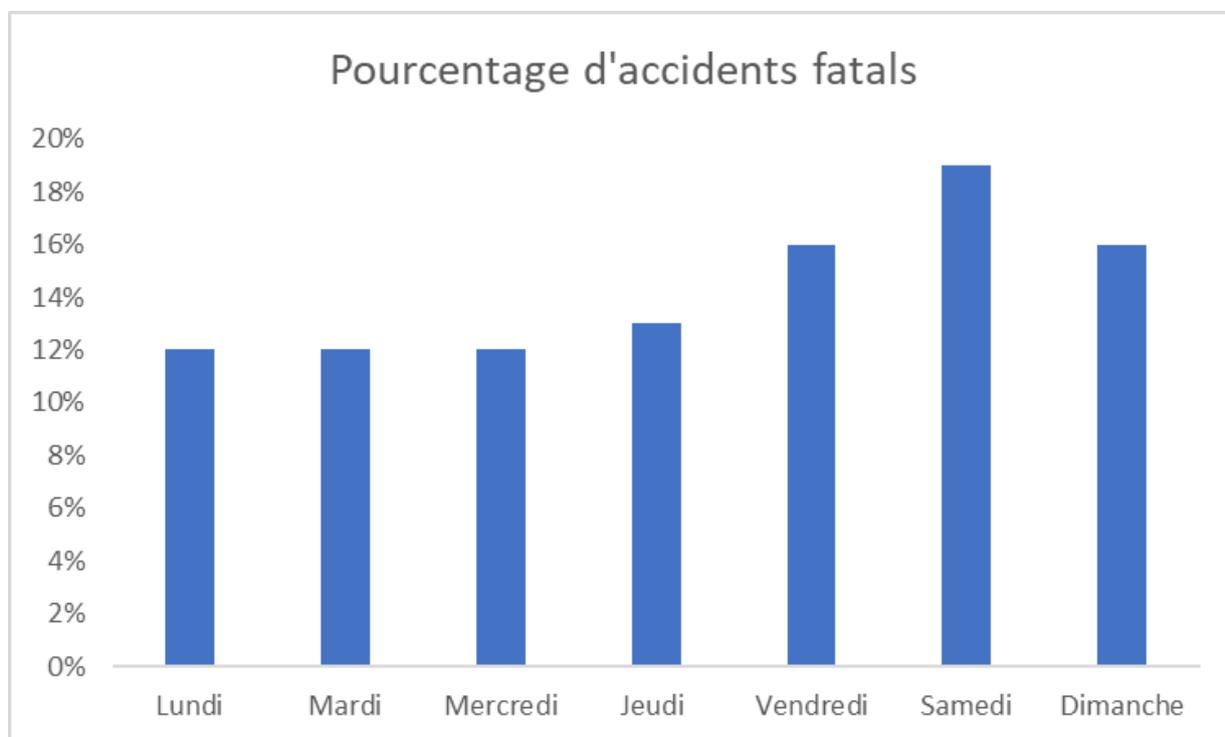


Figure 4-9: Statistiques d'accident fatals de la route en fonction des jours de la semaine en 2019 aux USA ¹⁷.

Pour cette raison, lors de la comparaison de la prévalence entre les deux périodes de prélèvement, nous nous sommes focalisés sur ces périodes à risque. Sur cette base-là, les résultats ne montrent pas d'évolution particulière de la situation par rapport au nombre de cas de conduite sous l'influence de substances psychoactives sur un intervalle de 11 ans (Figure 4-10).

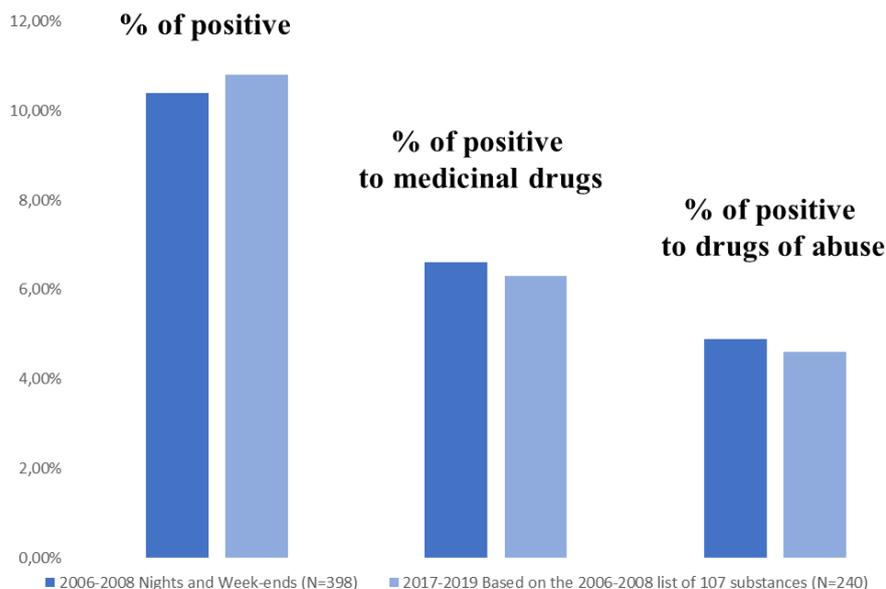


Figure 4-10 :

Comparaison des résultats obtenus entre les deux périodes de prélèvement en se focalisant sur la même liste de substances et sur la nuit et les weekends

L'ensemble des résultats présentés indique qu'il reste encore des efforts à fournir en termes de prévention. Ces approches nécessitent des moyens de systématiser de manière simple les prélèvements lors des contrôles et d'affiner les connaissances de la prévalence de drogues et médicaments parmi la population de conducteurs.

Dans cette optique, le développement d'approches d'échantillons minimalement invasives offre une alternative intéressante. Si les fluides salivaires présentent également quelques avantages, le développement technologique et la diversité des stratégies analytiques offrent de nouvelles opportunités pour le développement d'analyses quantitatives sur DBS¹⁸⁻²⁰. Ceci pourrait permettre à l'avenir d'effectuer à la fois les approches qualitative et quantitatives à partir d'un seul type de prélèvement.

1.5. Limitations de l'étude

Si les approches de prélèvement basées sur la suspicion présentent certains biais de sélection, l'étude présentée ici possède, malheureusement, également quelques limitations. En effet, le degré auquel la mesure de la prévalence réalisée ici peut être extrapolée à la totalité de la population des conducteurs de Suisse romande peut souffrir de quelques limites. Par exemple,

lorsque l'on compare les prélèvements effectués en milieu urbain avec les autres prélèvements, ceci ne prend pas en compte le fait sous-jacent qu'un nombre différent d'échantillons représentant chaque catégorie ont été collectés la nuit ou le week-end. Cet aspect est forcément renforcé durant la 2^{ème} session de prélèvement puisque le nombre d'échantillons analysés est plus faible.

Deuxièmement, malgré un fort taux d'acceptation des 2 types de prélèvements (82 % pour l'échantillonnage salivaire et 91 % pour le prélèvement DBS), il est raisonnable de penser que les conducteurs positifs à une substance psychoactive étaient moins enclins à donner un échantillon malgré l'aspect anonyme de l'étude, se dissociant de la procédure de police. De plus, il a été démontré dans des études précédentes concernant la consommation d'alcool, réalisées en Belgique, que lorsque les contrôles duraient plus d'une heure sur le même site, le nombre d'échantillons positifs avaient tendance à décroître²¹⁻²². Ceci s'explique probablement par le fait que les conducteurs passant par le site de contrôle prévenaient les autres conducteurs. La grande majorité des contrôles réalisés lors de cette étude duraient 90 minutes ce qui a pu induire un léger biais.

Troisièmement, il est à signaler que l'étude a été réalisée uniquement sur la base d'analyse qualitative, malgré l'utilisation de seuils de réponse basés sur les gammes thérapeutiques et les seuils légaux afin d'éviter les faux positifs. Bien évidemment, ces résultats ne suffisent pas à indiquer si les conducteurs souffraient d'une incapacité à conduire au moment des faits. Cependant, il est probable que les substances détectées aient eu un effet certain sur le comportement des conducteurs, et de ce fait, ait potentiellement augmenté le risque d'accidents. Ces limitations, notamment celles associées au design de l'étude, mènent probablement à une sous-estimation de la situation réelle. De manière générale, cette étude tend à montrer qu'il est nécessaire d'investir des ressources dans la prévention, notamment en passant par des stratégies d'échantillonnage systématique.

Enfin, le fait que les deux parties de l'étude se basent sur des prélèvements différents a pu influencer les résultats. En effet, la plupart des drogues diffusent dans la salive grâce à un gradient de concentrations. Comme mentionné précédemment, le taux de diffusion des différentes substances entre le plasma et la salive dépendra notamment de ce gradient de concentrations, ainsi que des propriétés physico-chimiques des substances d'intérêts, tel le pH salivaire et le pKa de la substance. Les composés basiques comme les amphétamines sont souvent bien assimilés dans la salive alors que les cannabinoïdes par exemple diffusent mal dans cette matrice. Pour cette raison, la détectabilité des substances peut varier d'une matrice à une autre. Pour pallier à cette problématique, des seuils de positivité différents ont été appliqués pour la salive et le sang respectivement.

**1.6. Article : First study on randomly controlled drivers in Western Switzerland,
evolution of the drug prevalence in the last 10 years**

Randomly controlled drivers in Western Switzerland, evolution of the drug prevalence in the last 10 years

Timothée Joye^{1,4}, Julien Déglon¹, Nicolas Donzé², Federica Gilardi^{1,4}, Jonathan Sidibe¹, Hicham Kharbouche¹, Bernard Favrat^{3,5}, Marc Augsburg¹, Aurélien Thomas^{1,4}

¹ Forensic Toxicology and Chemistry Unit, CURML, Lausanne University Hospital, Geneva University Hospitals, Switzerland

² Clinical Chemistry and Toxicology Unit, Wallis Hospital, Switzerland

³ Unit of medicine and traffic psychology, CURML, Lausanne University Hospital, Geneva University Hospitals, Switzerland

⁴ Faculty Unit of Toxicology, CURML, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Switzerland

⁵ Centre for Primary Care and Public Health (Unisanté), University of Lausanne, Switzerland

Corresponding author:

Prof. Aurelien Thomas

Faculty Unit of Toxicology, CURML

Vulliette 04 street,

1000 Lausanne 25 | Switzerland

Telephone: +41213143744

Fax: +41213147329

Aurelien.Thomas@chuv.ch

Abstract

Background

According to the Global status report on road safety 2018 from the World Health Organization, road traffic injuries represent the first cause of death for young adults under 30 years old. The use of psychoactive substances including alcohol, drugs and pharmaceuticals is a well-known risk factor regarding driving impairment. Our study aimed at assessing the prevalence of substances consumed by drivers in the Western Switzerland. Such studies are capitals to improve prevention and develop public awareness campaigns.

Methods

After a road safety survey, substances consumed by drivers were monitored on oral fluid (OF) samples and dried blood spot (DBS) samples collected on a voluntary basis at roadside controls in collaboration with local polices between 2006 and 2008 and between 2017 and 2019, respectively.

Findings

Out of the 1'557 drivers included in the study, 1'048 (82% of N=1'281) accepted to provide an OF sample while 252 (91 % of N=276) accepted to give a DBS sample. Based on a list of 107 substances which may impair the driving ability, the percentage of drivers positive to at least one substance was stable over time with 10.5 % (7.5 % medicinal drugs and 3.7 % drugs of abuse) and 10.8% (6.6 % to a pharmaceutical and 4.6 % to an illicit drug) of positivity between 2006-2008 and 2017-2019 periods, respectively. Regarding the consumption of drugs of abuse, the highest percentage of positivity was measured in biological fluids of drivers below 35 year old during nights and week-ends (8% and 9% between 2006-2008 and 2017-2019, respectively), periods which are considered particularly at risk with respect to fatal accidents in this segment of the population. Disturbingly, based on the road safety survey, we enlighten that driver's perception of the risk of getting positively controlled after impaired driving is low in study participants (3.4 on a 1-to-10 scale, n=252).

Interpretation

Despite a preliminary control of the police on suspected drivers, the number of positive cases measured in voluntary drivers who passed through the police check demonstrates the importance of systematic biofluid sampling strategies regarding driving under the influence of psychoactive substances. Although the number of fatal road accident globally decreases overtime, the results of this study reveals the need of both better prevention and repression that could potentially reduce the risk of fatal road accidents associated to drug consumption.

Funding

Swiss National Foundation, and Swiss Federal Office of Public Health

Research in context

Evidence before this study

Worldwide, one person is killed every 23 seconds and 50 million people per years are injured on the road according to the WHO's latest Global Status Report on Road Safety [1]. Despite significative efforts to improve the global road safety, the situation has improved in Europe with a 13 % reduction of road-traffic mortality between 2010 and 2016 [2]. A recent study revealed that the Chinese objective to halve deaths and injuries from road traffic accidents by 2020 is unlikely to be reached [3]. Among risk factors, driving under the effects of psychotropic substances is a major cause of road accident. Indeed, in the USA, alcohol-impaired driving accounted for 28 % of all traffic related deaths in 2016, and drugs were involved in 16 % of motor vehicle crashes in 2014 [4, 5]. Although the problem of alcohol in traffic remains actual despite efforts made in term of prevention, the national and international situation has evolved to an increasing concern about drugs and driving (illicit drugs or prescribed medication) [6, 7]. To date, most studies on this important problematic are performed on suspected drivers controlled by polices leading to a biased evaluation of the situation regarding drugs and driving.

To accelerate progress in road traffic safety by proving better targeted prevention and repression, there is a need for studies investigating the drug prevalence among drivers using systematic voluntary controls.

Added value of this study

Roadside controls were performed in collaboration with the polices of Western Switzerland. Based on drivers that were not suspected by the police, we acquired data based on a road safety survey and anonymous and voluntary roadside biofluid sampling on 1557 drivers. We provide important data regarding the drivers' perception of the risk of being controlled and reliable epidemiologic data on the prevalence of psychotropic substances consumed by drivers between 2006-2008 and 2017-2019.

Implications of all the available evidence

Evidence from this study indicates that several aspects of roadside controls repression and prevention towards driving under the influence of psychotropic substances can still be improved. We enlighten that people have a weak perception of the risk of being controlled. Indeed, suspicion-based sample collection leads to a selection bias which could be improved by the development of systematic control approaches. Moreover, the situation regarding drugs and driving is stable during the last 10 years, especially focusing on young drivers and at-risk time periods. The findings underline the importance of urgent efforts to reduce the number of cases of impaired driving through prevention and repression. This aspect is even more important to protect young drivers as a particularly vulnerable population since road accidents are the leading cause of death for people under 30 years old.

Introduction

Road accidents represent an important cause of deaths and injuries and their prevention must be a priority. According to the world health organization, 1.35 million of people died and about 50 million people were injured from road traffic accident worldwide in 2018 [1]. One of the major causes of road accidents especially in western countries is the impairment of driving capabilities caused by the effect of psychotropic substances, drugs, and alcohol [8, 9]. For instance, in the US, 27.7 million people drove under the influence of alcohol and 10.1 million under the influence of illicit drugs in 2014 [10]. Nevertheless, prevention and repression have improved the situation in the previous years, especially in Western countries. For instance, in Switzerland the number of victims of fatal accident has significantly decreased in the last 26 years. Despite this positive evolution of the situation, impaired drivers (either due to fatigue or a psychoactive substances) were still responsible for a more or less constant percentage (17 to 22 %) of fatal accidents between 1995 and 2018 [11].

The variety of drugs and pharmaceuticals does not allow the statement of a general rule on the driving capability even though the consumption of such substances leads to an enhancement of the risks of accident [12]. Moreover, many people being prescribed drugs that could impair driving are not aware about the risks [13]. In many countries, including Switzerland, a zero tolerance is applied concerning drivers towards classic drugs of abuse (DoA) [14-16]. Nevertheless, the situation is much more complex regarding the toxicological interpretation of prescribed substances towards driving impairments [17]. With respect to the Swiss law, the driving capability under pharmaceuticals is determined by “a three pillars expertise” including police assessment, medical expertise, and toxicological analysis in blood, being the biological matrix of reference regarding toxicological interpretation [16]. In Europe, the project Driving Under Influence of Drugs, Alcohol and Medicines (DRUID) shows a willingness to harmonize the classification of pharmaceuticals by providing scientific based recommendations to the driving under the influence of psychoactive substances issue [18]. Therefore, to increase DRUID cases understanding and improve both prevention and repression, a better knowledge of the prevalence of the consumed substances and their toxicological effects is of interest.

Previous studies have shown significative differences in terms of substances distribution between samples collected on suspected drug-impaired drivers [16, 19-21] and those collected in random approaches [22-24]. Indeed, the situation is in constant evolution regarding drivers' consumption habits with notably the arrival of new psychoactive substances on the market. Yet, those differences enlighten the fact that the people responsible for the on-site suspicion have disparities within the classes of substances they are able to identify. Therefore, for an unbiased sample collection and a more accurate knowledge of the prevalence of the consumed substances, it is

necessary to perform systematic sample collection and thus, develop on-site, simple, and non/less-invasive sampling strategies.

Among biological matrices, oral fluid (OF) presents several advantages regarding systematic sampling for drug of abuse monitoring. Unlike classical blood venepuncture, OF collection is non-invasive and does not require neither special logistic nor medical supervision [25]. Moreover, rapid on-site screening can be performed on OF giving insights on whether blood collection by venepuncture is required or not [26]. Nevertheless, OF sampling devices still need to be improved for effective and reliable roadside screening. Indeed, those tests notably suffer from a lack of sensitivity and a high variability, in particular regarding the collected volume leading to a significant number of false positive and false negative results [27, 28]. Moreover, blood remains the matrix of reference regarding DRUID analyses since it allows toxicological interpretation, meaning that there is a good correlation between the drug concentration and the pharmacological effects [29]. Various studies have been performed to find a correlation between OF and blood or plasma drug concentrations [30-32]. Unfortunately, there is a large inter-individual variation in the concentration ratios between those different matrices [33]. Indeed, there are differences between blood and OF in the way the drugs transfer into the biological matrix [25]. For instance, the trapping of basic compounds such as amphetamines is promoted into OF while more acidic compounds such as cannabinoids are better trapped in blood [34]. For those reasons, OF concentrations cannot be used to calculate a reciprocal concentration in the blood. Moreover, in cases of accidents or after a substance consumption inhibiting the formation of saliva, OF might be difficult to collect. Therefore, blood is also the matrix of reference to ensure consistency towards legal considerations.

The development of analytical tools, especially in terms of sensitivity allows the reduction of collected volumes of biological matrices. Various microsampling strategies have been proposed among which dried blood spot (DBS) is the most widely described [35, 36]. DBS implies the collection of only limited volumes of blood (5-10 μ L) performed by either finger or heel pricking. The sampling requiring minimal training can easily be performed in a non-medical environment either by a technician or by the patient himself [36]. The adsorption and drying of blood on a solid phase (cellulose) makes the analytes less reactive leading to a deactivation of most pathogenic agents, facilitated shipment and storage and reducing the costs [37, 38]. Various applications of drug analyses on DBS samples have been described, both for qualitative [39, 40] and quantitative approaches [35, 41].

The present study was organized between two time periods. The first was conducted between 2006 and 2008 on 1048 OF samples that were collected on a voluntary and anonymous basis on randomly controlled drivers in

Western Switzerland in collaboration with the local polices. The study did not interfere with the classical police procedures, drivers were only participating to the study if the police did not suspect any alcohol or drug consumption, Qualitative analyses were then performed by liquid chromatography (LC) hyphenated to tandem mass spectrometry (MS/MS) for the detection and identification of both drugs of abuse and pharmaceuticals. The development of microsampling strategies and analytical performance allows on-site less invasive and simple blood collection for both qualitative and quantitative approaches. During the second part of the study, 252 DBS samples were collected using a similar study design between 2017 and 2019 with periods of collect focusing on weekends and nights. In this second study, qualitative analyses were performed using a LC-HRMS strategy [40].

This study aims at presenting the prevalence of driving under the influence of drugs in Western Switzerland between 2006-2008 and 2017-2019. This study also gives an insight into the drivers' perception on roadside controls and about the bias associated with the current suspicion-based sampling procedures. The interest of the systematic use of an on-site blood microsampling device used by minimally trained technician in a non-medical environment is also discussed.

Methods

Study design

Both parts of the study were performed according to the same general protocol in collaboration with the local polices in Western Switzerland. Drivers were systematically stopped without any suspicion and the police officers proceeded with their classical procedure (Figure 1). Alcohol consumption could be measured on a systematic basis on all drivers using breath testing (breath alcohol concentration, BrAC) while drug testing was only performed in case of preliminary suspicion. If the drivers were either alcohol positive ($\text{BrAC} > 0.25 \text{ mg/L}$) or if a drug consumption was suspected, classical sampling and analysis was performed by the police assisted by a medical staff. The anonymous statistics regarding those samples were transmitted by the police after analysis. In case no consumption was suspected by the police, the drivers were brought to a second checkpoint where a collaborator introduced the study to the drivers and asked them if they wanted to participate to the study. In the first instance, the participants that had given their consent, were asked to answer a road security survey with the goal of introducing them to the study and reassuring them towards sampling. In a second instance, the participants were asked to provide a biological sample. During the first part of the study taking place between 2006 and 2008, the collected biological samples were OF while during the second part occurring between 2017 and 2019, DBS were

Western Switzerland in collaboration with the local polices. The study did not interfere with the classical police procedures, drivers were only participating to the study if the police did not suspect any alcohol or drug consumption, Qualitative analyses were then performed by liquid chromatography (LC) hyphenated to tandem mass spectrometry (MS/MS) for the detection and identification of both drugs of abuse and pharmaceuticals. The development of microsampling strategies and analytical performance allows on-site less invasive and simple blood collection for both qualitative and quantitative approaches. During the second part of the study, 252 DBS samples were collected using a similar study design between 2017 and 2019 with periods of collect focusing on weekends and nights. In this second study, qualitative analyses were performed using a LC-HRMS strategy [40].

This study aims at presenting the prevalence of driving under the influence of drugs in Western Switzerland between 2006-2008 and 2017-2019. This study also gives an insight into the drivers' perception on roadside controls and about the bias associated with the current suspicion-based sampling procedures. The interest of the systematic use of an on-site blood microsampling device used by minimally trained technician in a non-medical environment is also discussed.

Methods

Study design

Both parts of the study were performed according to the same general protocol in collaboration with the local polices in Western Switzerland. Drivers were systematically stopped without any suspicion and the police officers proceeded with their classical procedure (Figure 1). Alcohol consumption could be measured on a systematic basis on all drivers using breath testing (breath alcohol concentration, BrAC) while drug testing was only performed in case of preliminary suspicion. If the drivers were either alcohol positive (BrAC > 0.25 mg/L) or if a drug consumption was suspected, classical sampling and analysis was performed by the police assisted by a medical staff. The anonymous statistics regarding those samples were transmitted by the police after analysis. In case no consumption was suspected by the police, the drivers were brought to a second checkpoint where a collaborator introduced the study to the drivers and asked them if they wanted to participate to the study. In the first instance, the participants that had given their consent, were asked to answer a road security survey with the goal of introducing them to the study and reassuring them towards sampling. In a second instance, the participants were asked to provide a biological sample. During the first part of the study taking place between 2006 and 2008, the collected biological samples were OF while during the second part occurring between 2017 and 2019, DBS were

collected as described below. The samples were then anonymously analysed in the laboratory in a third instance. The police did not take part in any steps of the study procedure (Figure 1).

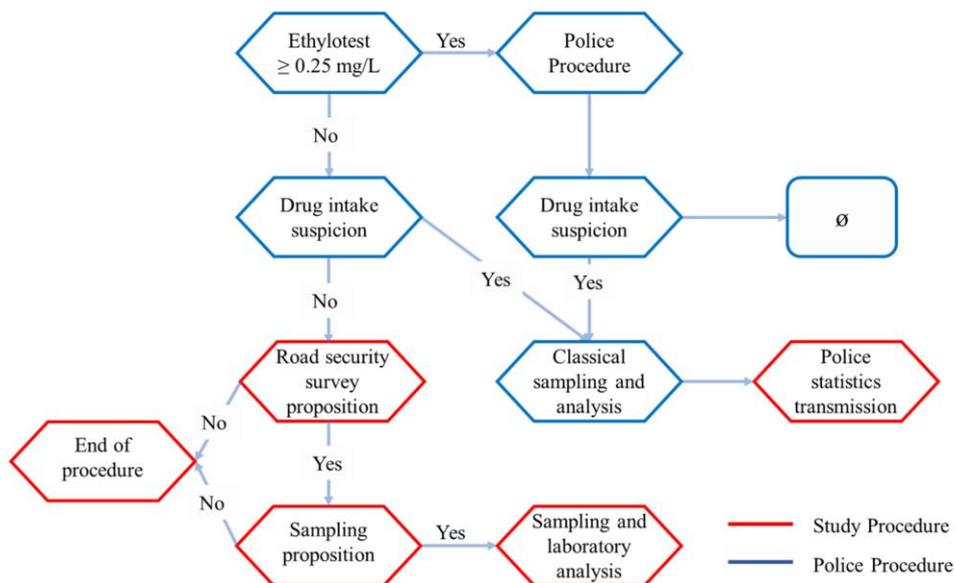


Figure 1: Design of both periods of the study (2006-2008; 2017-2019)

Biological sample collection

OF sampling and LC-MS/MS analyses during the 2006-2008 period

Samples of OF were collected using a Salivette® (Sarstedt®) in Vaud, Wallis and Fribourg between 2006 and 2008. The OF collection swab was placed in the patient's mouth and chewed for about 60 seconds to stimulate salivation. Then the swab was placed back in the Salivette with the absorbed saliva. Once in the lab, the samples were centrifuged for 2 minutes to separate the saliva from the swab, the particles and mucus. Samples were then kept at -20°C until analysis. A double extraction process was performed on the OF swabs using a 1:1 mix of methanol/acetonitrile to make sure that no substances were stuck in the cotton swabs. After extraction of the methanol/acetonitrile mix, the samples were analysed by LC-MS/MS (Shimadzu LC-20 Prominence and AB Sciex 3200 Q trap). The method was targeting a total of 107 substances in multiple reaction monitoring mode (MRM), including drugs of abuse and pharmaceuticals that are known to possibly affect driving capability. In parallel, ethanol was measured using a headspace (HS) gas chromatography (GC) coupled with a flame ionization detector (FID).

DBS sampling and LC-HRMS analyses during the 2017-2019 period

Blood drops were produced by finger pricking using a single use lancet (BD Microtrainer Contact-Activated Lancet®) after disinfection. The first blood drop was removed and the second was collected by capillarity using a HemaXis™ DBS sampling device. Using this protocol, from one to four 10 µL DBS were collected in Vaud and Wallis mainly by night and during weekends as a confirmative subset of samples, therefore focusing on time periods that have been highlighted to be at-risk by the first sampling collection campaign and previous studies. Samples were then separately placed in a minigrip® bag and kept at room temperature prior the analysis.

A double extraction process on DBS was performed using a published procedure for large scale screening of drugs and pharmaceuticals containing over 1065 substances [40].

Data treatment

After direct on-site anonymisation and randomisation, questionnaire data were associated with laboratory analyses using a reference number. Questionnaires included information regarding the type of vehicle, the drivers' sex and age, and the drivers' drug and alcohol consumption habits. Some questions were also concerning the drivers' perception of the probability of being controlled after either an alcohol or a drug consumption. Analytical results were separated depending on the type of road (city, highways, and main roads). All days of the week were included in the study as week (Monday to Friday 8 pm.) or weekend (Friday 8 pm. to Monday 4 am.) being separated in 3 time periods (4 am-12 pm "Morning", 12 pm-8 pm "Afternoon" and 8 pm-4 am "Night").

Ethics

An authorization to perform the study including the sampling was granted by the regional ethical committee (CER-VD 2017-00431 and CER-VD 2506).

Results

Questionnaire data

During the 24 controls carried out on OF during the first step of the study, 1048 out of 1281 (82%) participants accepted to provide a saliva sample, of which 1016 were analysed (Table 1). Among those participants 70 % were men and the average age was 41 ± 15 (ranging from 16 to 90) years old. During the second step of the study, 276 drivers accepted to participate to the study, among which 252 (91 %) accepted the blood sampling by finger pricking, showing a slight increase compared with the 2006-2008 OF part of the study. Among the participants to this second stage of the study, the average age was 38 ± 15 (ranging from 16 to 78), and 66 % were men. Those results are in adequation with published statistics acquired in 2015 in Switzerland where women were driving 40

% of the time (60 % for men) [42]. As expected, people positive to a medicinal drug were slightly older than the average of participants, while people positive to a drug of abuse were younger (Table 1) [43]. During the 2006-2008 period of the study, 59 % of the people declared their current drug consumption while this number decreased to 50 % during the second phase. As far as drugs of abuse are concerned, people were relatively transparent towards their cannabis consumption but only one person admitted another illicit drug consumption (cocaine). Interestingly, when asked about their perception on the probability (on a scale of 1 to 10) of getting caught by the police after either an abusive alcohol (BrAC > 0.25 mg/L) or an illicit drug consumption, the average answer was 3.9 ± 2.3 and 3.4 ± 2.3 respectively. Overall, similar results and tendencies were observed for the two periods of the study.

	Salivary study 2006-2008 (N=1281)	DBS study 2017-2019 (N=324)
Female/Male drivers	30 % / 70 %	35 % / 65 %
Cars	97 %	93 %
Sampling acceptance	82 % (1048)	92 % (299)
Positive samples	10.5 % (106/1016)	13.3 % (38/285)
People declaring their drug consumption among positive	59 %	50 %
Average age (years)	41 ± 15 (16-90)	39 ± 15 (16-78)
Average age among positive to medicinal drugs	49 ± 16 (18-80)	46 ± 15 (20-74)
Average age among positive to drugs of abuse	33 ± 11 (19-61)	35 ± 11 (21-58)
Perception of the probability of being controlled after alcohol consumption (1 to 10)	-	3.8 ± 2.3
Perception of the probability of being controlled after an illicit drug consumption (1 to 10)	-	3.3 ± 2.3

Table 1: Descriptive results regarding the study participants

Prevalence of drug consumption between 2006 and 2008

For OF samples collected during the 2006-2008 period, analyses were performed on a list of 107 substances including benzodiazepines, antidepressants, amphetamines, barbiturates, antipsychotics, opioids, cocaine, cannabinoids, and a few other substances considered as “other drugs”. Among the 1’016 analysed samples, 10.5 % (106) were positive to a substance (listed in supplemental Table 1) which could result in a driving-impairment (according to the DRUID 6th framework classification programme cofounded by the European Commission [44]). A total of 7.5 % (76) of the samples were positive to a medicinal drug while 3.7 % (38) were positive to an illicit drug. Based on the OF samples analyses, 35 participants (3.4 %) were positive to ethanol in concentration below the legal threshold after being tested by the police (BrAc < 0.25 mg/L). Among the medicinal drugs, the most detected class of molecules was antidepressants being present in 22 % of the positive cases while benzodiazepines

and opioids were present in 15 % and 14 % of the positive cases, respectively. Regarding drugs of abuse cocaine was the most consumed substance being present in 29 % of the 106 positive cases followed by cannabinoids (8.5 %). Data classification was performed based on the type of roads, and the time period within the day and the week (Figure 2). If limited differences regarding the number of medicinal drugs consumed between the different kinds of roads was observed, an increase of consumed drugs of abuse was measured in urban areas (Figure 2A). A similar tendency is observed when considering the period within the week, since an increase of the drugs of abuse consumption was observed during weekends which was the opposite for medicinal substances (Figure 2C). Considering the time of the day, the consumption of drugs of abuse was more pronounced during the night whereas an opposite trend was observed for medicinal drugs (Figure 2B). Interestingly, the tendency showing an increase of illicit drugs consumption during night and weekends was exacerbated focusing on the younger drivers (< 35 years old) (Figure 2D). Those results confirm weekend and night periods as particularly at-risk time-periods and drivers under 35 years old as the most prone to consume a drug of abuse, (Figure 3). Inversely and as expected, the prevalence of medicinal drug tends to increase within the group of participants above 65 years old.

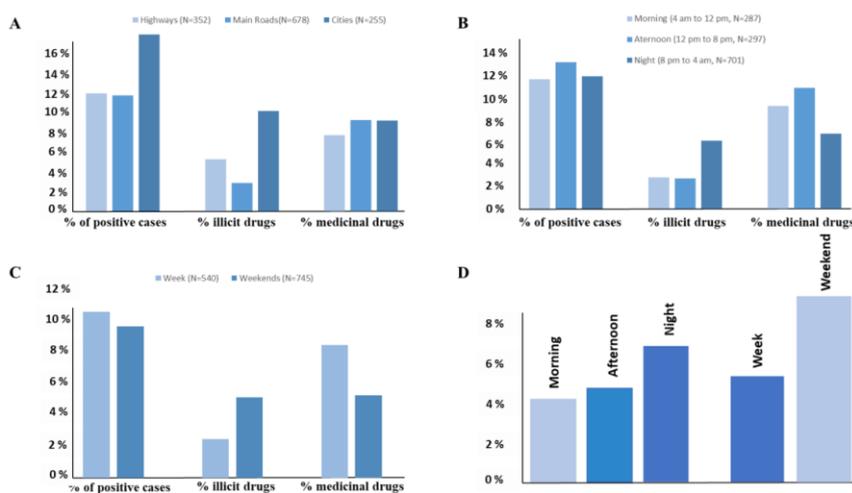


Figure 2: participants positivity for at least one substance impairing the driving ability. Comparison based on the road-type (A), the time period within the day (B) and week (C). The time periods comparison for young drivers (<35 years old) are presented in panel D regarding illicit drugs

During this 2006-2008 period, the police collected 19 blood samples of people suspected to drive under the effect of psychoactive substances. Among those samples 14 (74 %) were positive to ethanol with a concentration over 0.8 g/kg. The five other drivers were positive to cannabinoids above the legal threshold (THC > 1.5 ng/ml). Moreover, one driver positive to THC was also positive to methamphetamine while 3 drivers positive to alcohol

were also positive to cocaine, methadone and fluoxetine respectively. Interestingly, those consumptions concerning antidepressant, opioids, cocaine and amphetamines were not suspected by the police.

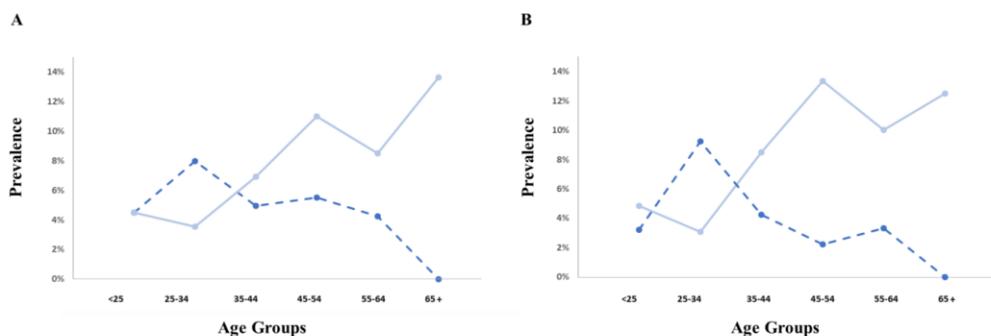


Figure 3: Age groups comparison for illicit and medicinal drugs during nights and week-ends between 2006 and 2008 (A) and between 2017 and 2019 (B). The continuous line represents the pharmaceuticals while the dotted line represents the drugs of abuse

Prevalence of drug consumption between 2017 and 2019

During this second period, analyses was carried out on a list of 1'065 compounds due to the implementation of HRMS screening procedure in our laboratory [40]. Among the 240 analysed DBS samples, 35 (14.6 %) were positive to at least one substance that could impair the driving ability. Among those samples, 24 (10 %) were positive to a pharmaceutical while 11 (4.6 %) were positive to a drug of abuse. By limiting the research to the same list of 107 substances monitored during the 2006-2008 period, the results are similar to those obtained between 2006 and 2008 with 26 (10.8 %) positive cases and 16 (6.6 %) considering only medicinal drugs (Figure 4A). In addition, the same classes of molecules than regarding OF fluid collection were highly represented. Indeed, opioids were present in 21 % of the cases followed by antidepressants and benzodiazepines being present in 13 % of the positive cases. Regarding drugs of abuse the same tendency can be observed with cocaine being present in 29 % of the positive cases and cannabinoids in 8.3 %. The main difference between the two periods of the study was thus mainly due to substances that have been classified as "other drugs" including mainly antihistaminic, anticonvulsants, anaesthetics, and antihypertensive (Supplemental Table 1) with an occurrence in 12 cases and which were not included in the analytical method during the first period of the study (Supplemental Figure 1). Interestingly, both the percentage of drivers consuming a drug and the classes of consumed substances measured during the nights and weekends were similar between the two periods. As observed within the first 2006-2008 period, drivers under 35 years old were more prone to be positive to an illicit drug while the number of people positive to a medicinal drug tends to proportionally increase with age (Figure 3). Despite the decrease of mortality observed on the Swiss road in the last 10 years, this result demonstrates that the consumption of drug of abuse may

be considered as stable during nights and weekends where the risk of mortal accident is the highest for young drivers [4, 45]. Globally, our study confirms that male drivers tend to consume more drugs than women (11.5 % and 14 % of positive cases against 8.3 % and 8.5 % for the two periods of the study, respectively)[43]. During the first period of the study, 1.7 % of women and 4.4 % of men were positive to a drug of abuse while those numbers reached 6.4 % and 7.4 % regarding medicinal drugs. During the 2017 to 2019 period, 5 % and 9.1 % of men and 3.4 % and 5.1 % of female were positive to an illicit drug and a medicinal drug, respectively.

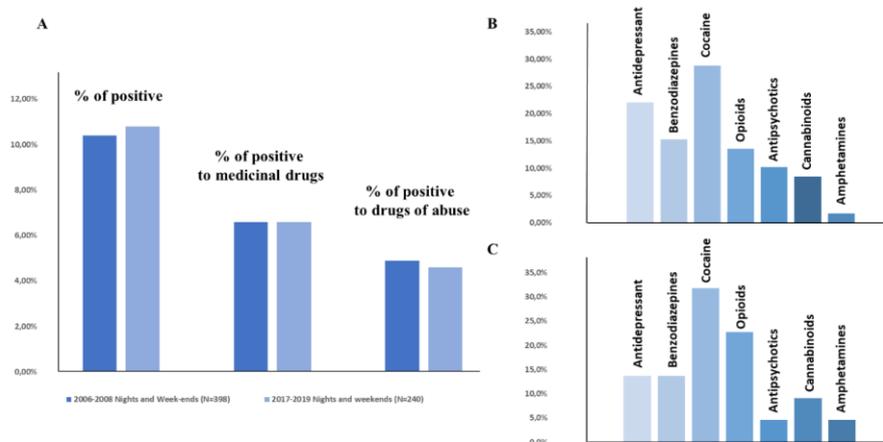


Figure 4 : Comparison of positive cases (A) and percentage of occurrence of the different classes of substances (normalized by the number of positive cases) between 2006-2008 (B) and 2017-2019 (C) focusing on nights and weekends based on the 2006-2008 list of 107 substances

During this period of the study, 7 samples were collected by the police. Among them, 3 were positive to alcohol above the legal cut-off (BrAC >0.25 mg/L) while 4 of them were positive to a drug. One was positive to medicinal drugs (one antidepressant and one benzodiazepine) and the 3 others were positive to a drug of abuse (2 cases of THC and one case of cocaine).

Discussion

Over the two periods, more than 50% of participants that were identified as positive declared their drug consumption (licit and illicit). Nevertheless, this number is slightly lower regarding the declaration of a drug of abuse consumption. During the whole study, only one person declared a drug of abuse consumption other than cannabis (cocaine). It is not surprising to observe that cannabis consumption is often declared and well tolerated since there is a more tolerant legislation towards its use, even if a zero tolerance is applied for drivers.

Remarkably, the response to the road safety questionnaire performed during our study revealed that people have a weak perception of the risk of being controlled while driving after the consumption of a psychoactive substance. While asked about the probability (from 1 to 10) of being control after alcohol and an illicit drug consumption, the answer was below 4 (3.9 and 3.4 ± 2.3 respectively). This feeling is not surprising knowing that the American Centers for Disease Control and Prevention (CDC) reported only 1 % of the 111 million self-reported alcohol-impaired driving cases were arrested for DRUID, which is probably an underestimation [45].

Moreover, the results must be put into perspective with the design of our study. Indeed, the drivers were invited to participate on an anonymous and voluntary basis only if no consumption was previously suspected by the police. Even considering those aspects that tend to minimise the total number of positive cases, more than 10 % of the collected samples were positive to a substance that might impair the driving abilities in both periods of the study. Those results enlighten the difficulty to bring to light a psychoactive substance consumption other than alcohol and cannabis based on visual and subjective perceptions and the need for systematic sampling strategies. This aspect is also supported when comparing the prevalence of substances in studies based on suspected and unsuspected drivers [16, 19, 20, 46]. In studies performed on suspected drivers, alcohol and cannabis represent most of the positive cases by far, where, in the present study cocaine and benzodiazepines have the highest prevalence regarding drugs. Another point that highlights that sample collection performed on suspected drivers are biased is the difference of drivers' average age. In studies performed on suspected drivers previously in Switzerland the average age was around 30 (27 ± 7 [20], 28 ± 10 [21] and 31 ± 12 [16]) while in both periods of this study the average age was 41 ± 15 between 2006 and 2008 and 38 ± 15 between 2017 and 2019. Those results enlighten the biased aspect of suspicion-based sample collection and the need for systematic approaches.

Globally DRUID is an important cause of road accident. In America, the National Highway Traffic Safety Administration (NHTSA), states that alcohol-impaired drivers were accounting for 28 % of all traffic-related deaths in 2014 and that psychoactive drugs were involved in 16 % of motor vehicle crashes [4]. In the 2006-2008 period of the study, weekends and nights were identified as particularly at-risk time periods regarding DRUID (Figure 2B and C). Those results are in adequation with the statistics provided by the NHSTA and the Insurance Institute for Highway Safety (IIHS) showing an increased risk of fatal crashes on Fridays, Sundays and especially on Saturdays [4]. Moreover, the CDC has identified night-time driving as particularly exposed to harm especially for the young drivers including DRUID as an increased risk factor [45]. In the present study, the fact that young drivers (under 35 years old) are more prone to drive under the influence of an illicit drug (Figure 3) especially during nights and weekends (Figure 2D) was confirmed. Remarkably, the comparison of both time periods of the

study suggests that there is no decrease of psychoactive substances consumption in the last ten years especially when focusing on at-risk time periods, even if the total number of fatal accidents has diminished. Those data tend to confirm the prevention regarding DRUID may still be improved.

In order to increase the efficiency of both the repression and prevention and provide unbiased strategies, this study shows that there is a need for systematic sampling procedures at the roadside. With the development of analytical tools and strategies, especially regarding quantitative analyses [35, 36, 47] on microsamples, DBS sampling presents new opportunities in this way. Indeed, both qualitative and quantitative analyses can be performed directly on those blood samples allowing direct toxicological interpretation. During the 2017-2019 period of our study, the introduction of high-resolution MS (HRMS) analyser have brought new opportunities by enlarging the number of substances of interest from 107 to more than 1000 from a fingertip blood sampling. The use of such an extended list was responsible for the main differences observed between the two periods and demonstrates the potential of combining such a highly selective and sensitive analytical detection with a simple blood microsampling in the scope of DRUID screening (Supplemental Figure 1).

Limitations

The extent to which the prevalence of drugs measured in this study can be extrapolated to the whole population of drivers in Western Switzerland might suffer a few limitations. For instance, when comparing the three different road types (Highway, Main Road and City), it does not consider the underlying fact that different number of samples representing each category were collected during weekends. The aspect is especially true regarding the 2017 to 2019 study on DBS samples where the total number of analysed samples (N) is limited.

Secondly, even if the number of people refusing the sampling is limited (18 % regarding OF and 9 % regarding DBS), it might be reasonable to assume that the drivers that were positive to any drugs were less likely to give a sample even though it was clear that the study was anonymous and dissociated from the police procedure. Moreover, it has been stated in previous studies regarding alcohol consumption in Belgium that if a control lasted for more than one hour at the same road site, the number of positive samples was decreasing [48, 49]. This is probably explained by the fact that drivers passing the controls site then warned other drivers. Almost all the controls performed within this study lasted for 90 minutes to collect enough samples which might result in a little bias.

Lastly, it should be noted that the second period of this study was limited to qualitative analyses even though thresholds were used in adequation with legal cut-offs or therapeutic ranges to avoid false positive results. Yet, the

presence of a substance in either blood or OF does not necessarily imply that this consumption resulted in a driving impairment. Nevertheless, it is likely that most detected substances did somehow affect the drivers' behaviour, therefore increasing the risk of accident. Those limitations notably associated with the study design tend to suggest that the results presented herein are probably an underestimation of the reality and that a significant investment is required in terms of prevention and repression with the uses of systematic sampling strategies.

Conclusion

In 2014, 38 million people above 16 year old were reported to drive under the influence of either alcohol, drugs or both in the USA[50]. In light of the risk of driving under the influenced of drugs on road accidents, our study assessed the prevalence of drug consumption in drivers of Western Switzerland between 2006 and 2008 and between 2017 and 2019. Interestingly, drivers reported a weak probability of being positively controlled by police whereas a high percentage of positivity to psychoactive substances was measured in biological fluids of these drivers. This positivity was particularly important for drivers below 35 years old during night and week-end periods. Despite the reduction of fatal accidents in Switzerland over the last 10 years, consumptions of drugs during driving was stable when comparing the 2006-2008 and 2017-2019 periods.

Even though the study was performed on a voluntary basis following a preliminary police control, the important number of positive cases should encourage systematic biofluid sampling strategies. Globally, those results reveal the need for better prevention and repression towards DRUID that could potentially contribute to reduce the risk of fatal accident.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from the Swiss Federal Office of Public Health (contract no. 14.013792.204.0001/1300) and the Swiss National Foundation (grant 32003B-109784).

The project was made possible through the operation and assistance of the Police Cantonale Vaudoise, the Police from Lausanne, The Police Cantonale Fribourgeoise and the Police Cantonale Valaisanne

The authors wish to thank the laboratory technicians for the analysis of blood and saliva, and also the staff for the roadside data collection. A special thank to Anna Latino, Patrice Mangin, Mathias Maitrejean, Jacques Cornuz, Paul Vaucher, Caroline Mathon and Frank Sporkert for their participation to the study.

References

- [1] World Health Organization, Global status report on road safety, (2018).
- [2] J. Passmore, Y. Yongjie, B. Mikkelsen, Progress in reducing road-traffic injuries in the WHO European region, *The Lancet Public Health*, 4 (2019) 272-273.
- [3] L. Wang, P. Ning, P. Yin, P. Cheng, D.C. Schwebel, J. Liu, Y. Wu, Y. Liu, J. Qi, X. Zeng, M. Zhou, G. Hu, Road traffic mortality in China: analysis of national surveillance data from 2006 to 2016, *Lancet Public Health*, 4 (2019) e245-e255.
- [4] R.B. Compton, A., Traffic Safety Facts Research Note: drugs and alcohol crash risk, in: U.S.D.o. Transportation (Ed.), National Highway Traffic Safety Administration, Washington DC, 2015.
- [5] N.H.T.S.A. (NHSTA), Traffic Safety Facts 2016 data: alcohol-impaired driving, U.S. Department of Transportation, 2017.
- [6] C.A. Kahn, Commentary: Drugs and Driving, *Ann Emerg Med*, 66 (2015) 670-672.
- [7] F.A. Wilson, J.P. Stimpson, J.A. Pagan, Fatal crashes from drivers testing positive for drugs in the U.S., 1993-2010, *Public Health Rep*, 129 (2014) 342-350.
- [8] S. Elliott, H. Woolacott, R. Braithwaite, The prevalence of drugs and alcohol found in road traffic fatalities: a comparative study of victims, *Sci Justice*, 49 (2009) 19-23.
- [9] D. Favretto, S. Visentin, G. Stocchero, S. Vogliardi, R. Snenghi, M. Montisci, Driving under the influence of drugs: Prevalence in road traffic accidents in Italy and considerations on per se limits legislation, *Traffic Inj Prev*, 19 (2018) 786-793.
- [10] R.N. Lipari, A. Hughes, J. Bose, Driving Under the Influence of Alcohol and Illicit Drugs, The CBHSQ Report, Rockville (MD), 2016, pp. 1-11.
- [11] Office Fédéral de la Statistique (OFS), Accidents des transports en 2017, (2018).
- [12] J.L. Martin, B. Gadegbeku, D. Wu, V. Viallon, B. Laumon, Cannabis, alcohol and fatal road accidents, *PLoS One*, 12 (2017) e0187320.
- [13] K. Young, Many People Prescribed Drugs That Could Impair Driving Aren't Warned About Risk, *Journal of Studies on Alcohol and Drugs*, (2017).
- [14] J.M. Walsh, J.J. de Gier, A.S. Christopherson, A.G. Verstraete, Drugs and driving, *Traffic Inj Prev*, 5 (2004) 241-253.
- [15] A.E. Steuer, L. Eisenbeiss, T. Kraemer, Blood alcohol analysis alone versus comprehensive toxicological analysis - Systematic investigation of missed co-ingested other drugs in suspected alcohol-impaired drivers, *Forensic Sci Int*, 267 (2016) 52-59.
- [16] M.C. Senna, M. Augsburg, B. Aebi, T.A. Briellmann, N. Donze, J.L. Dubugnon, P.X. Iten, C. Staub, W. Sturm, K. Sutter, First nationwide study on driving under the influence of drugs in Switzerland, *Forensic Sci Int*, 198 (2010) 11-16.
- [17] S. Ravera, S.P. Monteiro, J.J. de Gier, T. van der Linden, T. Gomez-Talegon, F.J. Alvarez, D.P.W. Partners, A European approach to categorizing medicines for fitness to drive: outcomes of the DRUID project, *Br J Clin Pharmacol*, 74 (2012) 920-931.
- [18] S.P. Monteiro, L. van Dijk, A.G. Verstraete, F.J. Alvarez, M. Heissing, J.J. de Gier, Predictors for patient knowledge and reported behaviour regarding driving under the influence of medicines: a multi-country survey, *BMC Public Health*, 12 (2012) 59.
- [19] E. Raes, A.G. Verstraete, Usefulness of roadside urine drug screening in drivers suspected of driving under the influence of drugs (DUID), *J Anal Toxicol*, 29 (2005) 632-636.
- [20] M. Augsburg, L. Rivier, Drugs and alcohol among suspected impaired drivers in Canton de Vaud (Switzerland), *Forensic Sci Int*, 85 (1997) 95-104.
- [21] M. Augsburg, N. Donze, A. Menetrey, C. Brossard, F. Sporkert, C. Giroud, P. Mangin, Concentration of drugs in blood of suspected impaired drivers, *Forensic Sci Int*, 153 (2005) 11-15.
- [22] H. Furuhaugen, R.E.G. Jamt, G. Nilsson, V. Vindenes, H. Gjerde, Roadside survey of alcohol and drug use among Norwegian drivers in 2016-2017: A follow-up of the 2008-2009 survey, *Traffic Inj Prev*, 19 (2018) 555-562.
- [23] D.J. Beirness, E.E. Beasley, A roadside survey of alcohol and drug use among drivers in British Columbia, *Traffic Inj Prev*, 11 (2010) 215-221.

- [24] A. Domingo-Salvany, M.J. Herrero, B. Fernandez, J. Perez, P. Del Real, J.C. Gonzalez-Luque, R. de la Torre, Prevalence of psychoactive substances, alcohol and illicit drugs, in Spanish drivers: A roadside study in 2015, *Forensic Sci Int*, 278 (2017) 253-259.
- [25] E. Bakke, G. Hoiseth, M. Arnestad, H. Gjerde, Detection of Drugs in Simultaneously Collected Samples of Oral Fluid and Blood, *J Anal Toxicol*, 43 (2019) 228-232.
- [26] H. Gjerde, K. Langel, D. Favretto, A.G. Verstraete, Detection of illicit drugs in oral fluid from drivers as biomarker for drugs in blood, *Forensic Sci Int*, 256 (2015) 42-45.
- [27] S.C.D. Dobri, A.H. Moslehi, T.C. Davies, Are oral fluid testing devices effective for the roadside detection of recent cannabis use? A systematic review, *Public Health*, 171 (2019) 57-65.
- [28] S. Gentili, R. Solimini, R. Tittarelli, G. Mannocchi, F.P. Busardo, A Study on the Reliability of an On-Site Oral Fluid Drug Test in a Recreational Context, *J Anal Methods Chem*, 2016 (2016) 1234581.
- [29] G. Skopp, Preatalytic aspects in postmortem toxicology, *Forensic Sci Int*, 142 (2004) 75-100.
- [30] S.M. Wille, E. Raes, P. Lillsunde, T. Gunnar, M. Laloup, N. Samyn, A.S. Christophersen, M.R. Moeller, K.P. Hammer, A.G. Verstraete, Relationship between oral fluid and blood concentrations of drugs of abuse in drivers suspected of driving under the influence of drugs, *Ther Drug Monit*, 31 (2009) 511-519.
- [31] S.W. Toennes, G.F. Kauert, S. Steinmeyer, M.R. Moeller, 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 (2005) 149-155.
- [32] H. Gjerde, J. Mordal, A.S. Christophersen, J.G. Bramness, J. Morland, Comparison of drug concentrations in blood and oral fluid collected with the Intercept sampling device, *J Anal Toxicol*, 34 (2010) 204-209.
- [33] K. Langel, H. Gjerde, D. Favretto, P. Lillsunde, E.L. Oiestad, S.D. Ferrara, A.G. Verstraete, Comparison of drug concentrations between whole blood and oral fluid, *Drug Test Anal*, 6 (2014) 461-471.
- [34] J.K. Aps, L.C. Martens, Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva, *Forensic Sci Int*, 150 (2005) 119-131.
- [35] J. Deglon, F. Versace, E. Lauer, C. Widmer, P. Mangin, A. Thomas, C. Staub, Rapid LC-MS/MS quantification of the major benzodiazepines and their metabolites on dried blood spots using a simple and cost-effective sample pretreatment, *Bioanalysis*, 4 (2012) 1337-1350.
- [36] A. Thomas, H. Geyer, W. Schanzer, C. Crone, M. Kellmann, T. Moehring, M. Thevis, Sensitive determination of prohibited drugs in dried blood spots (DBS) for doping controls by means of a benchtop quadrupole/Orbitrap mass spectrometer, *Anal Bioanal Chem*, 403 (2012) 1279-1289.
- [37] M. Wagner, D. Tonoli, E. Varesio, G. Hopfgartner, The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots, *Mass Spectrom Rev*, 35 (2016) 361-438.
- [38] S.P. Parker, W.D. Cubitt, The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies, *J Clin Pathol*, 52 (1999) 633-639.
- [39] F. Versace, J. Deglon, E. Lauer, P. Mangin, C. Staub, Automated DBS Extraction Prior to HPLC/MS LC-MS Target Screening of Drugs, *Chromatographia*, 76 (2013) 1281-1293.
- [40] T. Joye, J. Sidibe, J. Deglon, A. Karmime, F. Sporkert, C. Widmer, B. Favrat, P. Lescuyer, M. Augsburg, A. Thomas, Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for broad-spectrum drug screening of dried blood spot as microsampling procedure, *Analytica Chimica Acta*, 1063 (2019) 110-116.
- [41] N. Kummer, S.M. Wille, A. Poll, W.E. Lambert, N. Samyn, C.P. Stove, Quantification of EtG in hair, EtG and EtS in urine and PEth species in capillary dried blood spots to assess the alcohol consumption in driver's licence regranting cases, *Drug Alcohol Depend*, 165 (2016) 191-197.
- [42] Office Fédéral de la Statistique (OFS), Comportement de la population en matière de transport en 2015, chiffres clés - Suisse (2017).
- [43] H. Gjerde, A.S. Christophersen, P.T. Normann, T. Assum, E.L. Oiestad, J. Morland, Norwegian roadside survey of alcohol and drug use by drivers (2008-2009), *Traffic Inj Prev*, 14 (2013) 443-452.

- [44] D.t.f. programme, Classification of medicinal drugs and driving: Co-ordination and synthesis report, Driving under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines, European Commission, 2011, pp. 1-243.
- [45] C.a.P. Centers for Disease, Impaired Driving: Get the Facts, Motor Vehicle Safety, (2019).
- [46] T. Joye, J. Sidibe, J. Deglon, A. Karmime, F. Sporkert, C. Widmer, B. Favrat, P. Lescuyer, M. Augsburger, A. Thomas, Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for broad-spectrum drug screening of dried blood spot as microsampling procedure, *Anal Chim Acta*, 1063 (2019) 110-116.
- [47] M. Protti, J. Rudge, A.E. Sberna, G. Gerra, L. Mercolini, Dried haematic microsamples and LC-MS/MS for the analysis of natural and synthetic cannabinoids, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1044-1045 (2017) 77-86.
- [48] W. Vanlaar, Drink driving in Belgium: results from the third and improved roadside survey, *Accid Anal Prev*, 37 (2005) 391-397.
- [49] W. Vanlaar, Less is more: the influence of traffic count on drinking and driving behaviour, *Accid Anal Prev*, 40 (2008) 1018-1022.
- [50] R.N. Lipari, A. Hughes, J. Bose, Driving Under the Influence of Alcohol and Illicit Drugs, The CBHSQ Report, Rockville (MD), 2013-2016, pp. 1-11.

2. Conclusion du chapitre

Une application du screening LC-HRMS développé au chapitre 2 a été présentée dans ce chapitre. Les analyses ont été réalisées sur des prélèvements DBS effectués lors de contrôles au bord de la route en collaboration avec les polices de Suisse romande, grâce à un système de prélèvement microfluidique. Les résultats de ces sessions de prélèvement ont pu être mis en perspective avec les résultats d'analyses de fluides salivaires collectés dans des conditions similaires entre 2006 et 2008.

Ces analyses ont permis la mise en évidence des gains technologiques grâce à l'augmentation significative du nombre de substances ciblées. Ces résultats encourageants ont également permis de mettre en évidence certaines améliorations possibles des contrôles routiers et d'établir des cibles de la prévention concernant la sécurité routière et plus particulièrement celles liées la conduite sous l'influence de drogues et de médicaments.

Globalement, il ressort de cette étude que l'utilisation d'approches de prélèvements systématiques non biaisés, permettent d'obtenir une meilleure connaissance de la prévalence des substances consommées. Dans cette optique, le prélèvement DBS présente une excellente alternative puisque le développement actuel des approches quantitatives sur ce support, rendu possible grâce aux progrès technologiques, permettrait d'effectuer l'ensemble des analyses toxicologiques à partir d'un seul prélèvement.

3. Références du chapitre

1. World Health Organization, Global status report on road safety. **2018**.
2. OFROU Données des accidents de la Suisse: Analyses statistiques.

<https://www.astra.admin.ch/astra/fr/home/documentation/donnees-des-accidents-de-la-suisse/analyses-statistiques/indicateurs.html> (accessed 25.05.2020).

3. Elliott, S.; Woolacott, H.; Braithwaite, R., The prevalence of drugs and alcohol found in road traffic fatalities: a comparative study of victims. *Sci Justice* **2009**, *49* (1), 19-23.
4. Favretto, D.; Visentin, S.; Stocchero, G.; Vogliardi, S.; Snenghi, R.; Montisci, M., Driving under the influence of drugs: Prevalence in road traffic accidents in Italy and considerations on per se limits legislation. *Traffic Inj Prev* **2018**, *19* (8), 786-793.
5. Compton, R. B., A. *Traffic Safety Facts Research Note: drugs and alcohol crash risk*; National Highway Traffic Safety Administration: Washington DC, 2015.
6. Office Fédéral de la Statistique (OFS), Accidents des transports en 2017. **2018**.
7. Lipari, R. N.; Hughes, A.; Bose, J., Driving Under the Influence of Alcohol and Illicit Drugs. In *The CBHSQ Report*, Rockville (MD), 2016; pp 1-11.
8. Martin, J. L.; Gadegbeku, B.; Wu, D. V., V.; Laumon, B., Cannabis, alcohol and fatal road accidents. *PLoS ONE* **2017**, *12* (11), 16.
9. Young, K., Many People Prescribed Drugs That Could Impair Driving Aren't Warned About Risk. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs* **2017**.
10. Monteiro, S. P.; van Dijk, L.; Verstraete, A. G.; Alvarez, F. J.; Heissing, M.; de Gier, J. J., Predictors for patient knowledge and reported behaviour regarding driving under the influence of medicines: a multi-country survey. *BMC Public Health* **2012**, *12*, 59.
11. Centers for Disease, C. a. P., Impaired Driving: Get the Facts. *Motor Vehicle Safety* **2019**.
12. Senna, M. C.; Augsburger, M.; Aebi, B.; Briellmann, T. A.; Donze, N.; Dubugnon, J. L.; Iten, P. X.; Staub, C.; Sturm, W.; Sutter, K., First nationwide study on driving under the influence of drugs in Switzerland. *Forensic Sci Int* **2010**, *198* (1-3), 11-6.
13. Friedrich-Koch, A.; Iten, P. X., Die Verminderung der Fahrfähigkeit durch Drogen oder Medikamente. **1994**.

14. Augsburger, M.; Rivier, L., Drugs and alcohol among suspected impaired drivers in Canton de Vaud (Switzerland). *Forensic Sci Int* **1997**, *85* (2), 95-104.
15. Augsburger, M.; Donze, N.; Menetrey, A.; Brossard, C.; Sporkert, F.; Giroud, C.; Mangin, P., Concentration of drugs in blood of suspected impaired drivers. *Forensic Sci Int* **2005**, *153* (1), 11-5.
16. ICBC Impaired driving in B.C.: Learn the facts behind impaired driving in B.C. <https://www.icbc.com/road-safety/crashes-happen/impaired-driving/Pages/infographic.aspx> (accessed 07.05.2020).
17. Djurkovic, N. Car Accident Statistics in The U.S. – 2020 Update. <https://carsurance.net/blog/car-accident-statistics/> (accessed 07.05.2020).
18. Deglon, J.; Versace, F.; Lauer, E.; Widmer, C.; Mangin, P.; Thomas, A.; Staub, C., Rapid LC-MS/MS quantification of the major benzodiazepines and their metabolites on dried blood spots using a simple and cost-effective sample pretreatment. *Bioanalysis* **2012**, *4* (11), 1337-50.
19. Thomas, A.; Geyer, H.; Schanzer, W.; Crone, C.; Kellmann, M.; Moehring, T.; Thevis, M., Sensitive determination of prohibited drugs in dried blood spots (DBS) for doping controls by means of a benchtop quadrupole/Orbitrap mass spectrometer. *Anal Bioanal Chem* **2012**, *403* (5), 1279-89.
20. Protti, M.; Rudge, J.; Sberna, A. E.; Gerra, G.; Mercolini, L., Dried haematic microsamples and LC-MS/MS for the analysis of natural and synthetic cannabinoids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2017**, *1044-1045*, 77-86.
21. Vanlaar, W., Drink driving in Belgium: results from the third and improved roadside survey. *Accid Anal Prev* **2005**, *37* (3), 391-7.
22. Vanlaar, W., Less is more: the influence of traffic count on drinking and driving behaviour. *Accid Anal Prev* **2008**, *40* (3), 1018-22.

Chapitre 5

Conclusion et perspectives sur l'apport de l'HRMS en toxicologie forensique

Conclusion et perspectives sur l'apport de l'HRMS en toxicologie forensique

La toxicologie forensique est une discipline en constante évolution, et les développements technologiques associés permettent une grande diversité de stratégies analytiques possibles. Ce travail de thèse a permis de mettre en avant l'apport de l'HRMS pour l'analyse toxicologique systématique à travers plusieurs développements analytiques innovants et leurs applications. En effet, les nouvelles approches HRMS décrites dans ce travail permettent d'augmenter les performances analytiques (notamment le nombre d'identifications pour les approches de criblages), tout en réduisant les temps de préparation d'échantillons et d'analyse, ainsi que la quantité d'échantillon nécessaire. Ces stratégies nouvelles ont pu être évaluées et validées par l'analyse d'échantillons réels et une partie d'entre elles ont déjà pu être implémentées en routine.

Durant ce projet, une approche de criblage LC-HRMS sur des prélèvements DBS a permis d'utiliser un volume d'échantillon minimal (2 spots de 10 μ L) pour la détection et l'identification d'une large liste extensible de 1065 composés, le tout avec une préparation d'échantillon relativement simple. Cette méthode a d'ailleurs été validée sur des échantillons de cas réels et implémentée en routine pour le laboratoire avec plus de 2000 échantillons analysés par an. Une des problématiques actuelles des méthodes de screening est l'évolution constante des substances psychoactives. Cette problématique concerne notamment les nouvelles substances psychoactives (NPS) puisqu'en Europe, plus de 400 de ces substances ont été identifiés entre 2012 et 2017. Ces substances, dont la toxicité est mal connue, tant par les consommateurs que par les professionnels de la santé, présentent un risque important pour le consommateur. Cette évolution constante et rapide des substances d'intérêt nécessite une adaptabilité des méthodes analytiques en vue d'une identification rapide et fiable. L'utilisation

d'une méthode DDA basée sur une liste d'inclusion permet la mise à jour rapide de la méthode, tout en étant en accord avec cette nouvelle problématique. Les développements technologiques devraient également permettre d'améliorer la capacité à identifier une substance totalement inconnue, notamment par la mise en place d'approches non-ciblées.

De leur côté, les approches de microprélèvement présentent plusieurs avantages importants. Elles permettent de simplifier et de réduire les aspects de préparation d'échantillon, permettant ainsi de gagner un temps précieux et de faciliter le travail du personnel de laboratoire. L'utilisation de ce type de prélèvement permet également de diminuer la quantité de solvants nécessaires aux étapes de préparation d'échantillons, ce qui présente deux avantages principaux. Outre les aspects écologiques importants, ceci permet également de réduire les coûts de l'analyse déjà améliorés par la diminution des moyens logistiques nécessaires au prélèvement.

Cette simplification de la logistique liée au prélèvement nous a permis, en collaboration avec les équipes de police de Suisse romande, d'effectuer des prélèvements lors de contrôles routiers. Cette étude se basant sur deux campagnes de prélèvement minimalement invasifs à 11 ans d'intervalle a permis d'évaluer la prévalence des drogues et des médicaments et son évolution parmi une population de conducteurs. Les conclusions de cette étude permettent notamment de donner des pistes d'amélioration de la prévention associée aux cas MDV. Premièrement, les conducteurs estiment, dans l'ensemble, que le risque de se faire contrôler positifs lors de la conduite sous l'influence d'une substance psychoactive est faible. Deuxièmement, il apparaît qu'il existe des différences importantes, notamment en termes de population et de type de substances consommées, lorsque l'on compare les résultats obtenus sur des prélèvements basés sur une suspicion préalable avec ceux obtenus sur une base systématique. Enfin, les analyses ont montré qu'il n'y avait pas de réelle évolution de la prévalence de drogues et de médicaments au volant ces 11 dernières années. Cet aspect est particulièrement vrai concernant les périodes

à risques que sont les weekends et les nuits. Le nombre important de cas positifs à une substance psychoactive identifiés après un contrôle de police préalable tendent à démontrer l'utilité des approches de prélèvement minimalement invasives. En effet, l'utilisation de ce genre de prélèvement présentent un intérêt pour la recherche, notamment épidémiologiques, permettant d'évaluer de façon précise la prévalence des substances psychoactives consommées par les conducteurs et ainsi d'améliorer la prévention. Ces approches permettraient également aux policiers de pouvoir plus facilement mettre en place des contrôles systématiques sans nécessiter l'intervention de personnel médical. Une amélioration des outils liés aux aux contrôles routiers devrait permettre d'augmenter la peur d'être contrôlé et d'avoir ainsi un effet dissuasif.

Dans la suite du projet, des méthodes quantitatives LC-HRMS ont été développées et présentées, permettant d'élargir l'utilisation récente du mode PRM à l'analyse de drogues. Les analyses développées dans le cadre de ce travail s'inscrivent principalement dans le contexte de la toxicologie comportementale et sont liées aux problématiques de la conduite sous l'influence d'alcool, de drogues, ou de médicaments. Une première méthode a été mise au point, se focalisant sur l'analyse quantitative des cannabinoïdes. Cette classe de composés, qui pose notamment certains challenges d'un point de vue analytique, a pu être quantifiée avec un temps d'analyse réduit. Enfin, après ces résultats prometteurs, une méthode multi-analyte permettant de rassembler les principales substances identifiées dans les cas MDV en une seule approche a été mise au point avec succès. Cette approche permet de résoudre la grande majorité des cas de conduites sous l'influence de drogues ou de médicaments, à partir de 100 μ L de sang complet. La méthode a été validée et sera implémentée en routine à l'UTCF dans un futur proche. De manière générale, ces différentes approches quantitatives permettent un gain de temps important à plusieurs niveaux, à savoir pour la préparation d'échantillons, le temps d'analyse, et également en réduisant le nombre de procédures analytiques nécessaires à la résolution d'un cas. L'augmentation du débit d'analyses ouvre des perspectives intéressantes sur lesquels nous

reviendrons. L'impact de ce gain de temps se répercute à plusieurs niveaux. En effet, ces approches permettent de simplifier et de diminuer la charge de travail du personnel de laboratoire pour arriver à un résultat similaire. Pour le toxicologue en charge du rendu des résultats et de leur interprétation, cela permet également de diminuer le délai nécessaire à la réalisation d'un rapport d'expertise. Les développements technologiques et analytiques permettent donc d'aller dans ce sens, ce qui représente un intérêt considérable.

Ces approches ont montré d'excellents résultats et l'implémentation en routine d'une partie d'entre elles ont permis grâce à l'utilisation de l'HRMS d'améliorer les processus analytiques impliqués dans l'analyse d'échantillons de toxicologie forensique au laboratoire. Cependant, les développements technologiques sont constants, et dans un futur proche, d'autres stratégies analytiques devraient permettre de les exploiter et d'aller encore plus loin dans l'amélioration des approches toxicologiques. Le développement de stratégies de criblage non-ciblées fonctionnant sur l'acquisition de données indépendantes (DIA) paraissent extrêmement prometteuses. Par exemple, pour répondre à la problématique des NPS présentées plus haut, ce genre de stratégie basée sur la fragmentation de l'ensemble des molécules détectées apparaît comme idéale. En l'état actuel des choses, les outils bio-informatiques tels que les algorithmes de déconvolution nécessaires pour ces approches ne permettent malheureusement pas encore de décrypter complètement les spectres composites complexes obtenus lors de ce genre d'analyse. De façon plus générale, le développement de bibliothèques partagées en ligne, telles que *m/z cloud*¹, et de nouvelles ressources computationnelles devraient permettre d'améliorer ces différentes approches analytiques.

Les aspects d'automatisation et de débit d'analyses liés à une diminution du délai de rendu de résultats sont des aspects capitaux en toxicologie analytique. Dans cet optique, l'avènement de l'HRMS laisse présager un développement de nouvelles approches innovantes comme nous avons pu le montrer au cours de ce travail. La caractéristique principale de l'HRMS étant

l'augmentation de la sélectivité, il est raisonnable d'imaginer qu'à terme, ces approches permettront de s'affranchir totalement de toute étape séparative et d'ainsi de réduire considérablement le temps d'analyse. Des stratégies de ce type ont d'ailleurs d'ores et déjà fait leurs preuves dans d'autres domaines de la bioanalytique. Parmi ces stratégies analytiques, l'infusion directe par ESI-HRMS ou l'utilisation du MALDI comme source d'ionisation représentent des approches prometteuses. L'infusion directe par ESI-HRMS a notamment fait ses preuves pour l'analyse de petites molécules, notamment vis-à-vis d'approches métabolomique²⁻³. Les approches MALDI initialement réservées à l'analyse de macromolécules, notamment dans le domaine de la protéomique, permettent aujourd'hui de nombreuses applications pour l'analyse de drogues ou de médicaments⁴. Le développement des instruments HRMS n'est d'ailleurs pas étranger à cette évolution. En effet, cette technologie a permis de distinguer les molécules d'intérêt des constituants de faible poids moléculaire de la matrice, permettant ainsi leur détection et leur caractérisation.

A ce jour, l'utilisation de ce type d'approche haut-débit n'est que peu répandue en toxicologie forensique. En effet, si ces approches sont prometteuses, le gain de résolution offert par l'HRMS ne permet pas totalement de compenser la sélectivité apportée par la LC. Ceci est particulièrement valable en toxicologie forensique puisque les analyses s'effectuent habituellement dans des matrices complexes en présence d'analytes faiblement concentrés.

Il mérite toutefois de rappeler que le développement du MALDI Biotyper® a, par exemple, permis de révolutionner le domaine de la microbiologie clinique⁵⁻⁶. En effet, cette approche a permis d'identifier rapidement les microorganismes présents dans un échantillon en utilisant l'HRMS sans étape séparative. Cette stratégie est basée sur la détection d'une « empreinte » protéomique spécifique d'un microorganisme et à sa comparaison rapide avec une base de données.

Dans le domaine de la toxicologie médicale, quelques approches impliquant l'utilisation du MALDI pour la détection de drogues ont également été présentées, notamment pour des analyses sensibles de cocaïne dans les cheveux. De façon intéressante, une étude autrichienne a démontré l'intérêt d'une approche MALDI pour l'analyse d'échantillons de *drug checking*. Ce service de prévention permet aux utilisateurs de stupéfiants d'avoir accès à une analyse chimique de leurs échantillons solides, permettant de limiter les risques liés à la présence d'adultérants, de xénobiotiques ou d'une substance active non-conforme à celles annoncées par le vendeur. Cette étude a d'ailleurs contribué au développement d'un projet en collaboration avec l'association de prévention « Nuit Blanche ? » à Genève. Le but de ce projet (Annexe 3) était d'analyser des échantillons de *drug checking* par MALDI-HRMS en associant des approches de criblage ciblées et non-ciblées ainsi qu'une approche quantitative, le tout sans étape séparative.

D'autres types d'approches MALDI présentent également un intérêt pour des applications dans le domaine de la toxicologie. En effet, le développement récent de l'imagerie MALDI a permis pour la première fois de cartographier par spectrométrie de masse les analytes présent la surface d'une section tissulaire. En effet, il est maintenant possible d'obtenir des images ioniques pour centaines de molécules simultanément (tels que des drogues, des médicaments, des métabolites, des lipides ou encore des protéines) en effectuant l'acquisition leur profil par spectrométrie de masse pour chaque point du tissu avec une résolution spatiale de l'ordre de la dizaine de μm .

Durant cette thèse, nous avons pu démontrer le potentiel de cette approche au travers d'une étude visant à déterminer des changements métaboliques dans l'hippocampe de rats, associés à une consommation de cocaïne (Annexe 4). Malgré des applications encore limitées, cet exemple montre le potentiel de ces approches HRMS à haut débit en toxicologie forensique pour l'analyse de matrices complexes auxquelles le toxicologue forensique est confronté.

En conclusion, le travail réalisé durant cette thèse aura permis de profiter des avantages technologiques offerts par l'HRMS pour développer et proposer des alternatives et remplacer partiellement certaines procédures de routine dans notre unité de toxicologie et de chimie forensique. Ce gain technologique permet notamment d'augmenter le débit d'analyse et d'accélérer le rendu des résultats et des rapports d'expertise ce qui est un aspect crucial pour le toxicologue. Ce travail ouvre également de nouvelles perspectives concernant les développements analytiques futurs qui devraient contribuer à diminuer encore davantage le temps d'analyse et à améliorer la capacité d'identification des approches de criblages. L'amélioration de la sensibilité et l'augmentation de la vitesse d'acquisition des instruments devraient également permettre aux approches HRMS de concurrencer les approches SRM classiques pour les méthodes de quantification. Ces progrès analytiques devront également être accompagnés par le développement d'outils bio-informatiques puissants. Ceux-ci devraient permettre d'améliorer des stratégies déjà existantes comme cela a été mentionné pour les approches de screening, en utilisant des stratégies d'acquisition indépendante des données qui sont étroitement liés à l'évolution des algorithmes de déconvolution ou des bases de données partagées en ligne. Le développement de ces outils bio-informatiques devrait également permettre dans le futur d'aller encore plus loin et d'ouvrir l'éventail des possibilités pour le domaine. C'est le cas notamment pour les analyses métabolomiques et d'IMS qui génèrent une quantité importante de données complexes. L'évolution rapide des moyens bio-informatiques a déjà permis d'élargir le champ d'application dans le domaine relativement récent de la métabolomique. Il est néanmoins raisonnable de penser que l'amélioration de ces outils permettra d'optimiser encore l'exploitation de ces données, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives.

Références du chapitre

1. m/z cloud: Advanced Mass Spectral Database.
[https://www.mzcloud.org/DataViewer#/Main/reference\\$1/T2%23Standard/Recalibrated/389606](https://www.mzcloud.org/DataViewer#/Main/reference$1/T2%23Standard/Recalibrated/389606) (accessed 22.05.2020).
2. Fuhrer, T.; Zamboni, N., High-throughput discovery metabolomics. *Curr Opin Biotechnol* **2015**, *31*, 73-8.
3. Zampieri, M.; Sekar, K.; Zamboni, N.; Sauer, U., Frontiers of high-throughput metabolomics. *Curr Opin Chem Biol* **2017**, *36*, 15-23.
4. Marinach, C.; Alanio, A.; Palous, M.; Kwasek, S.; Fekkar, A.; Brossas, J. Y.; Brun, S.; Snounou, G.; Hennequin, C.; Sanglard, D.; Datry, A.; Golmard, J. L.; Mazier, D., MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of *Candida albicans* and fluconazole. *Proteomics* **2009**, *9* (20), 4627-31.
5. Angeletti, S.; Ciccozzi, M., Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: An updating review. *Infect Genet Evol* **2019**, *76*, 104063.
6. Dingle, T. C.; Butler-Wu, S. M., Maldi-tof mass spectrometry for microorganism identification. *Clin Lab Med* **2013**, *33* (3), 589-609.
7. Movig, K. L.; Mathijssen, M. P.; Nagel, P. H.; van Egmond, T.; de Gier, J. J.; Leufkens, H. G.; Egberts, A. C., Psychoactive substance use and the risk of motor vehicle accidents. *Accid Anal Prev* **2004**, *36* (4), 631-6.
8. Navazesh, M., Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci* **1993**, *694*, 72-7.

9. Toennes, S. W.; Steinmeyer, S.; Maurer, H. J.; Moeller, M. R.; Kauert, G. F., Screening for drugs of abuse in oral fluid--correlation of analysis results with serum in forensic cases. *J Anal Toxicol* **2005**, *29* (1), 22-7.
10. Huestis, M. A.; Cone, E. J., Relationship of Delta 9-tetrahydrocannabinol concentrations in oral fluid and plasma after controlled administration of smoked cannabis. *J Anal Toxicol* **2004**, *28* (6), 394-9.
11. Augsburger, M.; Giroud, C.; Rivier, L.; Tracqui, A.; Mangin, P., Car crash after massive ingestion of digoxin and midazolam. *Int J Legal Med* **1998**, *111* (4), 205-7.
12. Brookoff, D.; Cook, C. S.; Williams, C.; Mann, C. S., Testing reckless drivers for cocaine and marijuana. *N Engl J Med* **1994**, *331* (8), 518-22.
13. Augsburger, M.; Rivier, L., Drugs and alcohol among suspected impaired drivers in Canton de Vaud (Switzerland). *Forensic Sci Int* **1997**, *85* (2), 95-104.
14. Augsburger, M.; Donze, N.; Menetrey, A.; Brossard, C.; Sporkert, F.; Giroud, C.; Mangin, P., Concentration of drugs in blood of suspected impaired drivers. *Forensic Sci Int* **2005**, *153* (1), 11-5.
15. Senna, M. C.; Augsburger, M.; Aebi, B.; Briellmann, T. A.; Donze, N.; Dubugnon, J. L.; Iten, P. X.; Staub, C.; Sturm, W.; Sutter, K., First nationwide study on driving under the influence of drugs in Switzerland. *Forensic Sci Int* **2010**, *198* (1-3), 11-6.
16. Laumon, B.; Gadegbeku, B.; Martin, J. L.; Biecheler, M. B.; Group, S. A. M., Cannabis intoxication and fatal road crashes in France: population based case-control study. *BMJ* **2005**, *331* (7529), 1371.
17. Menetrey, A.; Augsburger, M.; Giroud, C.; Mangin, P., [Cannabis and automobile driving]. *Praxis (Bern 1994)* **2001**, *90* (34), 1398-407.

Annexe 1 : Protocole de demande à la commission d'éthique concernant l'étude au bord de la route

Dépistage à large échelle de la consommation de drogues et de médicaments sur une
population de conducteurs romands grâce à un prélèvement au bout du doigt

Investigateur Principal

Prof Bernard Favrat, médecin adjoint
Centre Universitaire Romand de Médecine Légale et Policlinique Médicale Universitaire
44 rue du Bugnon
1011 Lausanne

Tel. [021 314 49 06]
Email: Bernard.Favrat@chuv.ch

Co-investigateurs principaux

Prof Aurelien Thomas
Responsable R&D du laboratoire de toxicologie et chimie forensique
Chemin de la Vulliette 4
1000 Lausanne 25
Aurelien.Thomas@chuv.ch

Dr Marc Augsburger
Responsable du laboratoire de toxicologie et chimie forensique
Chemin de la Vulliette 4
1000 Lausanne 25
Marc.Augsburger@chuv.ch

Dr Julien Déglon
Pharmacien et Toxicologue
Centre Universitaire Romand de médecine légale
Rue Michel Servet 1
1206 Genève
Julien.Deglon@hcuge.ch

Doctorant Investigateur

Timothée Joye
Doctorant au laboratoire de toxicologie et chimie forensique
Timothee.Joye@chuv.ch

Produit d'étude

Système de prélèvement DBS

[ICH 6.1]

Formulaire de signature [ICH 6.1]

Je soussigné déclare avoir lu et approuvé ce protocole, annexes incluses. Je certifie que l'étude se déroulera conformément au protocole et aux Bonnes Pratiques Cliniques selon les réglementations internationales ICH, et suisses Oclin et LPth.

Bernard Favrat
Investigateur Principal

Signature

Date

Docteur, médecin associé
Titre

Centre Universitaire Romand de Médecine Légale et Policlinique Médicale Universitaire, 44
Rue du Bugnon, 1011 Lausanne
Institution et adresse

021 314 49 06
Téléphone

Formulaire de signature

Je soussigné déclare avoir lu et approuvé ce protocole, annexes incluses. Je certifie que l'étude se déroulera conformément au protocole et aux Bonnes Pratiques Cliniques selon les réglementations internationales ICH, et suisses OClin et LPth.

Aurelien Thomas

Co-investigateur principal

Signature

Date

Professeur Assistant

Titre

Centre Universitaire Romand de Médecine Légale, Chemin de la Vulliette 4, 1000 Lausanne

25

Institution et adresse

0213143744

Téléphone

Formulaire de signature

Je soussigné déclare avoir lu et approuvé ce protocole, annexes incluses. Je certifie que l'étude se déroulera conformément au protocole et aux Bonnes Pratiques Cliniques selon les réglementations internationales ICH, et suisses OClin et LPth.

Marc Augsburger
Co-investigateur principal

Signature

Date

Docteur
Titre

Centre Universitaire Romand de Médecine Légale, Chemin de la Vulliette 4, 1000 Lausanne
25

Institution et adresse

0213147085
Téléphone

Formulaire de signature

Je soussigné déclare avoir lu et approuvé ce protocole, annexes incluses. Je certifie que l'étude se déroulera conformément au protocole et aux Bonnes Pratiques Cliniques selon les réglementations internationales ICH, et suisses Oclin et LPth.

Julien Déglon

Co-investigateur principal

Signature

Date

Docteur

Titre

Centre Universitaire Romand de Médecine Légale, Rue Michel Servet 1, 1206 Genève

Institution et adresse

0792016662

Téléphone

Formulaire de signature

Je soussigné déclare avoir lu et approuvé ce protocole, annexes incluses. Je certifie que l'étude se déroulera conformément au protocole et aux Bonnes Pratiques Cliniques selon les réglementations internationales ICH, et suisses OClin et LPth.

Timothée Joye
Doctorant-investigateur

Signature

Date

Doctorant
Titre

Centre Universitaire Romand de Médecine Légale, Chemin de la Vulliette 4, 1000 Lausanne
25

Institution et adresse

0213147087
Téléphone

Table des matières

RESUME SYNOPTIQUE DU PROTOCOLE	156
STUDY FLOWCHART	157
SCHEMA DE L'ETUDE	157
ABREVIATIONS	158
1. BACKGROUND [ICH 6.2]	159
1.1. Pré-requis	159
1.2. Le produit d'étude et la maladie	159
1.3. Rationnel de l'étude	159
2. OBJECTIFS [ICH 6.3]	160
3. DESIGN [ICH 6.4]	160
3.1. Description globale	160
3.2. Critères de jugement	163
3.3. Randomisation et insu	164
3.4. Durée de l'étude pour les sujets, procédures de sortie d'étude et de levée d'insu 164	
3.5. Liste des données répertoriées dans le CRF	165
4. POPULATION DE L'ÉTUDE [ICH 6.5]	165
4.1. Critères d'inclusion	165
4.2. Critères de non-inclusion	165
4.3. Sortie d'étude	165
4.4. Procédures de sélection et de recrutement	165
5. TRAITEMENTS DE L'ÉTUDE (Y COMPRIS LE PLACEBO) [ICH 6.6]	166
6. CRITÈRES D'ÉVALUATION [ICH 6.7]	166
7. GESTION DES DONNÉES [ICH 6.10 & 6.13]	166
7.1. Données sources	166
7.2. CRF	166
7.3. Archivage et conservation	166
8. GESTION DES ÉVÉNEMENTS INDÉSIRABLES [ICH 6.8]	166
8.1. Définitions (AE, SAE, ADR, SUSAR, Imputabilité)	166
8.2. Déclaration des AE	167
8.3. Suivi des sujets après AE	167

8.4.	Data Safety Monitoring Board	167
9.	CONTRÔLE ET ASSURANCE QUALITÉ [ICH 6.11]	167
9.1.	Monitoring	167
9.2.	Audit et inspection	167
10.	STATISTIQUES [ICH 6.9]	167
10.1.	Détermination du nombre de sujets nécessaires	167
10.2.	Analyse des données	168
10.3.	Gestion des dropouts et des données manquantes	168
10.4.	Critères pour l'arrêt de l'étude	168
11.	CONSIDÉRATIONS ÉTHIQUES [ICH 6.12]	168
11.1.	Comité d'Ethique	168
11.2.	Information et consentement	168
11.3.	Anonymat et confidentialité	169
12.	POLITIQUE DE PUBLICATION [ICH 6.15]	169
12.1.	Publication	169
12.2.	Rapport final d'étude	169
13.	FINANCEMENT ET ASSURANCE [ICH 6.14]	169
13.1.	Ressources	169
13.2.	Assurance	169
15.	ANNEXES	169

Résumé synoptique du protocole

Titre de l'étude	Dépistage à large échelle de la consommation de drogues et de médicaments sur une population de conducteurs romands grâce à un prélèvement au bout du doigt
Investigateurs	<u>Investigateur principal</u> : Bernard Favrat <u>Co/Investigateurs</u> : Aurelien Thomas, Marc Augsburg, Julien Déglon <u>Doctorant-Investigateur</u> : Timothée Joye
Lieu de l'étude	Centre Universitaire Romand de Médecine Légale (CURML)
Calendrier de l'étude	L'inclusion commencera dès l'éventuelle approbation du projet par la commission d'éthique. L'analyse des résultats aura lieu en fin d'année janvier 2017 et le rapport final sera envoyé à l'office Fédéral de la Santé Publique au 1 ^{er} trimestre de 2018.
Rationnel et objectifs	Effectuer un dépistage à large échelle de la consommation de drogues et de médicaments pouvant affecter la capacité à conduire sur une population de conducteurs en Suisse romande grâce à un prélèvement au bout du doigt. L'objectif est également d'étudier la prévalence de la consommation de drogues légales et illégales dans la circulation routière au sein d'un échantillon large de la population
Méthodes	Analyse des spots de sang (DBS) par UHPLC-HRMS
Nombre de Patients	1000
Critères de sélection	<u>Critères d'inclusion</u> : Conducteurs interpellés au hasard par la police des cantons de Vaud, Genève, Fribourg et du Valais au cours de leurs procédures de contrôle classiques

Study Flowchart

	Intervention au bord de la route	Analyse au sein du CURML
Interception des véhicules par des officiers de police dans le cadre de leur activité normale	x	
Interview par un médecin, psychologue ou un toxicologue	x	
Demande de consentement oral	x	
Prélèvement de sang au bout du doigt après désinfection	x	
Attribution du code d'étude	x	
Analyse UHPLC-HRMS		x
Traitement statistique		x

Schéma de l'étude

Moment de l'étude	Prélèvement	Analyse
Tâche accomplies	Interview par un médecin, psychologue ou un toxicologue Demande de consentement oral Prélèvement DBS Anonymisation et	Screening toxicologique par UHPLC-HRMS Traitement statistique

Abréviations

GUS	General Unknown Screening
DUID	Driving Under the Influence of Drugs
UHPLC	Ultra High Precision Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
STA	Systematic Toxicological Analysis
DBS	Dried Blood Spot

Background [ICH 6.2]

Pré-requis

La consommation de drogues d'abus et de médicaments est un problème de santé publique. L'émergence de nouvelles substances psychoactives, telles que les classes des phénéthylamines ou des pipérazines, augmente le risque pour la population. La prévalence de l'utilisation des drogues est généralement difficile à évaluer de par la difficulté à obtenir un échantillon représentatif de la population. Le développement de nouvelles stratégies pour le micro prélèvement sanguin permettront de favoriser d'éventuelles études épidémiologiques futures à grande échelle sur les habitudes de consommation en Suisse.

Parmi les nombreux problèmes associés à la consommation de drogues, la conduite automobile constitue une complication majeure, due à la diminution de la capacité à conduire suite aux effets néfastes sur le système nerveux central⁷. Actuellement, selon la loi suisse sur la circulation routière, si un test de dépistage urinaire ou salivaire⁸⁻⁹ peut être effectué au bord de la route, la mise en évidence d'une diminution de la capacité à conduire est effectuée sur la base des résultats des analyses toxicologiques d'une prise de sang conventionnelle effectuée par un médecin. De ce fait, le sang d'un conducteur est généralement collecté uniquement en cas de suspicion du policier effectuant le contrôle, impliquant qu'un screening systématique n'est de ce fait jamais réalisé malgré son importance. Ce projet vise à évaluer un nouveau dispositif, permettant un prélèvement simple et rapide de sang capillaire (c'est-à-dire au bout du doigt), suffisant pour la détection et la quantification de drogues ou de médicaments. Grâce à ce nouveau dispositif, les habitudes de consommation pourront être investiguées de manière précise et systématique dans un sous-échantillon représentatif de la population que constituent les conducteurs automobiles.

En maintenant les avantages initiaux de la méthode des spots de sang séché (DBS), le concept HemaXisTM commercialisé par la société DBS System SA ouvre de nouvelles perspectives en permettant un prélèvement de sang peu invasif, simple, sûr, standardisé et moins coûteux.

Le produit d'étude et la maladie

Aucun médicament n'est utilisé ou prescrit au cours de cette étude. L'objectif est d'évaluer la méthode du DBS avec le concept HemaXisTM commercialisé par la société DBS System SA en tant que support de prélèvement pour la collecte dans sang capillaire dans le but d'effectuer un screening toxicologique. Le risque de cette étude est minime étant donné que le micro prélèvement de sang s'effectue à l'aide d'une lancette jetable stérile déjà homologuée pour cette application. De plus, le bout du doigt des volontaires sera systématiquement désinfecté avant le prélèvement

Rationnel de l'étude

Le développement de nouvelles stratégies analytiques est nécessaire afin de simplifier et de permettre l'étude de la prévalence de la consommation de drogues et de médicaments au sein d'un échantillon large de la population. En permettant un micro-prélèvement sanguin

standardisé, sécurisé, peu invasive et économique, le concept HemaXis™ offre la possibilité d'effectuer un tel dépistage de la population.

En parallèle, cette étude permettra en collaboration avec les polices cantonales de Genève, de Vaud, de Fribourg et du Valais, d'établir un profil de consommation de médicament et de drogues dans un sous-échantillon de la population, à savoir chez les conducteurs.

Il manque actuellement une étude fiable sur ce sujet, qui porte non seulement sur le cannabis¹⁰, mais également sur d'autres substances comme les benzodiazépines¹¹ ou d'autres classes de drogues et de médicaments¹². A ce jour, la prévalence de la consommation de différentes drogues dans la circulation routière, parmi une population sélectionnée au hasard, est mal connue bien que des études ont déjà été menées dans ce sens¹³⁻¹⁵. La possibilité de pouvoir réaliser cette étude sur des échantillons de sang est un atout de ce projet dans le but d'avoir une information objective sur l'impact de la consommation de drogues et de médicaments en relation avec la diminution de la capacité à conduire dans la population observée.

Objectifs [ICH 6.3]

Le but de cette étude est d'effectuer un dépistage à large échelle de la consommation de drogues et de médicaments pouvant influencer la faculté à conduire au sein d'une population de conducteurs en Suisse romande grâce à un nouveau dispositif de prélèvement au bout du doigt.

L'objectif est d'obtenir des renseignements sur le type de substances consommées par les conducteurs et sur les combinaisons prédominant actuellement, et finalement d'évaluer l'attitude générale du conducteur au sujet de la consommation de drogues illégales et de médicament en relation avec la conduite automobile. Dans ce but, un nouveau dispositif de prélèvement de sang au bout du doigt sera utilisé pour effectuer un dépistage de la consommation de drogue et de médicaments au sein d'une population de conducteurs.

Design [ICH 6.4]

Description globale

Les conducteurs seront interpellés au hasard par la police dans les cantons de Vaud, Genève, Fribourg et Valais dans le cadre des contrôles routiers effectués classiquement par la police. Les officiers de police seront instruits pour intercepter les véhicules qui pourront être arrêtés de manière sûre et sans danger. La police demandera au conducteur de fournir un échantillon d'air alvéolaire pour l'éthylotest selon la procédure classique. Une fois la procédure classique effectuée par la police, le policier proposera aux conducteurs de disposer ou s'il le souhaite de répondre à un questionnaire de sécurité routière. Dans le cas où l'accord du conducteur est obtenu, le conducteur sera redirigé vers un interviewer. La police ne sera en aucun cas présente lors de la suite des opérations qui seront effectués en un lieu distinct du contrôle de

police (voir Figure XX). Les personnes impliquées dans l'interview seront des médecins, psychologues, et toxicologues, formés par l'Unité de Médecine du Trafic et les conducteurs n'auront dès lors plus de contacts avec la police. L'interviewer demandera le consentement éclairé du participant qui, répondra alors à un questionnaire, une fois son consentement obtenu. Comme mentionné dans le document de consentement et stipuler précisément oralement lors de l'interview, le conducteur peut à tout moment décider de ne pas répondre à une question ou de mettre fin à l'entretien. À la fin de ce questionnaire, il lui sera également proposé qu'un échantillon sanguin prélevé au bout du doigt soit prélevé et collecté sur un support de papier filtre grâce au système HemaXis™ commercialisé par la société DBS System SA. La loi suisse sur la circulation routière du 1^{er} janvier 2005 permet à la police d'interpeller systématiquement les conducteurs afin d'évaluer leur capacité à conduire, notamment en effectuant un éthylotest.

Cette étude sera combinée avec les interventions habituelles de la police. Lorsque celle-ci arrête les automobilistes et qu'une consommation d'alcool est mise en évidence grâce à l'éthylotest, une mesure à l'éthylomètre est alors effectuée pour confirmer et déterminer la valeur finale. La police aura également recours à une prise de sang (sans prélèvement de DBS) dans le cas où elle suspecte une consommation de drogue ou de médicament. Dans ces cas de figure, les analyses toxicologiques seront mandatées par la police selon les procédures conventionnelles à des laboratoires accrédités. Seul les statistiques de consommation (de manière totalement anonymisées) associées aux contrôles de sécurité routière effectués en lien avec cette étude seront transmises à l'investigateur principal de l'étude ..

Dans le cas où la police ne procède à aucun prélèvement, celle-ci proposera au conducteur de disposer ou de participer à un questionnaire de sécurité routière. Il est également important de préciser que si l'éthylotest est inférieur à 0.25 ‰ et que la police ne prélève aucun échantillon par rapport à une suspicion éventuelle, l'identité de la personne contrôlée n'est pas non plus relevée. Si le conducteur accepte, il sera redirigé vers un lieu distinct du contrôle afin de participer à l'étude (voir Figure 1). Lors de la demande de son consentement éclairé, il sera également proposé au conducteur d'effectuer un micro prélèvement sanguin au bout du doigt dans un 2^{ème} temps. Le micro prélèvement sanguin sera testé dans un but de recherche uniquement et par conséquent les résultats pour l'individu à proprement dit ne pourront et ne seront pas fournis à la police. D'autre part, aucune analyse ne sera effectuée au bord de la route. Les personnes qui participeront à l'étude auront la garantie que les tests et les prélèvements seront complètement anonymisés, ce qui rendra impossible toute correspondance. Il est important de relever que nous collecterons un micro prélèvement de sang, matrice de référence en toxicologie permettant la détermination de la diminution de la capacité à conduire au moment du prélèvement selon la loi suisse sur la circulation routière.



Figure 2: Organisation de l'étude

Pratiquement, une goutte de sang est obtenue au bout du doigt du volontaire par piqûre à l'aide d'une lancette jetable à usage unique (BD Microtrainer Contact-Activated Lancet®). La procédure est similaire à celle effectuée pour la mesure de la glycémie chez des patients diabétiques. Le bout du doigt sera préalablement désinfecté à l'aide d'un tampon imbibé d'une solution désinfectante (ex. tampon Webcol®), puis massé doucement afin de générer une goutte de sang. La première goutte est essuyée au moyen d'une bande de gaz stérile, afin de générer une nouvelle goutte. La goutte de sang est portée à l'orifice d'entrée du capillaire de la plaque microfluidique HemaXis™. Par capillarité, le sang remplit le volume prédéfini du canal (ici 10 µL). Au minimum 2 canaux de 10 µL devront être remplis lors du prélèvement. Un maximum de 40 µL de sang capillaire sera prélevé par sujet (4x10 µL). Une fois les canaux remplis, le couvercle de l'étui HemaXis™ est rabattu de sorte que le sang présent dans les canaux soit transféré sur la carte de papier filtre. Le dispositif, une fois fermé, est laissé 30 minutes au minimum à température ambiante pour que le sang puisse sécher sur la carte de papier filtre et ainsi former un DBS. Une fois le sang séché, les agents pathogènes sont inhibés réduisant le risque d'infection au minimum. Le dispositif HemaXis™ est ensuite placé dans un sachet Mini grip® et stocké à température ambiante avant son expédition au laboratoire pour l'analyse toxicologique. Les spots de sang séchés sont protégés par l'étui HemaXis™ limitant ainsi tout contact avec l'échantillon sanguin. Une fois au laboratoire, la carte de papier filtre contenant les échantillons DBS est retirée et peut être analysée.

HemaXis DB 10µL



Une lancette classique est utilisée pour générer une goutte de sang au bout du doigt. Celle-ci est placée à l’endroit d’un micro-canal où le sang est immédiatement absorbé. En fermant le système de prélèvement, le volume de sang désiré est transféré et séché sur un papier filtre standard. Ceci permet de faciliter le stockage et le transport des échantillons par rapport à une procédure de prélèvement classique (cf. Annexes pour l’explication détaillée du système d’échantillonnage).

Les analyses seront effectuées par UHPLC-HRMS (chromatographie ultra haute performance en phase liquide / spectrométrie de masse haute résolution). Cette méthodologie de screening toxicologique basée sur un micro prélèvement DBS est utilisée en routine au sein du laboratoire de l’UTCF qui est accrédité (STS0448 à Lausanne, STS0390 à Genève) pour cette classe d’analyses.

Moment de l’étude	Prélèvement	Analyse
Tâche accomplies	Interview par un médecin, psychologue ou un toxicologue Demande de consentement oral Prélèvement DBS Anonymisation et randomisation	Screening toxicologique par UHPLC-HRMS Traitement statistique descriptifs, tableau de contingence

Critères de jugement

Il manque actuellement une étude fiable sur ce sujet, qui porte non seulement sur le cannabis¹⁶⁻¹⁷, mais sur d’autres psychotropes (tels que la cocaïne, l’amphétamine et ses dérivés, les opiacés/opioïdes, et les nouveaux psychotropes de synthèse) et également les médicaments agissant sur le système nerveux central comme les benzodiazépines ou les antidépresseurs. A ce jour, la prévalence de la consommation de différentes drogues dans la circulation routière, parmi une population sélectionnée au hasard, est mal connue. La possibilité de pouvoir réalisée cette étude sur des échantillons de sang est un atout de ce projet dans le but d’avoir une information objective sur l’impact de la consommation de drogues et de médicaments en relation avec la diminution de la capacité à conduire dans la population observée.

Randomisation et insu

Il s'agit d'une étude pilote effectuée en collaboration avec les corps de police des cantons de Fribourg, Genève, Vaud, et Valais. Cette étude devrait se terminer au premier trimestre 2018. Une vingtaine de campagnes de prélèvement seront réalisées lors de contrôles de la circulation dans le but de collecter des micro prélèvements de sang chez 1000 conducteurs de manière randomisée. Les contrôles auront lieu en ville, sur les routes cantonales ou sur les autoroutes. L'échantillonnage se fera sur l'ensemble des 7 jours d'une semaine et les journées seront séparées en tranche de 8 heures (0h-8h, 8h-16h, et 16h-24h). Des statistiques descriptives et des tableaux de contingence prenant en compte les jours et les tranches horaires seront utilisés pour traiter les données.

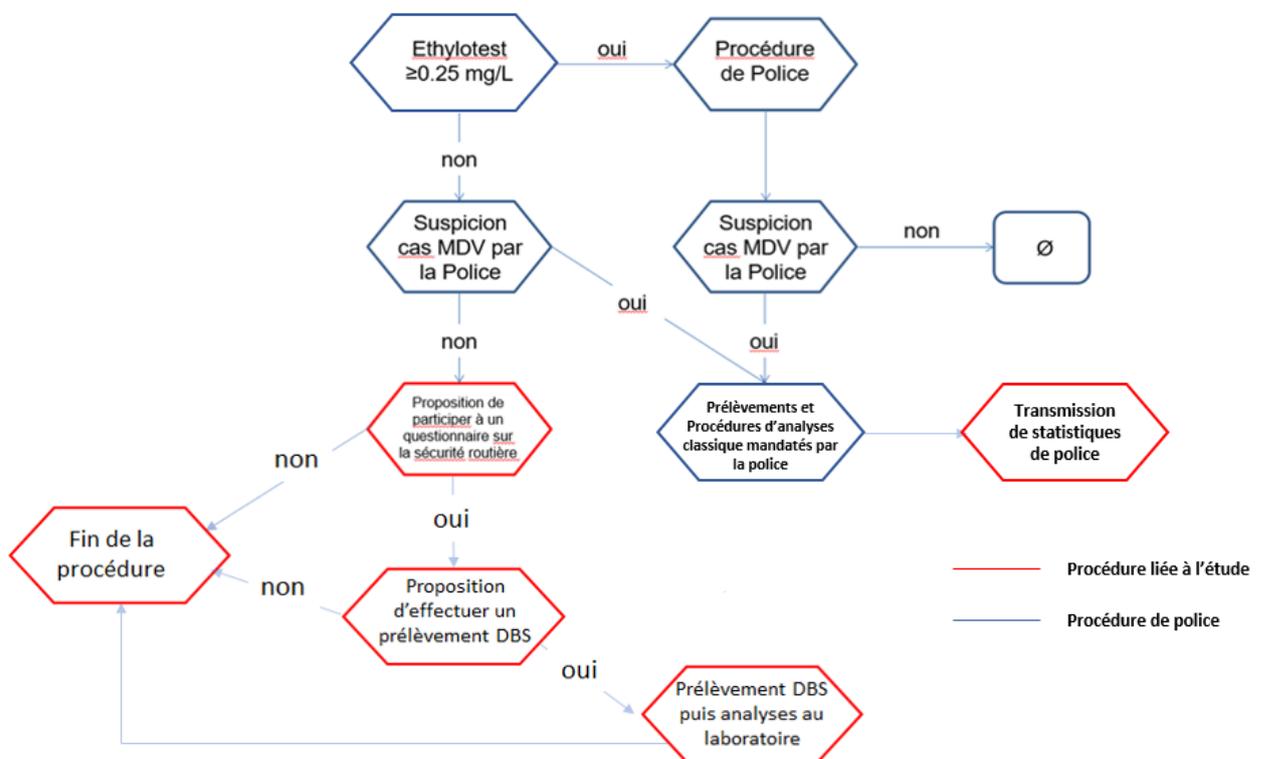


Figure 3: Détail de l'intégration du processus de l'étude au sein de l'intervention classique de la police

Cette étude débutera dès l'acceptation du protocole par la Commission d'Ethique et se terminera après l'inclusion des 1000 sujets.

Durée de l'étude pour les sujets, procédures de sortie d'étude et de levée d'insu

Pour les sujets, l'étude se déroulera uniquement sur le temps du prélèvement au bord de la route lors des contrôles effectués par la police. Une fois le consentement et les échantillons obtenus, le sujet ne sera pas suivi de manière longitudinale. Il est important de relever que depuis le 1^{er} janvier 2005, selon la loi sur la circulation routière, la police peut stopper tout

véhicule sans avoir de motif particulier et procéder à un contrôle de la consommation d'alcool du conducteur à l'aide d'un éthylotest. Dans une étude précédente, nous avons pu montrer que le prélèvement d'échantillons salivaires en parallèle de l'intervention de la police est tout à fait praticable et a déjà eu lieu. Le micro prélèvement sanguin sera collecté selon la méthode décrite précédemment. Il est important de relever qu'il sera impossible de retrouver le nom de la personne, seul un numéro, permettant de le lier au questionnaire et à la localisation du prélèvement, sera attribué à l'échantillon. Il n'y aura pas de « masterlist » de correspondance entre un numéro et un nom pour éviter toutes possibilités de retrouver les gens à partir des données.

Liste des données répertoriées dans le CRF

Seules les différentes étapes de la procédure à effectuer, le résultat de l'éthylotest ainsi que la liste des substances identifiées dans l'échantillon DBS prélevé seront répertoriés dans le CRF.

Population de l'étude [ICH 6.5]

Critères d'inclusion

Les participants seront des conducteurs interpellés au hasard par la police dans les cantons de Vaud, Genève, Fribourg et du Valais.

Critères de non-inclusion

Toute personne refusant le consentement oral et refusant de donner un échantillon de sang ne sera pas incluse dans l'étude. En outre des problèmes techniques lors du prélèvement ou de l'analyse pourrait induire une sortie de l'étude. Toute personne n'ayant pas rempli au moins deux canaux de sang soit un volume total d'au moins 20 µL ne pourra pas être intégrée à l'étude.

Sortie d'étude

Une fois le prélèvement effectué, aucune sortie de l'étude n'est prévue puisque les données seront immédiatement anonymisées et qu'il s'agit d'un prélèvement unique et ponctuel. Aucune correspondance ne sera possible puisque les noms ne sont pas conservés, dès lors une sortie de l'étude n'est pas envisageable.

Procédures de sélection et de recrutement

Les conducteurs seront interpellés au hasard par la police dans les cantons de Vaud, Genève, Fribourg et Valais, dans le cadre de leur procédure classique. Les officiers de police seront instruits pour intercepter les premiers véhicules qui pourront être arrêtés de manière sûre et sans danger lorsqu'un interviewer indiquera qu'il sera disponible. Les personnes impliquées dans l'interview seront des médecins, psychologues, et toxicologues, formés par l'Unité de Médecine du Trafic. La police demandera au conducteur de fournir un échantillon d'air alvéolaire pour l'éthylotest. Dans le cas où le consentement est obtenu les intervenants demanderont également qu'un échantillon sanguin soit prélevé au bout du doigt et collecté sur un support de papier filtre grâce au système HemaXisTM commercialisé par la société DBS System SA. La loi suisse sur la circulation routière du 1^{er} janvier 2005 permet à la police

d'interpeller systématiquement les conducteurs afin d'évaluer leur capacité à conduire, notamment en effectuant un éthylotest.

Traitements de l'étude (y compris le placebo) [ICH 6.6]

Aucun traitement ni placebo ne sera administré pendant cette étude.

Critères d'évaluation [ICH 6.7]

Des analyses qualitatives seront effectuées sur les échantillons de sang par UHPLC-MS grâce à un Q Exactive Plus de chez Thermo scientifique, permettant un dépistage large et non-biaisé incluant les nouvelles substances psychoactives. La consommation d'alcool sera elle évaluée grâce à un éthylotest effectué par la police au moment du contrôle.

Critère de jugement primaire

L'analyse de blanc et de sang négatif permettra de se prononcer sur une éventuelle contamination du système analytique conduisant à la détection de faux positifs dans les échantillons.

L'évaluation de la consommation d'alcool se fera de manière classique grâce à l'éthylotest.

Gestion des données [ICH 6.10 & 6.13]

Données sources

Les résultats des tests de criblage toxicologiques seront répertoriés dans un tableau et les résultats seront traités avec les moyens statistiques descriptifs usuels.

CRF

Cf. document spécifique

Archivage et conservation

Les données et les échantillons seront détruits après 10 ans. Aucun nom ne sera mis dans la base de données. De plus, il sera impossible, rétrospectivement, de retrouver les personnes correspondantes pour garder un anonymat total.

Gestion des événements indésirables [ICH 6.8]

Définitions (AE, SAE, ADR, SUSAR, Imputabilité)

Le risque lié à cette étude est minime, le bout du doigt sur lequel est effectué le prélèvement sera préalablement désinfecté et le prélèvement sera effectué par des médecins, toxicologues ou psychologues formés et compétents. Quant à un risque lié à une éventuelle pression psychologique due à l'étude sur les conducteurs, celui-ci est minime également puisque la

procédure de l'étude est complètement dissociée du contrôle de police et que les résultats de l'étude ne peuvent pas avoir d'impact sur le conducteur lui-même. Il est même à noter que cette étude aura plutôt l'avantage de permettre aux participants de pouvoir diminuer le stress généré par le contrôle de la police avant de reprendre la route. Lors de la participation à l'étude, le protocole d'information sera remis à tous les candidats. Celui-ci contiendra le même numéro générique. Dans le cas, bien que peu probable, d'un événement indésirable postérieur au moment de l'étude, le participant pourra prouver sa participation à l'étude et bénéficier d'un suivi sans mettre en péril son anonymat.

Déclaration des AE

Cf. documents concernant les événements indésirables, et événements indésirables graves

Suivi des sujets après AE

Cf. documents concernant les événements indésirables, et événements indésirables graves

Data Safety Monitoring Board

Un groupe indépendant s'occupant de la sécurité liée à l'étude paraît inutile, considérant le risque infime d'accidents provoqués directement par la soumission au protocole d'étude.

Contrôle et assurance qualité [ICH 6.11]

Monitoring

Un sang négatif aux substances testées, ainsi qu'un échantillon dont le contenu est connu seront utilisés pour vérifier la stabilité de la réponse analytique ainsi que l'absence de contamination.

Audit et inspection

Les données et le matériel investigué restent à disposition des autorités si celles-ci jugent bon de les examiner. Le suivi et l'anonymisation des données se fera via la base de données ToxiML déjà en place concernant les analyses de routines au sein de l'UTCF. Chaque échantillon étant déjà anonymisé sur le lieu du prélèvement, il recevra alors un numéro ETUXXXX via ToxiML permettant sa traçabilité au niveau du laboratoire et de l'étude. Le support utilisé permettra d'assurer un « audit trail » et satisfait les exigences de l'art. 5 de l'ordonnance sur la recherche sur l'être humain.

Statistiques [ICH 6.9]

Détermination du nombre de sujets nécessaires

Il s'agit d'une étude pilote effectuée en collaboration avec les corps de police des cantons de Fribourg, Genève, Vaud, et Valais. Cette étude aura une durée d'environ 2 ans. Une vingtaine de campagnes de prélèvement seront réalisées lors de contrôles de la circulation dans le but de collecter des micro-prélèvements de sang chez 1000 conducteurs de manière randomisée. Les contrôles routiers seront réalisés sur différents types de route, que ce soit sur autoroute ou en ville, à différents jours et heures de la journée selon les procédures de la police.

Analyse des données

En associant l'analyse de 1000 échantillons sanguins réalisée au cours de cette étude aux statistiques de police pour les résultats des prises de sang effectuées en cas de suspicion de consommation de drogue ou médicaments selon les procédures standards, nous obtiendrons un échantillon représentatif des conducteurs romands. Les données seront traitées à l'aide de statistiques descriptives classiques et de tableaux de contingence en fonction notamment des différents lieux et tranches horaires des prélèvements. Les pourcentages d'absence et de présence des substances pouvant influencer la faculté à conduire seront prises en compte en séparant les cas de consommation unique et de combinaison de substances. Parmi ces substances, il sera également analysé dans quelles occurrences sont détectés les substances majoritairement consommées. Les réponses aux questionnaires notamment concernant les substances consommées seront également comparés aux résultats des analyses et aux statistiques de police, afin d'évaluer la corrélation entre les deux. Les questionnaires permettront également d'obtenir des informations statistiques concernant la corrélation entre la consommation de drogues ou de médicaments et le sexe du conducteur ou le type de véhicules en circulation. Les analyses statistiques seront effectuées au moyen de différents logiciels tels que Prism (v7.03) et SPSS (v23.0).

Gestion des dropouts et des données manquantes

Les sujets renonçant à l'étude seront remplacés par de nouveaux volontaires jusqu'au prélèvement d'environ 1000 échantillons comme prévu par l'étude.

Critères pour l'arrêt de l'étude

L'étude pourrait être temporairement interrompue, si des problèmes techniques majeurs venaient à se présenter. Un tel cas s'avère cependant peu probable.

Considérations éthiques [ICH 6.12]

Comité d'Ethique

Le protocole est soumis à la CER-VD. Pour toutes les campagnes de prélèvement effectuées sur le canton de Genève, une demande sera également soumise dans un deuxième temps à la commission d'éthique du canton de Genève pour.

Information et consentement

Un consentement oral est demandé puisqu'il s'agit d'une étude purement observationnelle (selon le paragraphe 12 de formulaire « recommandations pour la rédaction d'un protocole de recherche ») et que le nom et le prénom ne sont pas demandés. Un financement selon l'exemple d'une étude européenne (6) de 10 frs est prévu pour dédommager les personnes qui acceptent le micro prélèvement sanguin uniquement. La rémunération est assurée même si pour une raison quelconque il ne s'avérait pas possible d'obtenir au moins 2x 10 µL, nécessaire aux analyses de screening toxicologique. Cette rémunération sera effectuée de main à main. Les analyses des micro-prélèvements seront effectuées plusieurs jours après le prélèvement, raison pour laquelle il n'y aura pas de risque d'une intervention de la police

suite à des résultats positifs puisqu'il n'y aura aucun nom sur ces analyses et que celles-ci ne seront effectuées sur les lieux du prélèvement.

Anonymat et confidentialité

Aucune analyse ne sera effectuée au bord de la route. Les personnes qui participeront à l'étude auront ainsi la garantie que les tests et les prélèvements seront complètement anonymisés. Il n'y aura même pas de noms, ce qui rendra impossibles toutes correspondances. L'anonymat des participants est donc respecté à 100%.

Politique de publication [ICH 6.15]

Publication

Les résultats seront publiés dans un journal scientifique à comité de lecture reconnu du domaine.

Rapport final d'étude

L'étude est l'objet d'un projet de thèse financé par l'OFSP et réalisé par M. Timothée Joye, assistant-doctorant au CHUV en science de la vie.

Financement et assurance [ICH 6.14]

Ressources

Ce projet a été accepté par l'Office Fédéral de la Santé Publique avec un budget de 150'000 francs.

Assurance

Même si la garantie d'assurance n'est pas exigée pour ce type d'étude, le CHUV en sa qualité de promoteur répondra des dommages éventuels causés aux participants dans le cadre de l'étude conformément aux dispositions légales applicables.

ANNEXES

HemaXis DB Collection Process



HemaXis DB is **easy and practical** to use for collecting micro blood samples. The sampling procedure can be done by the patients themselves with minimal training.



STEP 1: Simple Prick Finger

A conventional lancet is used to generate a blood drop at the fingertip



STEP 2: Collect Blood Samples

A drop is placed at the entrance of the micro-channel, instantly absorbing the blood



STEP 3: Transfer Samples to Filter Card by Closing Device

As channels are filled, blood is transferred and dried on an industry standard filter paper card



STEP 4: Generate Dried Blood Spot – Ready to Ship!

The samples are secured and protected before sending HemaXis to the lab



STEP 5: Receive Samples at the Lab – Ready to Analyze!

Four standardized micro blood samples can be stored at room temperature until ready for analysis

Annexe 2 : Questionnaire concernant la sécurité routière utilisant auprès des participants à l'étude au bord de la route

Questionnaire d'entrevue 2017

Sexe du conducteur : M F Type de véhicule : Voiture Camion Fourgonnette Moto

**Configuration des passagers
ceinture**

Port de la

- | | | |
|--------------------|---------------------------|----------------|
| 1. Conducteur seul | 4. Famille (avec enfants) | Conducteur O N |
| 2. 1 pass. | Passager O N | |
| 3. Groupe | | |
-

1. Depuis combien de temps êtes-vous parti ? _____ minutes

2. Quelle âge avez-vous ? _____ 2.a. Avez-vous un permis probatoire (L) ou d'apprenti-conducteur (N) ? O N

3. Selon vous, quelle est la probabilité qu'une personne qui conduit après avoir trop bu se fasse arrêter par la police ? [Où 1 = tout à fait improbable et 10 extrêmement probable] _____

4. Selon vous, quelle est la probabilité qu'une personne qui conduit après avoir pris de la drogue se fasse arrêter par la police ? [Où 1 = tout à fait improbable et 10 extrêmement probable] _____

5. Avez-vous bu au cours des 12 dernières heures ?

1 = Non 2 = Oui → **Quand avez-vous fini votre dernier verre ? _____ h**
_____ min.

6. Où avez-vous bu le plus au cours des 12 dernières heures ?

- | | |
|--------------------|----------------------------------|
| 1. Bar | 4. Domicile d'un ami/d'un proche |
| 2. Restaurant | 5 Autre _____ |
| 3. Propre domicile | |

Alcoolémie _____

7. Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous bu une boisson alcoolisée ?

- Jamais Chaque mois ou moins 2 à 4 fois par mois 2 à 3 fois par semaine
 4 fois ou plus par semaine

8. Au cours des 12 derniers mois, combien de verres avez-vous habituellement pris les jours où vous avez bu ? _____

9. Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous bu 4 verres ou plus en une occasion ?

- Tous les jours 2 à 5 fois par semaine Une fois par semaine 2 à 3 fois par mois
 Une fois par mois Moins d'une fois par mois Jamais Ne sais pas

10. Veuillez indiquer (avec un x) la dernière fois où vous avez pris les médicaments ci-dessous :

	Jamais	Il y a plus de 12 mois	Au cours des 12 derniers mois	Au cours des 30 derniers jours	Ce soir
Médicaments contre la toux ou le rhume					
Sédatifs (Valium, etc.)					
Relaxans musculaires (Robaxasal, Robaxacet)					
Antidépresseurs (Prozac, Celexa, etc.)					
Analgésiques (morphine, codéine, tylenol 2 ou 3, oxycodone, perocet, demerol)					
Amphétamines (Ritalin, Aderall, etc.)					

11. Veuillez indiquer (avec un x) la dernière fois où vous avez pris les drogues ci-dessous :

	Jamais	Il y a plus de 12 mois	Au cours des 12 derniers mois	Au cours des 30 derniers jours	Ce soir
Amphétamine					
Ecstasy					
GHB					
Phencyclidine (PCP)					
Marijuana ou haschisch					
Méthamphétamine					
Opiacés (héroïne, méthadone)					
Cocaïne (crack ou coke)					
Kétamine					
Autre _____					

Annexe 3: Article: High throughput qualitative and quantitative drug checking by MALDI HRMS

Présentation de la problématique

Les approches MALDI ont longtemps été réservées à l'analyse de macromolécules et particulièrement à des aspects dans le domaine de la protéomique. Plus récemment, plusieurs applications de l'utilisation du MALDI pour l'analyse de drogues et de médicaments ont été rapportées. Cette technique a notamment été utilisée pour l'analyse de drogues dans les cheveux, lié à des aspects de suivi d'abstinence¹⁻². Des approches cherchant à cartographier des médicaments dans des organes pour des études de pharmacologie et toxicodynamiques ont également été présentées³⁻⁴. Une étude Autrichienne a également relevé l'utilisation réussie du MALDI-HRMS pour des analyses qualitatives de NPS sur des échantillons collectés dans une problématique de *drug checking* se focalisant sur la problématique des NPS⁵. C'est d'ailleurs cette étude qui est à la base de l'approche présentée ici. En effet, la mise en place de ces développements a été rendue possible par l'ouverture des analyses de *drug checking* au laboratoire de Genève en collaboration avec l'association de réduction des risques, « Nuit Blanche ? ».

Les services de *drug checking* rencontrent un succès grandissant ces 20 dernières années et notamment en Suisse puisque Zurich propose des possibilités de *drug checking* offre cette possibilité en milieu festif depuis 2001⁶. Ces services permettent aux consommateurs de drogues de faire analyser le contenu de leur consommation et de rechercher d'éventuels adjuvants ou des substances non annoncées par le vendeur, présentant un risque toxicologique et de santé publique pour le consommateur. L'objectif de ces approches est de renforcer la prévention sans encourager la consommation⁷. Ces programmes de réduction de risque permettent notamment d'atteindre une population avec laquelle il est habituellement difficile

d'établir un contact afin de fournir des conseils et des informations pour améliorer la prévention⁶. Ces analyses sont également une aubaine pour les toxicologues puisqu'elles permettent d'obtenir des informations concernant la prévalence des drogues consommées dans une région définie, généralement restreinte, et notamment la présence de NPS arrivant sur le marché. Cette approche permet donc de surveiller localement l'arrivée de certaines substances présentant un risque particulier pour les consommateurs et de jouer un rôle d'alerte.

L'émergence de ces nouvelles substances psychoactives est associée à l'augmentation du risque lié à la consommation de drogues. Ces substances sont d'ailleurs responsables d'une augmentation des admissions aux urgences et des overdoses⁸. Cette classe de molécule se définit comme « les drogues qui ne sont pas contrôlées au titre des conventions des Nations unies relatives au contrôle des drogues mais qui sont susceptibles de constituer des menaces analogues pour la santé »⁹. Cette classe de substances évolue rapidement, puisqu'entre 2012 et 2017, plus de 400 NPS ont été identifiés pour la première fois¹⁰. Le risque associé à ces substances vient notamment du fait que l'information concernant leur toxicité est limitée que ce soit pour les consommateurs ou les professionnels de la santé¹¹. D'un point de vue analytique également, l'émergence de ces substances présente un certain challenge pour la toxicologie forensique et clinique. En effet, il est nécessaire de s'adapter à ce développement constant de nouvelles substances par le développement d'outils analytiques permettant une identification rapide et fiable de ces composés, parfois totalement inconnus des bases de données toxicologiques.

Le développement technologique des instruments HRMS permet dans une certaine mesure de s'affranchir des étapes séparatives que sont la GC ou la LC et de ce fait de gagner un temps précieux sur le temps d'analyse et de préparation d'échantillons. Les sources d'ionisations MALDI sont tout à fait indiquées dans cette optique. Si ces stratégies présentent encore certaines limitations notamment en termes de sélectivité, elles semblent tout à fait appropriées

pour des applications où l'échantillon est relativement concentré, telles que la résolution de cas d'intoxication ou des aspects de *drug checking*. Lors de cette étude, l'utilisation du MALDI-HRMS a permis de réduire d'un facteur 6 le temps nécessaire à la réalisation des analyses de qualitatives et quantitatives, tout en présentant des performances analytiques similaires aux approches de routine. La préparation d'échantillon s'en trouve également largement simplifiée. La comparaison des analyses de routine et de l'approche MALDI développée ici, sur une partie des échantillons effectuées dans le cadre de la collaboration avec « Nuit Blanche ? » a montré des résultats très prometteurs. Cette étude qui a été publiée dans « *Frontiers in Chemistry* » est présentée ici.

Article : High throughput qualitative and quantitative drug checking by MALDI HRMS



High-Throughput Qualitative and Quantitative Drug Checking by MALDI HRMS

Timothée Joye^{1,2}, Christèle Widmer¹, Roxane Morger Mégevand³, Serge Longère³, Marc Augsburg¹ and Aurélien Thomas^{1,2*}

¹ Forensic Toxicology and Chemistry Unit, CURML, Lausanne University Hospital, Geneva University Hospitals, Geneva, Switzerland, ² Faculty Unit of Toxicology, CURML, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland, ³ Nuit Blanche?, Association Première Ligne, Geneva, Switzerland

OPEN ACCESS

Edited by:

Eugenia Gallardo,
Faculty of Health Sciences, University
of Beira Interior, Portugal

Reviewed by:

Francesco Paolo Busardò,
Sapienza University of Rome, Italy
Jose Restolho,
University of Beira Interior, Portugal

*Correspondence:

Aurélien Thomas
aurelien.thomas@chuv.ch

Specialty section:

This article was submitted to
Analytical Chemistry,
a section of the journal
Frontiers in Chemistry

Received: 15 April 2020

Accepted: 06 July 2020

Published: 25 August 2020

Citation:

Joye T, Widmer C,
Morger Mégevand R, Longère S,
Augsburger M and Thomas A (2020)
High-Throughput Qualitative and
Quantitative Drug Checking by MALDI
HRMS. *Front. Chem.* 8:695.
doi: 10.3389/fchem.2020.00695

Illicit drugs are a global health problem, since both their acute and chronic consumption have negative impacts on the drug user's health. Drug checking facilities are receiving growing interest as they allow drug users to chemically analyze their product prior to consumption to assess the presence of adulterants or other non-expected substances. Such harm reduction programs allow the reduction of the risks associated with drug consumption without encouraging it. In particular, the emergence of new psychoactive substances (NPS) emphasizes the risk for the population increasing the diversity and the lability of illicit drugs on the market. Analytical developments are required to catch up with this rapid evolution and reduce the potential harm caused by such consumption. In this study, we developed a matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) high-resolution mass spectrometry (HRMS) strategy for the high-throughput qualitative and quantitative analysis of drug checking samples. The use of online-based m/z cloud library for untargeted compound search improved the ability to identify unknown compounds. Sixty-seven drug checking samples were analyzed using this analytical strategy, allowing the detection of 10 designer drugs and several classical drugs of abuse (mainly cocaine and MDMA) as well as adulterants and contaminants. The results were then compared with routine analyses of the same samples using conventional approaches showing similar performance while removing the use of chromatographic separation thus resulting in a significant reduction of the time required for sample preparation and analysis. This study enlightens the potential of MALDI-HRMS as a high-throughput approach allowing to speed-up up to six times the identification and quantification of substances enabling to catch the fast changes on the drug of abuse market. This strategy could be an interesting alternative analytical approach, allowing better prevention and harm reduction for drug users.

Keywords: MALDI, drug checking, qualitative, quantitative, HRMS, high throughput

INTRODUCTION

The use of recreational drugs is widespread worldwide, and both the number of users and the diversity of substances are increasing. In Europe, for instance, almost 25% of adults reported at least one illicit drug consumption in their life (Liakoni et al., 2018). In Australia, the situation is more concerning, indeed, in 2016, more than 40% of the population over 14 years old reported a

drug use during their lifetimes and more than 15% during the month preceding the survey (Day et al., 2018). Illicit drugs are a global public health issue, since both their acute and chronic consumption have pernicious impacts on the consumer's health (Crowley et al., 2017; Joye et al., 2017; Vearrier, 2019). For instance, it is estimated that almost 10,000 overdose deaths occurred in Europe in 2017 (EMCDDA, 2019).

The risk associated with drug consumption has also increased with the emergence of new psychoactive substances (NPS) or designer drugs leading to a significantly growing number of emergency admissions and fatal overdoses (Miliano et al., 2016). NPS are a rapidly evolving class of substances with various physico-chemical properties and toxicological effects. This class of molecules can be defined as all the substances that are not controlled by the United Nations Single Convention on Narcotic Drugs or the United Nations Convention on Psychotropic substances but might pose public health issues and are often "classical" drugs of abuse derivatives (Khaled et al., 2016). Between 2012 and 2017, more than 400 NPS were monitored for the first time (Elliott et al., 2018). The risk with those substances is that only limited information is available regarding their toxicity for both the drug user and the healthcare professionals (Wood et al., 2016). Various analytical procedures have been published for NPS monitoring in classical and alternative matrices, especially regarding new synthetic opioids (Pichini et al., 2017; Zawilska, 2017; Marchei et al., 2018). For instance, screening procedures targeting a wide range of NPS and designer stimulants as well as studies focusing on designer benzodiazepines have been reported (Adamowicz and Tokarczyk, 2016, 2019; Zawilska and Wojcieszak, 2019). The development of those procedures alongside with the sharing of information through early warning systems is capital to reduce the risk of intoxications and fatalities associated with NPS consumption.

Various drug checking facilities have emerged in the past 20 years. Those facilities allow the drug users to chemically analyze their drugs to check for the presence of adulterants or other non-expected substances without encouraging drug consumption (Sande and Sabic, 2018). Such harm reduction programs provide several advantages such as gaining contact with hard-to-reach target group to provide information and counsel for an increased prevention (Hungerbuehler et al., 2011). The analysis of those substances also provides information regarding the prevalence of drug consumption including NPS arriving on the market and allows the monitoring of a potential altered substance presenting risks. Indeed, evidence also suggests the potential synergistic effect of certain toxic adulterants associated with the illicit drugs leading to overdoses, severe health consequences, and even deaths (Solimini et al., 2017; Singh et al., 2020).

On an analytical point of view, the continuous emergence of new drugs presents an ongoing challenge for clinical and forensic toxicology. Neither the serious toxicity or impairment caused by such substances, nor the analytical methods for their detection and identification is well-established (Peters and Martinez-Ramirez, 2010). To adapt to this constant apparition of new substances and the importance of controlling the substances consumed by drug users, it

is necessary to develop analytical tools enabling fast and reliable screening.

Among those analytical approaches, matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) allows a quick and simple sample preparation. A wide range of use of MALDI technology has been reported for drug monitoring. For instance, MALDI ionization has been used for drug analysis in hair (Vogliardi et al., 2010; Porta et al., 2011; Flinders et al., 2017) and drug mapping in organs or whole-body tissue sections for pharmacodynamic or toxicodynamic studies (Lietz et al., 2013; Sun and Walch, 2013; Patel et al., 2015). Interestingly, an Austrian research group reported the successful use of MALDI combined with high-resolution (HR) MS for the qualitative analysis on drug checking samples focusing on designer drugs (Ostermann et al., 2014). Indeed, the introduction of HRMS analyzers and especially Orbitrap technology increases mass accuracy, allowing the facilitation of identification by reducing the number of possible chemical formulas (Jagerdeo and Schaff, 2016; Joye et al., 2020). Moreover, by improving the mass resolution power, HRMS increases the selectivity, therefore reducing the potential interferences (Chindarkar et al., 2014). Therefore, MALDI-HRMS technology seems to be an interesting alternative to classical GC and LC-MS/MS analyses providing a fast high-throughput complementary approach with a high identification power.

The present study was performed in collaboration with the association "Nuit Blanche" whose goal is to limit the risks associated with drug consumption in the nightlife context of the Swiss Canton of Geneva. This association collects drug checking samples on a weekly basis that are routinely analyzed by GC-MS regarding the screening approach and by LC-MS for the quantitative analyses focusing on 12 substances. Herein, we present a MALDI-HRMS procedure allowing the high-throughput identification of a wide range of drugs of abuse present in drug checking samples based on the online *m/z* cloud library for untargeted compound search.

The method was applied to 67 real drug checking cases revealing several NPS among the analyzed samples, as well as adulterants. Globally, the method resulted in similar performances than the conventional routine analyses with a significant reduction of the analysis time. In the meantime, the samples were quantified for the most detected drugs of abuse using a single and simple sample preparation. To demonstrate the potential of MALDI quantification in the context of drug checking samples, we further performed a validation according to the FDA (Food and Drug Administration) guidelines. The results of this high-throughput qualitative and quantitative approach were then compared with the classical methodology used in routine showing similar results.

METHODS

Standard and Reagents

Drug checking samples were provided by the harm reduction association "Nuit Blanche." LSD, methamphetamine, MDEA, MDMA, amphetamine, mephedrone, and cocaine, as well as their deuterated analogs, were purchased as standards at 1

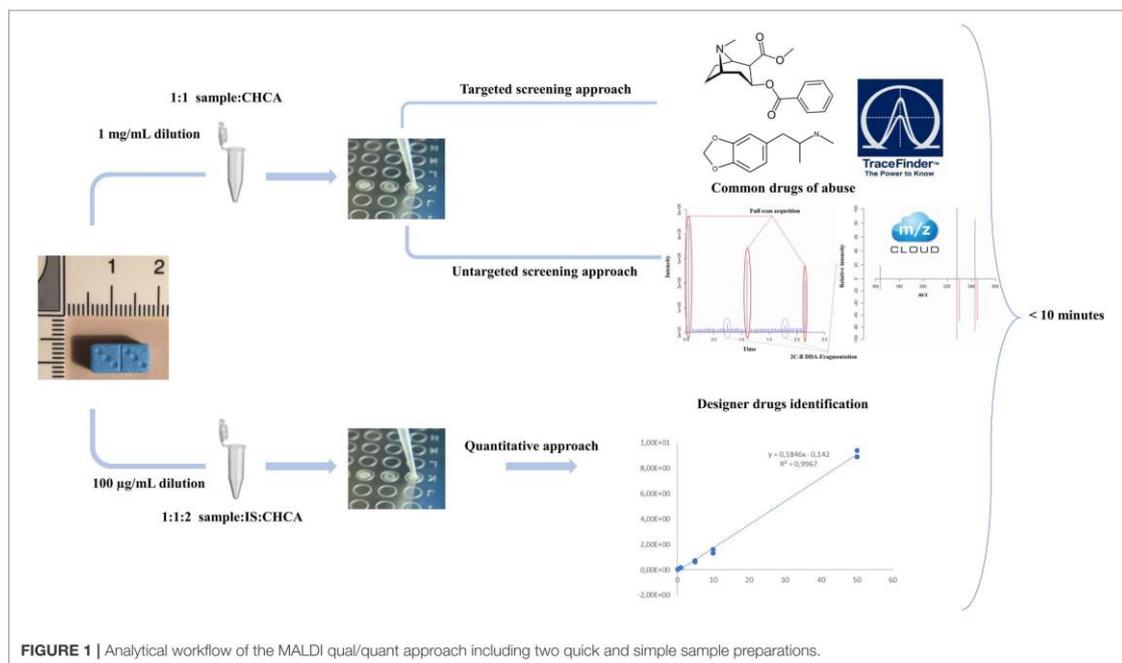


FIGURE 1 | Analytical workflow of the MALDI qual/quant approach including two quick and simple sample preparations.

mg/ml either from Cerilliant or Lipomed. Acetonitrile (ULC-MS 99.99%), methanol (ULC-MS 99.99%), water (ULC-MS), formic acid 99% (ULC-MS), trifluoroacetic acid, as well as the ammonium formate salt were purchased from Biolsolve. Alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) was purchased from Sigma-Aldrich.

Sample Preparation

Regarding MALDI experiments, all samples were prepared at 1 mg/ml and 100 µg/ml for qualitative and quantitative analyses, respectively. For qualitative analysis, 10 µl of the sample solution was mixed with 10 µl of matrix solution (CHCA 1 mg/ml, 1:1 ACN: H₂O + 0.1% TFA). Concerning quantitative analyses, 5 µl of sample solution was first mixed with 5 µl of internal standard (IS) solution. Ten microliters of matrix solution was then added to the mix. The IS solution was prepared containing deuterated LSD, methamphetamine, MDEA, MDMA, amphetamine, mephedrone, and cocaine at 10 µg/ml. Calibration samples were prepared by spiking MeOH at five concentration levels (six considering a blank) ranging from 0.1 to 500 µg/ml with the same undeuterated substances than in the IS solution; 1.5 µl of sample/matrix solution was then spotted on a MALDI stainless steel samples plate for analysis.

An experiment was conducted in order to evaluate the minimal number of acquire spectra to minimize the variability and, therefore, perform accurate quantification. Five samples were prepared using MDMA at 10 µg/ml with a 1:1 drug-to-IS ratio. Five replicates were used to determine intra-spot variability

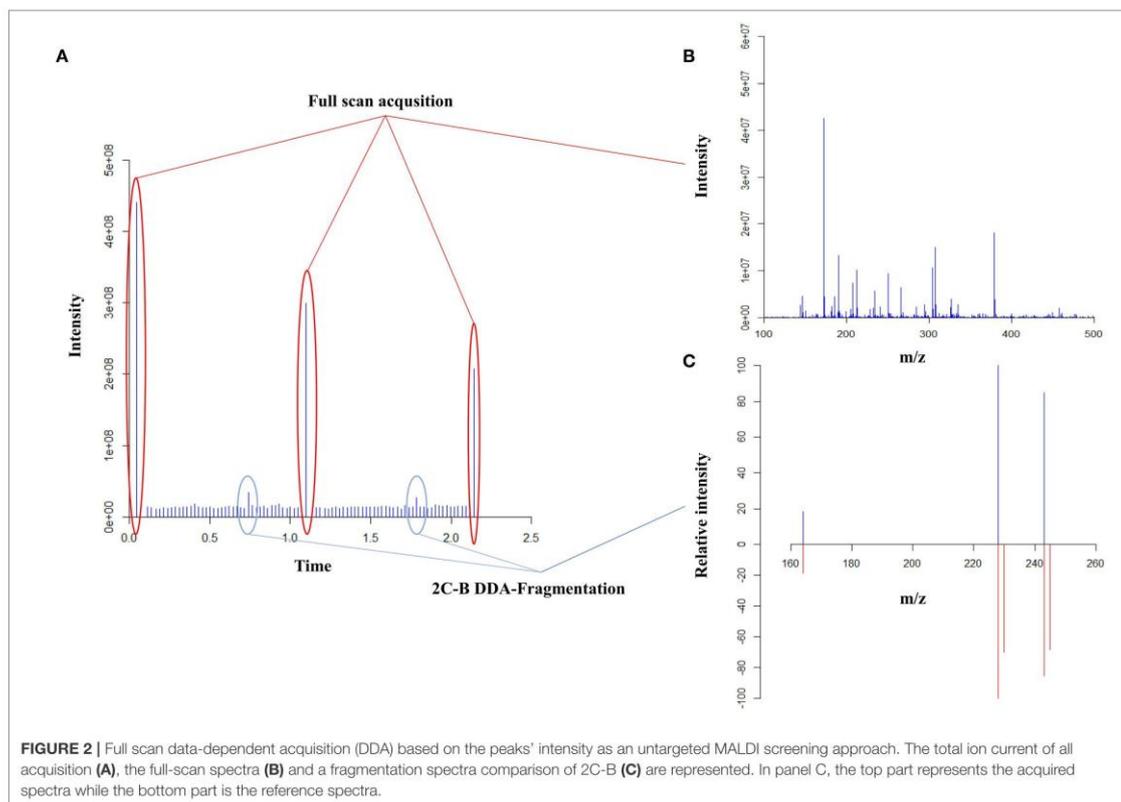
and the relative standard deviation of the signal at 1, 10, 20, 50, 100, and 150 laser shots, respectively.

Routine analyses were performed using two different sample preparations including simple dilutions at 100 µg/ml and 200 ng/ml and a derivation step. Regarding GC-MS screening analyses, a first injection was performed with the diluted samples at 100 µg/ml. For the second injection, 100 µl of the 100 µg/ml sample solution was mixed with 100 µl of anhydric acetic acid and 100 µl of pyridine for derivation. After vortexing, the samples were incubated at 60°C for 30 min. Samples were then evaporated and reconstituted in 100 µl of MeOH. For the quantitative analyses, the dilution at 200 ng/ml was performed in a 50/50 mix of formate buffer 5 mM at pH 3 and MeOH containing IS at a final concentration of 10 ng/ml. Calibration samples were prepared by spiking MeOH at five concentration levels ranging from 1 to 500 ng/ml.

MALDI Analyses

All samples were analyzed in a three-step process (Figure 1). A first targeted approach targeting the most common drugs of abuse and adulterant was processed, followed by a non-targeted data-dependent acquisition for the detection and identification of other drugs, adulterants, or dangerous contaminants. Then, a full-scan experiment was operated for quantitative analysis.

All MALDI-HRMS experiments were performed using a MALDI-LTQ-Orbitrap XL equipped with a 337-nm N₂ laser operating at 60 Hz (Thermo Scientific, Bremen, Germany) with a laser beam size of 60 × 50 µm. All analyses were performed



with a spectral resolution of 60,000 for full-scan experiments and 17,500 regarding fragmentation. Both the automatic spectral filtering (ASF) and the automatic gain control (AGC) were switched off. MALDI plate motion was set to survey CPS. MALDI laser energy was set to 5 μJ and the number of laser shot was set to five in positive polarity. The scan masses were ranging from 100 to 1,000 m/z .

Regarding qualitative analyses, first, a full-scan data-dependant MS/MS approach was performed using an inclusion list of 41 substances containing the most frequent drugs of abuse and adulterants (Table S1). Fragmentation experiments were performed using higher-energy collisional dissociation (HCD) with normalized collision energy set between 30 and 100 eV depending on the compounds of interest. The second full-scan data-dependent approach was then performed for the detection of other drugs, adulterants or contaminants using a non-targeted approach (Figure 2). Based on the full-scan spectra, the 10 most intense ions were then fragmented using HCD with a normalized energy of 50 eV. A minimum signal threshold was set to 10,000 to avoid fragmenting noise. All fragmented compounds were then sent to an exclusion list already containing the targeted substances for 3 min to avoid fragmenting always the same substances. Quantitative analyses were performed averaging

120 acquired full-scan spectra. The validation criteria used to evaluate the analytical process was based on the directives of the FDA regarding bioanalytical methods and adapted to our specific requirements. The validation was performed over three non-consecutive days ($p = 3$). The trueness and precision were evaluated using a variance analysis-based statistical treatment (ANOVA). Calibration (Cal) was performed in duplicate at five different concentration levels ($k = 5$) (Table 1) while quality controls (QCs) were prepared in quadruplicate at the two lowest and highest concentration levels ($k = 4$). Using the acquired data, trueness, precision, accuracy, and linearity were determined.

Routine Analyses

GC screening analyses were performed using an existing published procedure on a similar instrument (Lefrancois et al., 2016). For the LC-MS/MS quantitative analyses, a Dionex UltiMate 3000 LC-system (Thermo Fischer Scientific, Germany) was used. Gradient elution was performed on a Chromolith Performance RP-C18 (100 \times 3 mm) column using a 5 mM formate ammonium buffer at pH 3 (mobile phase A) and acetonitrile (mobile phase B). The gradient and flow rate were programmed as follows: 0–0.2 min hold at 2% B; 0.2–8 min

TABLE 1 | Results for trueness, precision, and linearity (k is the number of concentration levels, n the number of repetitions by levels, and p is the number of non-consecutive days).

Trueness (%) ($k = 4; n = 4; p = 3$)				
Calibration level (ng/ml)	100	1,000	10,000	50,000
MDMA	102.7	103.3	109.0	100.7
Cocaine	97.3	103.9	114.4	99.6
Repeatability/Intermediate precision (RSD%) ($k = 4, n = 4, p = 3$)				
Calibration level (ng/ml)	100	1,000	10,000	50,000
MDMA	11.6/11.1	13.0/12.3	9.3/10.5	7.0/7.6
Cocaine	12.2/13.7	10.2/11.6	5.9/7.6	4.3/3.9
Linearity ($k = 4, n = 4, p = 3$)				
	Range (ng/ml)	Slope	R^2	Exact mass (m/z)
MDMA	100–50,000	1.0037	0.9913	194.1176
Cocaine	100–50,000	0.9909	0.9966	304.1543

linear increase to 70% B; 8–10 min linear increase to 95% of B; 10–11 min hold at 95% B; 11–14 min hold at 2% B at a constant flow rate of 0.6 ml/min. The injection volume was set to 1 μ l. The LC system was coupled with a QTRAP 5500 MS instrument (SCIEX, Netherlands). The mass spectrometer was operated with positive electrospray ionization in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The ion spray voltage was set to 5,500 V and the source temperature was 500°C. The gas settings were as follows: Curtain gas: 20 psi, ion source gas 1: 60 psi, ion source gas 2: 40 psi.

Data Analysis

Information regarding the suspected sample's composition was almost always provided by the drug user. Then, MALDI data were analyzed using Tracefinder (Thermo Scientific) and a database created for this specific drug checking application. Identification was based on the mass over charge ratio, the isotopic pattern, and the library search based on MS/MS spectra comparison. Regarding the samples containing a substance that was not indexed in the library, Xcalibur was used combined with different external library search such as Metlin or m/z cloud. The data were analyzed using MSD Enhanced ChemStation (Agilent Technologies) and compound characterization was performed using mass spectra computerized databases, such as NIST Version 2014 (National Institute of Standards and Technology), Wiley Edition 10, MPW Version 2011 (Maurer, Pflieger, Weber, Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants, and Metabolites), DD Version 2014 (Drug Design and Discovery) and custom databases from the University Institutes of Legal Medicine of the Faculty of Medicine of Geneva (CURML). Quantitative results were treated using Analyst software version 1.6.2.

RESULTS AND DISCUSSION

MALDI Qualitative Analyses

Consumption of drugs of abuse is a global public health issue. In particular, the emergence of NPS including the classes of phenethylamine and tryptamine emphasizes the risk for the

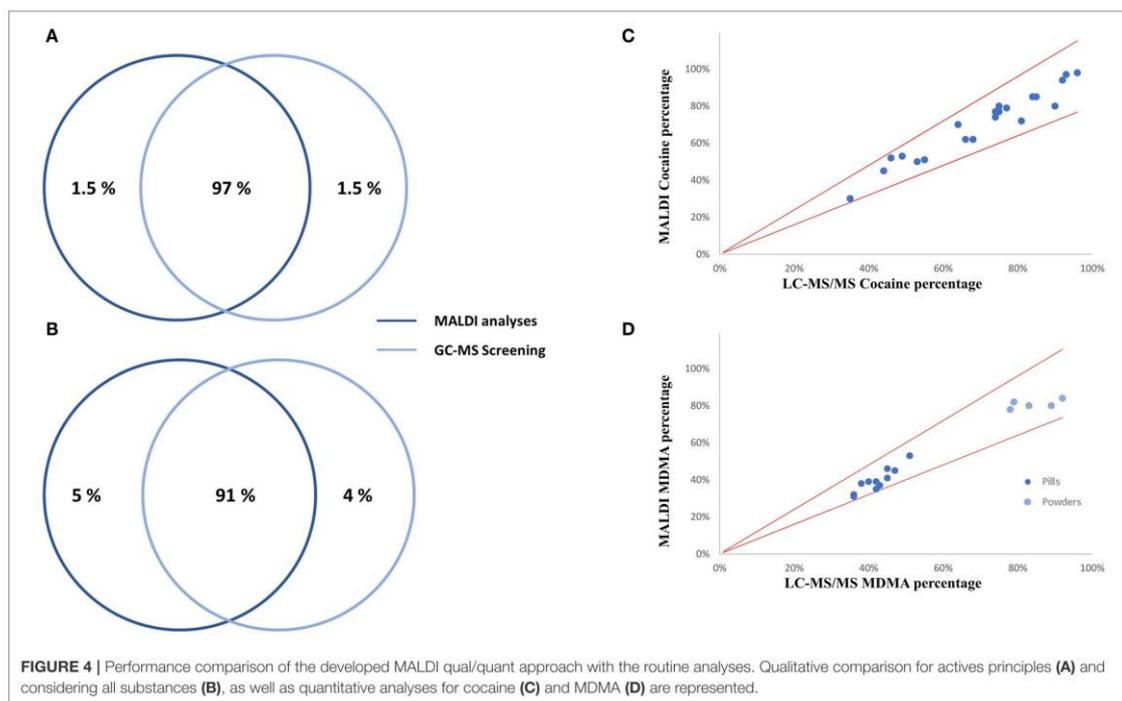
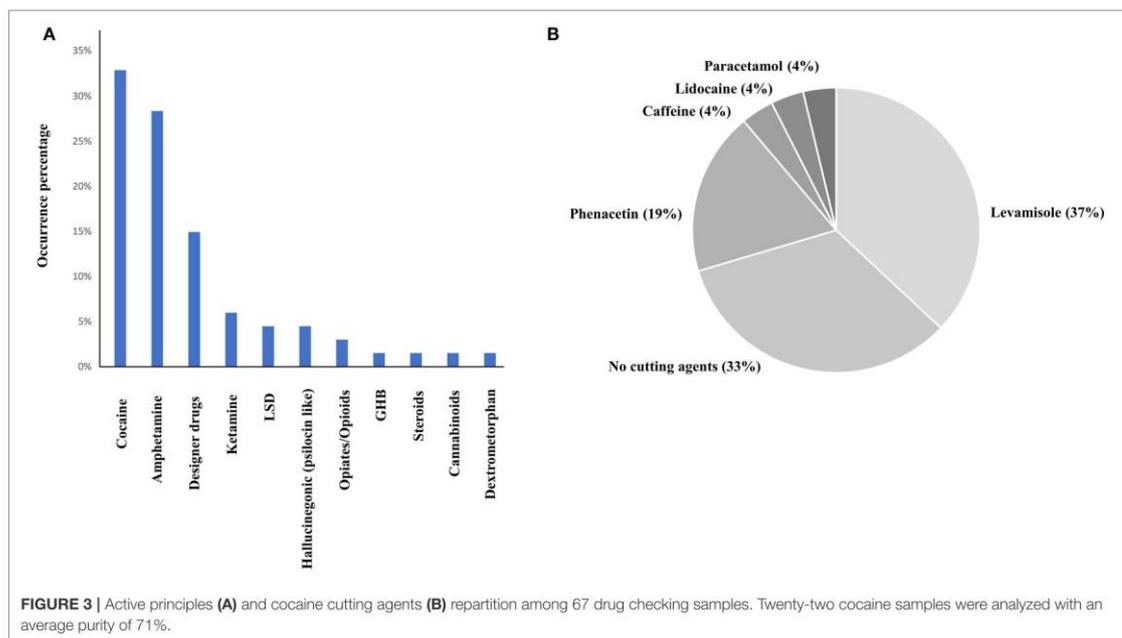
population. Therefore, the development of new fast screening procedures allowing the identification of known and unknown drugs of abuse is a priority to keep up with the ongoing developments on the illicit drug market. The association of highly concentrated analytes with the increased selectivity brought by HRMS technology allows the facilitation of high-throughput MALDI detection and identification of various unknown substances.

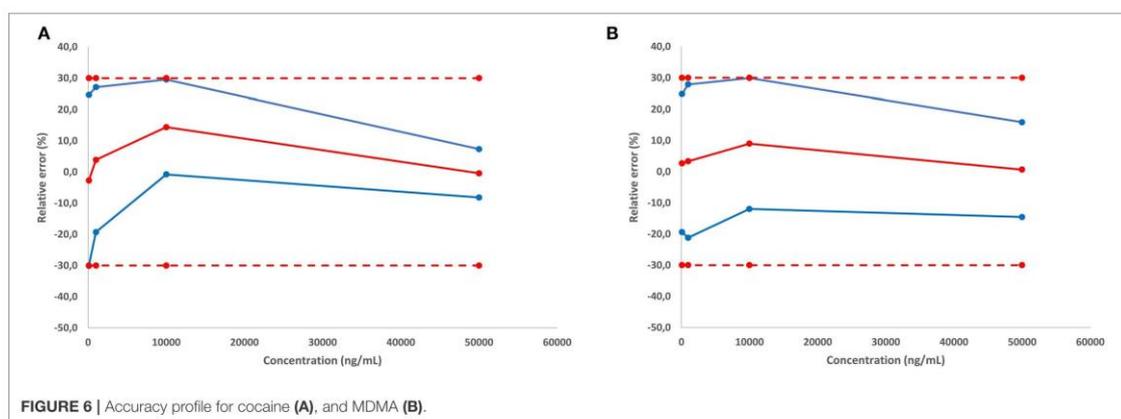
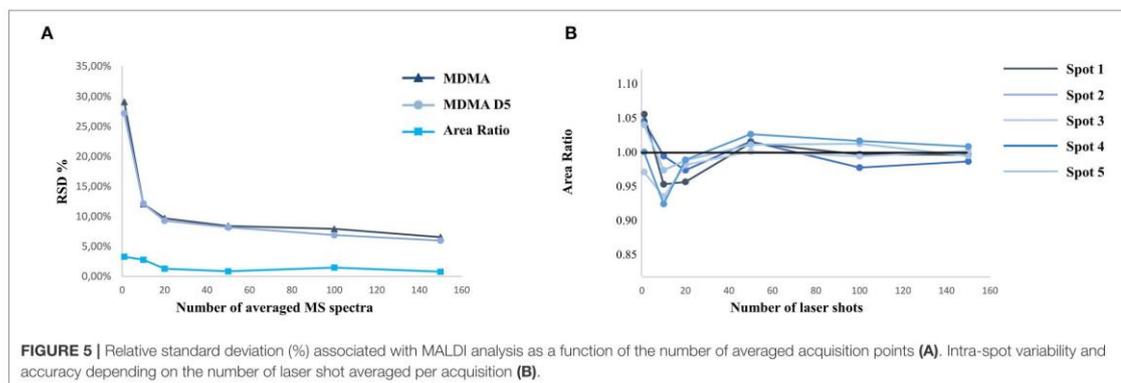
With the developed MALDI-HRMS method, several designer drugs were successfully identified including 2,5-dimethoxy-4-methylamphetamine (DOM), 2,5-dimethoxy-4-bromoamphetamine (DOB), 2,5-dimethoxy-4-chloroamphetamine (DOC), 2,5-dimethoxy-4-bromophenethylamine (2C-B) and its position isomer 2-Br-4,5-DMPEA, 2,5-dimethoxy-4-ethylphenethylamine (2C-E), methoxetamine, 4-hydroxy-N-methyl-N-ethyltryptamine (4-HO-MET), 6-(2-aminopropyl)benzofuran (6-APB), and clephedrone. Moreover, the MALDI analysis allowed the identification of various adulterants, contaminations, impurities, and synthesis precursors such as safrole, which is used for the synthesis of MDMA.

In total, 67 drug checking samples were analyzed with the developed procedure leading to 101 identifications including 36 different substances (Table S2). Despite the identification of several designer drugs, most samples contained classical drugs of abuse, with 22 samples positive to cocaine and 16 samples positive to MDMA. All the active principles detected using both approaches are represented in Figure 3A. On average, the cocaine purity detected in the 22 samples was high (71%), among them, 10 were containing levamisole, while 9 of them were not containing any cutting agents (Figure 3B). Only classical cocaine cutting agents were identified, yet the identification of such substances is of importance since evidence suggests the concomitant role of certain adulterants and illicit drugs on toxicity (Solimini et al., 2017). The GC-MS screening approach, which is the gold standard for qualitative analyses, showed similar performances to the developed MALDI procedure. Indeed, only one active principle (GHB) was not detected using MALDI-HRMS. Among the cutting agents, metabolites, precursors and alkaloids, one cocaine metabolite (tropacocaine in two samples), and one adulterant (phenacetine) were not detected by the developed approach. On the other hand, one active principle (clephedrone), one cocaine adulterant (levamisole in two samples), one cocaine alkaloid (cinnamoylcocaine), and one MDMA precursor (safrole) were not detected by the GC-MS approach (Figure 3). With a coverage of 98.5% regarding the active principles and 91% considering all the substances (see Figures 4A,B), the main difference between those two approaches was that the use of MALDI analyses allowed the reduction of the time spent for the sample preparation with the removal of the derivation process and the analysis by a six times factor reaching a total analysis times of around 10 min per sample.

MALDI Quantitative Analyses

MALDI analyses are often associated with a relatively important variability regarding signal intensity. Therefore, MALDI





quantification requires specific development to ensure good results in terms of accuracy, precision, and repeatability (Porta et al., 2015). One solution to limit this specific signal variability issue is to normalize the intensity obtained by averaging enough acquired pixels. One of the challenges is to find the right compromise between the time of acquisition associated with the number of averaged spectra and a good accuracy and precision. During this study, tests were performed to optimize the acquisition time with a limited variability. As demonstrated in the literature, our results enlightened the need for isotopically labeled IS and acquisition of a sufficient number of spectra to decrease relative standard deviation below 10% (Figure 5) (Ostermann et al., 2014; Porta et al., 2015). As demonstrated in Figure 5, the acquisition of more than 100 averaged spectra was thus necessary to obtain good repeatability and accuracy.

The validation of the quantitative approach was performed for cocaine and MDMA by analyzing independent QC samples in quadruplicates at four different calibration levels over three non-consecutive days for the determination of trueness, precision, and linearity. Accuracy represents the total error and can

be divided into two parameters including trueness (bias or systematic error) and precision (the standard deviation or random errors). Trueness is calculated using the percentage difference between the experimental and the expected values. In the present study, trueness was ranging from -2.7 to 14.4% (Table 1). Precision was divided into repeatability and the inter-day variability (intermediate precision). Repeatability represents the variability under similar conditions performed by the same operator while intermediate precision is the variability associated with the use of the same samples on different days with different reagents. Repeatability and intermediate precision were measured between 3.9 and 13.7% (Table 1). Accuracy profiles are visual representations of the uncertainty measurement combining the trueness and precision (Figure 6). Precision is represented by the calculated confidence limit at 95% for each concentration limit. Accuracy profiles also include the representation of acceptance limits of $\pm 30\%$ suggested for method validation. Linearity is defined as the method capacity to provide a result proportional to the real sample concentration. Its determination requires linear regression model based on the least square method applied on the fit of the obtained concentrations

as a function of the expected concentrations. Slope values were calculated at 1.0037 and 0.9909 with coefficients of determination of 0.9913 and 0.9966 for MDMA and cocaine, respectively.

Overall, MALDI quantitative results showed a good correlation with the routine LC-MS/MS MRM experiments. Indeed, all MALDI results were in agreement with the routine analysis with a $\pm 20\%$ tolerance window. The correlation between the two analytical strategies is represented in **Figure 4** for cocaine and MDMA, being the two most detected substances. Interestingly, among all MDMA-positive cases, two groups can be distinguished. Indeed, all the samples in the form of pills had an MDMA percentage between 31 and 52%, while this percentage was measured between 78 and 84% regarding powders (**Figure 4D**). MALDI quantitation analyses were performed in around 3 min per sample while one LC injection lasted for 14 min. With the HRMS quantification being based on full-scan spectra, the addition of new substances of interest can easily be performed without the need of any preliminary developments such as infusion processes.

CONCLUSION

In this study, we enlighten the potential of MALDI-HRMS as a high-throughput analytical strategy in forensic and clinical toxicology. This technology can bring interesting applications despite the absence of chromatographic separation, which may be detrimental for the analysis of low-concentration analytes in complex matrices. Nevertheless, considering drug checking analysis where the analytes can be concentrated at will, MALDI-HRMS allows one to significantly speed up the detection, identification, and quantification of various drugs of abuse. With the development of bioinformatic tools and online shared libraries such as m/z cloud, the method can easily be adapted for any new substance appearing on the market being in agreement with the challenges brought by the continuous emergence of NPS.

REFERENCES

- Adamowicz, P., and Tokarczyk, B. (2016). Simple and rapid screening procedure for 143 new psychoactive substances by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Test. Anal.* 8, 652–667. doi: 10.1002/dta.1815
- Adamowicz, P., and Tokarczyk, B. (2019). Screening analysis for designer stimulants by LC-MS/MS. *Methods Mol. Biol.* 1872, 165–180. doi: 10.1007/978-1-4939-8823-5_16
- Chindarkar, N. S., Wakefield, M. R., Stone, J. A., and Fitzgerald, R. L. (2014). Liquid chromatography high-resolution TOF analysis: investigation of MSE for broad-spectrum drug screening. *Clin. Chem.* 60, 1115–1125. doi: 10.1373/clinchem.2014.222976
- Crowley, R., Kirschner, N., Dunn, A. S., Bornstein, S. S., and Health and Public Policy Committee of the American College of Physicians. (2017). Health, and public policy to facilitate effective prevention and treatment of substance use disorders involving illicit and prescription drugs: an american college of physicians position paper. *Ann. Intern. Med.* 166, 733–736. doi: 10.7326/M16-2953
- Day, N., Criss, J., Griffiths, B., Gujral, S. K., John-Leader, F., Johnston, J., et al. (2018). Music festival attendees' illicit drug use, knowledge and practices regarding drug content and purity: a cross-sectional survey. *Harm Reduct. J.* 15:1. doi: 10.1186/s12954-017-0205-7

The developed approach showed similar qualitative and quantitative results for drug checking compared to those obtained from both LC-MS and GC-MS while reducing by six times the analytical procedure. The development of such rapid drug checking strategies would enable faster monitoring of changes in the drug market, providing an improved tool for prevention and harm reduction for drug users.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TJ developed the analytical method did the samples analyses and wrote the manuscript. CW and MA participated in the strategic choices toward the study and its design and critically revised the manuscript. RM and SL provided the samples and critically revised the manuscript. AT was the main contributor to the study design, supervised the project, and critically revised the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

The authors acknowledge financial support from the Swiss Federal Office of Public Health (contract no. 14.013792.204.0001/1300).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2020.00695/full#supplementary-material>

- Elliott, S., Sedefov, R., and Evans-Brown, M. (2018). Assessing the toxicological significance of new psychoactive substances in fatalities. *Drug Test. Anal.* 10, 120–126. doi: 10.1002/dta.2225
- EMCDDA (2019). *Drug-Related Deaths and Mortality in Europe: Update From the EMCDDA Expert Network*. Lisbon: EMCDDA.
- Flinders, B., Cuypers, E., Porta, T., Varesio, E., Hopfgartner, G., and Heeren, R. M. A. (2017). Mass spectrometry imaging of drugs of abuse in hair. *Methods Mol. Biol.* 1618, 137–147. doi: 10.1007/978-1-4939-7051-3_12
- Hungerbuehler, I., Buecheli, A., and Schaub, M. (2011). Drug checking: a prevention measure for a heterogeneous group with high consumption frequency and polydrug use—evaluation of zurich's drug checking services. *Harm Reduct. J.* 8:16. doi: 10.1186/1477-7517-8-16
- Jagerdeo, E., and Schaff, J. E. (2016). Rapid screening for drugs of abuse in biological fluids by ultra high performance liquid chromatography/Orbitrap mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1027, 11–18. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.05.010
- Joye, T., Bararpour, N., Augsburger, M., Boutrel, B., and Thomas, A. (2017). *In situ* metabolomic changes in rat hippocampus after acute cocaine administration. *Int. J. Mass Spectrom.* 437, 87–91. doi: 10.1016/j.ijms.2017.12.001
- Joye, T., Widmer, C., Favrat, B., Augsburger, M., and Thomas, A. (2020). Parallel reaction monitoring-based quantification of cannabinoids in whole blood. *J. Anal. Toxicol.* 44, 541–548. doi: 10.1093/jat/bkz113

- Khaled, S. M., Hughes, E., Bressington, D., Zolezzi, M., Radwan, A., Badnapurkar, A., et al. (2016). The prevalence of novel psychoactive substances (NPS) use in non-clinical populations: a systematic review protocol. *Syst. Rev.* 5:195. doi: 10.1186/s13643-016-0375-5
- Lefrancois, E., Esseiva, P., Gervasoni, J. P., Lucia, S., Zobel, F., and Augsburger, M. (2016). Analysis of residual content of used syringes collected from low threshold facilities in Lausanne, Switzerland. *Forensic Sci. Int.* 266: 534–540. doi: 10.1016/j.forsciint.2016.07.021
- Liakoni, E., Yates, C., Dines, A. M., Dargan, P. I., Heyerdahl, F., Hovda, K. E., et al. (2018). Acute recreational drug toxicity: comparison of self-reports and results of immunoassay and additional analytical methods in a multicenter European case series. *Medicine* 97:e9784. doi: 10.1097/MD.00000000000009784
- Lietz, C. B., Gemperline, E., and Li, L. (2013). Qualitative and quantitative mass spectrometry imaging of drugs and metabolites. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 1074–1085. doi: 10.1016/j.addr.2013.04.009
- Marchei, E., Pacifici, R., Mannocchi, G., Marinelli, E., Busardo, F. P., and Pichini, S. (2018). New synthetic opioids in biological and non-biological matrices: a review of current analytical methods. *Trends Anal. Chem.* 102, 1–15. doi: 10.1016/j.trac.2018.01.007
- Miliano, C., Serpelloni, G., Rimondo, C., Mereu, M., Marti, M., and De Luca, M. A. (2016). Neuropharmacology of new psychoactive substances (NPS): focus on the rewarding and reinforcing properties of cannabimimetics and amphetamine-like stimulants. *Front. Neurosci.* 10:153. doi: 10.3389/fnins.2016.00153
- Ostermann, K. M., Luf, A., Lutsch, N. M., Dieplinger, R., Mechtler, T. P., Metz, T. F., et al. (2014). MALDI orbitrap mass spectrometry for fast and simplified analysis of novel street and designer drugs. *Clin. Chim. Acta* 433, 254–258. doi: 10.1016/j.cca.2014.03.013
- Patel, E., Cole, L. M., Bradshaw, R., Batubara, A., Mitchell, C. A., Francese, S., et al. (2015). MALDI-MS imaging for the study of tissue pharmacodynamics and toxicodynamics. *Bioanalysis* 7, 91–101. doi: 10.4155/bio.14.280
- Peters, F. T., and Martinez-Ramirez, J. A. (2010). Analytical toxicology of emerging drugs of abuse. *Ther. Drug Monit.* 32, 532–539. doi: 10.1097/FTD.0b013e3181f33411
- Pichini, S., Pacifici, R., Marinelli, E., and Busardo, F. P. (2017). European drug users at risk from illicit fentanyl mix. *Front. Pharmacol.* 8:785. doi: 10.3389/fphar.2017.00785
- Porta, T., Grivet, C., Kraemer, T., Varesio, E., and Hopfgartner, G. (2011). Single hair cocaine consumption monitoring by mass spectrometric imaging. *Anal. Chem.* 83, 4266–4272. doi: 10.1021/ac200610c
- Porta, T., Lesur, A., Varesio, E., and Hopfgartner, G. (2015). Quantification in MALDI-MS imaging: what can we learn from MALDI-selected reaction monitoring and what can we expect for imaging? *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 2177–2187. doi: 10.1007/s00216-014-8315-5
- Sande, M., and Sabic, S. (2018). The importance of drug checking outside the context of nightlife in Slovenia. *Harm Reduct. J.* 15:2. doi: 10.1186/s12954-018-0208-z
- Singh, V. M., Browne, T., and Montgomery, J. (2020). The emerging role of toxic adulterants in street drugs in the US illicit opioid crisis. *Public Health Rep.* 135, 6–10. doi: 10.1177/0033354919887741
- Solimini, R., Rotolo, M. C., Pellegrini, M., Minutillo, A., Pacifici, R., Busardo, F. P., et al. (2017). Adulteration practices of psychoactive illicit drugs: an updated review. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 18, 524–530. doi: 10.2174/1389201018666170710184531
- Sun, N., and Walch, A. (2013). Qualitative and quantitative mass spectrometry imaging of drugs and metabolites in tissue at therapeutic levels. *Histochem. Cell Biol.* 140, 93–104. doi: 10.1007/s00418-013-1127-4
- Vearrier, L. (2019). The value of harm reduction for injection drug use: a clinical and public health ethics analysis. *Dis. Mon.* 65, 119–141. doi: 10.1016/j.disamonth.2018.12.002
- Vogliardi, S., Favretto, D., Frison, G., Maietti, S., Viel, G., Seraglia, R., et al. (2010). Validation of a fast screening method for the detection of cocaine in hair by MALDI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 2435–2440. doi: 10.1007/s00216-009-3387-3
- Wood, D. M., Ceronie, B., and Dargan, P. I. (2016). Healthcare professionals are less confident in managing acute toxicity related to the use of new psychoactive substances (NPS) compared with classical recreational drugs. *QJM* 109, 527–529. doi: 10.1093/qjmed/hcv208
- Zawilska, J. B. (2017). An expanding world of novel psychoactive substances: opioids. *Front. Psychiatry* 8:110. doi: 10.3389/fpsy.2017.00110
- Zawilska, J. B., and Wojcieszak, J. (2019). An expanding world of new psychoactive substances—designer benzodiazepines. *Neurotoxicology* 73, 8–16. doi: 10.1016/j.neuro.2019.02.015

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Joye, Widmer, Morger Mégevand, Longère, Augsburger and Thomas. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Références de l'annexe

1. Flinders, B.; Cuypers, E.; Porta, T.; Varesio, E.; Hopfgartner, G.; Heeren, R. M. A., Mass Spectrometry Imaging of Drugs of Abuse in Hair. *Methods Mol Biol* **2017**, *1618*, 137-147.
2. Vogliardi, S.; Favretto, D.; Frison, G.; Maietti, S.; Viel, G.; Seraglia, R.; Traldi, P.; Ferrara, S. D., Validation of a fast screening method for the detection of cocaine in hair by MALDI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *396*, 2435-2440.
3. Lietz, C. B.; Gemperline, E.; Li, L., Qualitative and quantitative mass spectrometry imaging of drugs and metabolites. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, *65*, 1074-1085.
4. Patel, E.; Cole, L. M.; Bradshaw, R.; Batubara, A.; Mitchell, C. A.; Francese, S.; Clench, M. R., MALDI-MS imaging for the study of tissue pharmacodynamics and toxicodynamics. *Bioanalysis* **2015**, *7*, 91-101.
5. Ostermann, K. M.; Luf, A.; Lutsch, N. M.; Dieplinger, R.; Mechtler, T. P.; Metz, T. F.; Schmid, R.; Kasper, D. C., MALDI Orbitrap mass spectrometry for fast and simplified analysis of novel street and designer drugs. *Clinica Chimica Acta* **2014**, *433*, 254-258.
6. Hungerbuehler, I.; Buecheli, A.; Schaub, M., Drug Checking: A prevention measure for a heterogeneous group with high consumption frequency and polydrug use - evaluation of zurich's drug checking services. *Harm Reduct J* **2011**, *8*, 16.
7. Sande, M.; Sabic, S., The importance of drug checking outside the context of nightlife in Slovenia. *Harm Reduct J* **2018**, *15* (1), 2.
8. Miliano, C.; Serpelloni, G.; Rimondo, C.; Mereu, M.; Marti, M.; De Luca, M. A., Neuropharmacology of New Psychoactive Substances (NPS): Focus on the Rewarding and Reinforcing Properties of Cannabimimetics and Amphetamine-Like Stimulants. *Front Neurosci* **2016**, *10*, 153.

9. Khaled, S. M.; Hughes, E.; Bressington, D.; Zolezzi, M.; Radwan, A.; Badnapurkar, A.; Gray, R., The prevalence of novel psychoactive substances (NPS) use in non-clinical populations: a systematic review protocol. *Syst Rev* **2016**, *5* (1), 195.
10. Elliott, S.; Sedefov, R.; Evans-Brown, M., Assessing the toxicological significance of new psychoactive substances in fatalities. *Drug Test Anal* **2018**, *10* (1), 120-126.
11. Wood, D. M.; Ceronie, B.; Dargan, P. I., Healthcare professionals are less confident in managing acute toxicity related to the use of new psychoactive substances (NPS) compared with classical recreational drugs. *QJM* **2016**, *109* (8), 527-9.

Annexe 4: Article : In situ metabolomic changes in rat

hippocampus after acute cocaine administration

Présentation de la problématique

L'article présenté ici décrit une approche d'imagerie par spectrométrie de masse. Cette étude présente une analyse MALDI-HRMS de cerveaux de rat, se focalisant plus particulièrement sur la région de l'hippocampe, pour identifier les changements du métabolisme associés à une consommation aiguë de cocaïne, elle-même associée ou non à une consommation d'alcool.

Cette étude fait appel à l'utilisation de l'imagerie par spectrométrie de masse pour des répondre à des questions de toxico-dynamique au sein d'un tissu biologique. L'addiction de façon générale, et plus particulièrement l'addiction à la cocaïne, est liée au système de récompense, dopaminergique notamment. Si les mécanismes moléculaires impliqués dans l'addiction sont encore mal connus, plusieurs études semblent indiquer que la mémoire et l'addiction sont des phénomènes intimement liés. Pour cette raison, les régions du cerveau liées à l'apprentissage et à la mémorisation sont particulièrement ciblées pour les études concernant les phénomènes d'addiction. C'est de cette façon, et en observant la distribution de la cocaïne au sein de cerveaux de rats, que l'hippocampe a été choisi comme région d'intérêt pour mesurer les changements du métabolisme liés à une consommation aiguë de cocaïne.

Les résultats de ce *proof of concept* ont permis de renforcer l'intérêt du MALDI-HRMS dans les approches d'imagerie par spectrométrie de masse pour des approches de toxico et pharmacodynamiques par exemple. Cette étude a également permis de mettre en évidence certains marqueurs pouvant potentiellement être impliqués dans les processus d'addiction. Le développement de cette stratégie analytique et des nouvelles applications pourrait permettre d'améliorer la compréhension de certains mécanismes moléculaires, notamment en ce qui concerne les phénomènes d'addiction.

Article : In situ metabolomic changes in rat hippocampus after acute cocaine administration



Full Length Article

In situ metabolomic changes in rat hippocampus after acute cocaine administration

Timothée Joye^a, Nasim Bararpour^a, Marc Augsburger^a, Benjamin Boutrel^b, Aurélien Thomas^{a,c,*}

^a Unit of Toxicology, CURML Lausanne-Geneva, Lausanne University Hospital, Lausanne, Switzerland

^b Center for Psychiatric Neuroscience, Lausanne University Hospital, Lausanne, Switzerland

^c Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland



ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 June 2017

Received in revised form 6 September 2017

Accepted 6 December 2017

Available online 14 December 2017

Keywords:

Toxicodynamics

Imaging mass spectrometry

Cocaine

Metabolomics

Hippocampus

ABSTRACT

Addiction is a complex brain disease, whose molecular and cellular underpinnings remain largely unknown. Repeated drug use induces long-term plasticity in various brain areas that is considered to potentially trigger further compulsive use. Converging evidence has revealed that memory and addiction share both neural circuitry and molecular mechanisms. While many studies investigated the mesocorticolimbic system, the hippocampus has become a region of interest. Matrix assisted laser desorption and ionization mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) presents a unique ability to map the toxicodynamic changes associated to drugs of abuse. In this study, the acute effect of cocaine in rat brain was investigated with or without co-administration of alcohol. Brain tissue sections for each condition were analyzed using a MALDI-MSI in negative polarity after 9-aminoacridine (9-AA) deposition on the tissue surface. Multivariate analysis including principal component analysis (PCA) and spatial shrunken centroids have been performed to differentiate the metabolic profiles in hippocampus according to the type of administration. This study offers promising results showing the potential of MSI for investigating the metabolomic changes in the brain associated with drug consumption. It may bring new insights into the study of toxicodynamic responses of cocaine consumption in reward-learning related regions.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Molecular mechanisms involved in the development of addiction disorder are complex and diverse. Chronic drug consumption results in maladaptive behavioural changes which cause inability to control compulsive drug taking and hold a high risk of relapse [1,2]. Those changes develop progressively with the repetition of drug intake and some effects can persist for a lifetime [3,4]. Indeed, drug memories that associate contextual cues with the effects of drugs are known to shape and maintain persistent drug seeking behaviors [5–8]. Those behavioural effects are associated with synaptic plasticity linked with long-term associative memory [4]. Addictions and especially cocaine addiction is a socio-medical issue throughout the world. Therefore, a better understanding of its mechanism could help to better address signs of dependence. Cocaine is a psychostimulant acting on the reward-related brain system [9,10]. Notably,

it interacts with aminergic neurotransmitters by inhibiting their reuptake via cocaine binding to their transporter sites [11,12]. Chronic cocaine consumption has different impact on cognition including impairments of verbal memory and various learning deficits [13,14]. In contrary, acute cocaine consumption enhances learning, memory and improves cognition [15,16]. Since the association between memory and addiction has been enlightened, brain regions involved in learning and memorising processes could be targeted for studying cocaine-induced toxicodynamic responses. For instance, Guan et al. investigated the impact of cocaine exposure on the proteomic profile focusing the medial prefrontal cortex [3]. Another study focused on the effect of cocaine on two specific transcription factor targeting the limbic system [17]. They showed that this system constituted of nucleus accumbens, hippocampus, amygdala and prefrontal cortex has clearly an impact on the memorisation and on the notion of pleasure [18]. Gao et al. have also been targeting the prefrontal cortex as well as the striatum [19], while Zhou et al. [5], and Kutlu et al. [4], focused on the hippocampus. Interestingly, all those regions play a role in addiction and memory processes with a high degree of plasticity [20].

* Corresponding author at: Unit of Toxicology, CURML, Vulliette 04, 1000 Lausanne 25, Switzerland.

E-mail address: aurelien.thomas@chuv.ch (A. Thomas).

<https://doi.org/10.1016/j.ijms.2017.12.001>

1387-3806/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Recently omics approaches, including transcriptomics, proteomics, and metabolomics have received a growing interest in the field of addiction. Interestingly, perturbation of metabolite levels reflects the ultimate response of biological system to genetic or environmental changes [21]. Among the recent development in the field, mass spectrometry imaging (MSI) provides a powerful metabolomic approach for investigating the spatial toxicodynamics of drugs of abuse in rodent brain models. Indeed, MSI allows the simultaneous label-free detection and possibly identification of hundreds of metabolites with limited sample preparation and without any homogenisation allowing to maintain the spatial information [22,23]. Among the different ionization sources, matrix assisted laser desorption and ionization (MALDI) is currently the most widely used for MSI [24]. In addition, the development of high-resolution mass spectrometers (HRMS) has made MALDI-MSI a promising technique for metabolomic studies in the field of pharmacodynamics and toxicodynamics [25].

To date, few MSI studies have been focused on the biological changes driven by addiction or drug consumption [26]. In a first report, Caprioli and al. demonstrated the possibility of linking protein changes to drug localization and pharmacodynamic response [27]. Indeed, their results showed the distribution of olanzapine and its metabolites in whole-body rat tissue sections by MALDI-MSI. They simultaneously analyzed the proteins changes induced by this drug consumption in regions of interest.

In this work, we used MALDI-MSI to compare the metabolomic changes in the hippocampus of rat brain after a single administration of cocaine and a single concomitant administration of cocaine and alcohol. This work demonstrates the potential of MALDI-MSI to decipher the spatial metabolome changes associated with the drug distribution in different brain regions, emerging a new horizon for future investigations.

2. Methods

2.1. Cocaine and alcohol rat administration

Male Wistar rats ($n = 6$) were bred in-house in the animal facility of the Center for Psychiatric Neuroscience, Department of Psychiatry, Lausanne University Hospital. They were approximately 12 weeks old and weighed 420–470 g. They were kept in reversed 12-h light/dark cycle (lights off at 8.30 a.m.) and housed in controlled temperature and humidity conditions. All experiments were

conducted in accordance with the Swiss National Institutional Guidelines on Animal Experimentation, and approved by the Swiss Cantonal Veterinary Office Committee for Animal Experimentation (#1999 to Dr. Benjamin Boutrel).

Two rats received intraperitoneal (ip) injections of cocaine (obtained from Häseler AG, Herisau, Switzerland) at the dose of 20 mg/kg (concentration $c = 20$ mg/ml). Two rats received oral gavage of ethanol at the dose of 1 g/kg (concentration $c = 10\%$ weight/volume in tap water, prepared from a 94% (vol/vol) ethanol solution), followed by cocaine administration (20 mg/kg ip). Two rats received intraperitoneal injections of saline (1 mL/kg) for control conditions.

Following 60 min after drug administration, rats were rapidly decapitated (without anesthesia), and their brain removed and stored on dry ice.

2.2. MALDI mass spectrometry imaging

Frozen rat tissues were cryosectioned at 12 μm and deposited on a glass microscope slide. The depth of brain tissue sectioning was set to allow the specific analysis of histological regions of interest including cortex, corpus striatum and hippocampus (Fig. 1) [25]. Two sections of a rat brain in which a saline (1 mL/kg) solution and 20 mg/kg of cocaine were respectively administered have been coated with 2,5 -dihydroxybenzoic acid (30 mg/ml) in 50:50 acetonitrile: water with 0.1% of trifluoroacetic acid to analyse cocaine distribution and determine regions of interest. Six layers were deposited at flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ for the first, 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ for the second, 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ for the third and 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ for the followings using a SunCollect™ automatic sprayer (Sunchrom, Friedrichsdorf, Germany). For MSI-based metabolomic analyses, two different brains were analyzed for each condition using the same deposition process with 8 layers of 9-Aminoacridine (9-AA) at 10 mg/ml in 70:30 methanol: water. Analysed tissues were then stained using classical histological hematoxylin and eosin staining. MSI of samples were performed using a MALDI-LTQ-Orbitrap XL equipped with a 337 nm N_2 laser operating at 60 Hz (Thermo Scientific, Bremen, Germany) with a laser beam size of $60 \times 50 \mu\text{m}$. All analysis were performed with a spectral resolution of 60'000 switching off the automatic spectral filtering (ASF) and the automatic gain control (AGC). MALDI plate motion was set to raster with step size of 100 μm corresponding to the spatial resolution at 1 $\mu\text{scan}/\text{step}$. DHB analysis was performed in single ion monitoring (SIM) focus-

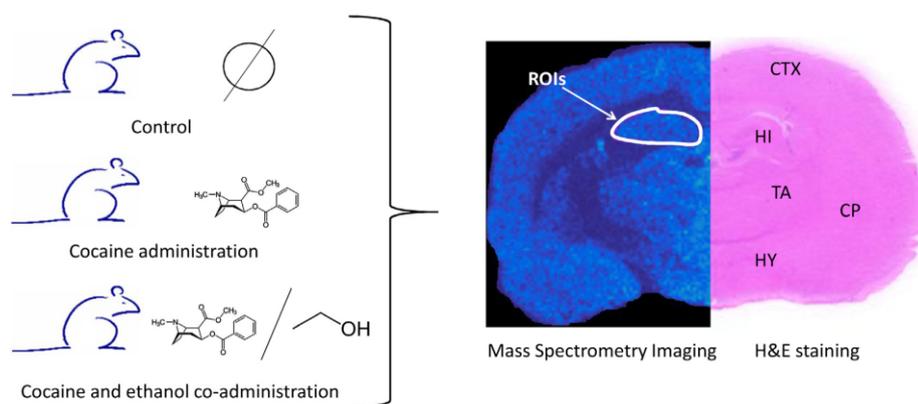


Fig. 1. Design of the study. Rat brain tissue samples were collected 60 min after saline (Control) (1 mL/kg), cocaine (20 mg/kg) and a combination of cocaine (20 mg/kg) and ethanol (1 g/kg) administration. Rat brain tissues were coronally sectioned in a region containing the hippocampus (HI), the cortex (CTX), the corpus striatum (CP), the thalamus (TA) and the hypothalamus (HY). Tissue sections coated with 9-AA were analyzed by MALDI-MSI for in situ metabolomics with a spatial lateral resolution of 100 μm in negative ionization mode.

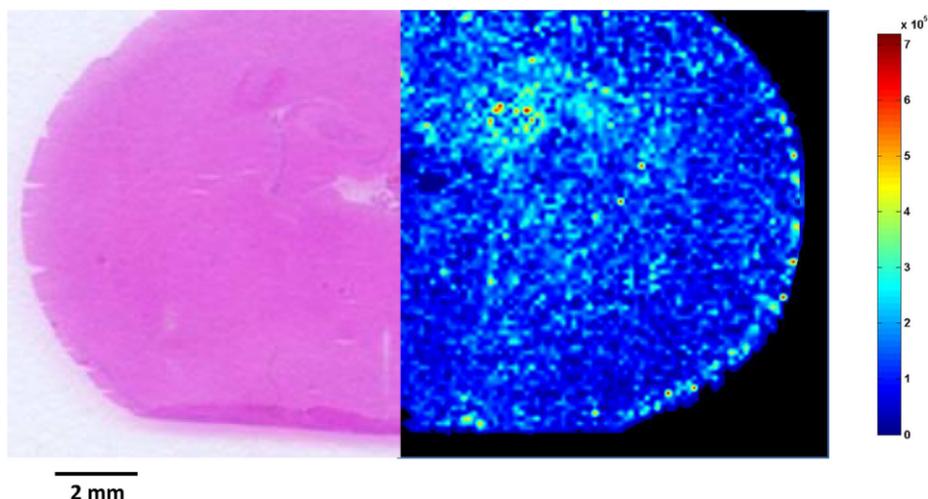


Fig. 2. H&E and MSI of cocaine (m/z 304.1543) in positive ionization mode on a coronal rat brain tissue section analyzed by MALDI-MSI at a spatial resolution of $100\ \mu\text{m}$ after an administration of 20 mg/kg of cocaine (at $t = 60$ min). The brain section was coated with DHB and analyzed on targeted single ion monitoring (tSIM).

ing on cocaine (304.1543 m/z) using positive polarity with a laser energy of $5\ \mu\text{J}$ and the number of laser shots set to 5. Concerning 9-AA, data acquisition was performed in negative polarity with a laser energy of $10\ \mu\text{J}$ and 7 laser shots. External calibration in both modes was performed using a metabolite and peptide mixture every day. A mass accuracy below 5 ppm was obtained across all tissue section images.

2.3. Data analysis and ROI selection

Image reconstruction and visualisation were performed using ImageQuest™ v1.1.0 software (Thermo Scientific) and MSiReader standalone software v0.06 (<http://www.msireader.com>). Data were exported to imzML format for processing. Peak picking was performed using the MALDIquant package in the R environment (<http://cran.r-project.org>) [28]. Selection of hippocampus as a region of interest (ROI) was done using MSiReader based on the histology annotation and the list of features automatically determined by MALDIquant as described above (<http://cran.r-project.org>). The generated peak intensity data were log transform prior further analysis. Statistical multivariate analyses have been used to discriminate between the different experimental conditions including principal component analysis (PCA) and heat map clustering performed on metaboanalyst platform (www.metaboanalyst.ca). Class prediction and differentially expressed metabolites were determined by spatial shrunken centroid using “Cardinal” packages into R [29]. Parameters were optimized to get the best accuracy using both the neighbourhood smoothing radius (r) and the shrinkage parameter (s) set at 2 and considering 3 clusters (k) [30]. A gaussian weight was used for spatial smoothing as adapted from spatially-aware clustering [31]. Discriminant metabolites were characterized by comparing the accurate mass measurements and the MS/MS fragmentation pattern using the human metabolome database (www.hmdb.ca), lipidmaps (www.lipidmaps.org), metlin (<http://metlin.scripps.edu>). For MS/MS, higher energy collisional dissociation (HCD) was performed and a 1 Da mass window was used Normalized collision energy (NCE) of 40, 50, and 100 eV for PI(38:4), AMP and taurine was used respectively (see Supplementary Fig. S3 in the online version at DOI:10.1016/j.ijms.2017.12.001).

3. Results and discussion

Addiction and especially cocaine addiction is a complex process involving several molecular mechanisms in different brain regions [7]. A better understanding of drug-induced molecular changes could bring new insights into the molecular mechanisms of addiction and the discovery of potential therapeutic targets. Cocaine addiction has been reported to have a high overlap of neural and molecular mechanisms associated with memory and learning. Therefore, this study focuses on the metabolites changes linked with acute cocaine administration in hippocampus. We also investigated the cocktail effect of alcohol and cocaine, as a representative common combination of drugs of abuse.

3.1. Cocaine distribution in rat brain

After administration of cocaine (20 mg/kg), rat brain tissue sections were analyzed by MALDI-MSI with DHB matrix deposition to study cocaine distribution. In this way, brain tissues were sectioned at different depth to cover different brain regions involved in the reward circuit including cortex, striatum, and hippocampus (Fig. 1). At this position, cocaine was detected in the whole tissue section but with a heterogeneous distribution (Fig. 2). The use of a control sample confirms that the signal is due to cocaine only (see Supplementary Fig. S4 in the online version at DOI:10.1016/j.ijms.2017.12.001). Interestingly, we observed that cocaine was more abundant in the region of the hippocampus and corpus striatum. This first MSI results agree with other works performed by LC-MS/MS showing that cocaine is not homogeneously distributed throughout different brain regions [32]. Based on this observation and with respect to its important role in the reward-related learning process, we investigated more precisely in the second step the metabolomic changes occurring in hippocampus after acute administration of cocaine and of both cocaine and alcohol.

3.2. Hippocampus metabolomic changes associated with an acute administration

To investigate potential metabolomic changes induced by acute cocaine administration in rat brain, a histology-driven approach was used to select the hippocampus ROIs from the ion images and

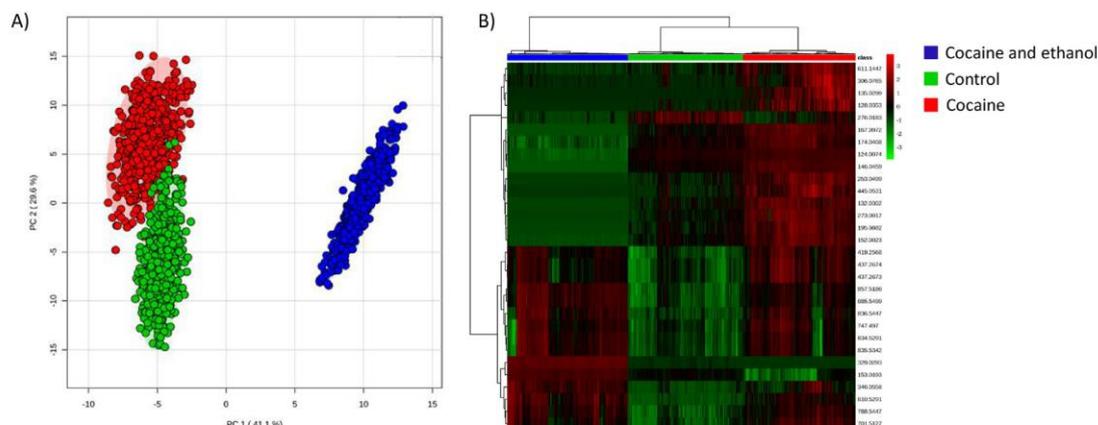


Fig. 3. Principal component analysis (PCA) of the control (green), cocaine (red), and cocaine and ethanol (blue) administration for the mining of IMS data sets from 2 rats per condition (A). Each dots represent a pixel in the hippocampus regions for the 6 rats. Heat map and bidirectional clustering analysis showing the expression intensity of the top 30 discriminant ions for the different type of administration (B). Discriminant ions are determined by random forest analysis. A green to red gradient represents the down- and up-regulation ions, respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

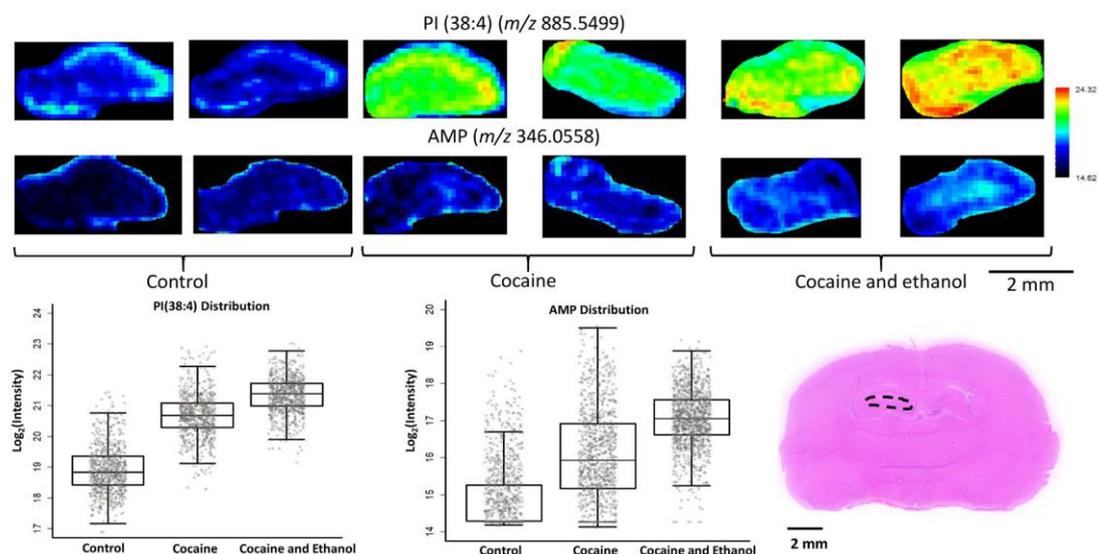


Fig. 4. H&E and discriminant ion images selected on the basis of the multivariate analysis. Three different conditions have been tested, including control, cocaine administration and co-administration of cocaine and ethanol. MSI ion images were acquired in negative ionization mode for AMP (m/z 346.0543) and phosphatidylinositol (PI) (38:4) (m/z 885.5499) at a spatial resolution of $100\ \mu\text{m}$. Representative ROI selection of the hippocampus region is shown with dotted line on the H&E. Boxplots show the intensity distribution at each pixel of the ROI selections for both compounds.

based on the histology annotations. For this purpose, an automated peak extraction was performed in each tissue section. Interestingly, we observed that metabolites profiles were differentially expressed in the hippocampus region after administration of cocaine and both cocaine and alcohol compared to control rats (see Supplementary Fig. S1 in the online version at DOI:10.1016/j.ijms.2017.12.001). This result was confirmed by PCA analysis performed on the hippocampus ROIs for each condition (Fig. 3). Indeed, a good classification of the 3 groups was obtained with 41.1% total variance explained by the first projection axis and around 29% by the second. Interestingly, a single administration of cocaine reveals metabolite profiles differentially expressed in the hippocampus regions. In addition, PCA score plot also demonstrates that the concomi-

tant administration of cocaine and alcohol lead to a reinforced perturbation of the metabolome with respect to administration of cocaine alone. This classification was confirmed with the heat map analysis and spatial shrunken centroids clustering revealing a metabolic signature for the hippocampus region according to the type of administration (Fig. 3).

3.3. MSI of discriminant metabolites

Based on the heat map and spatial shrunken centroids analyses, we confirmed the observed marker patterns by retrospectively visualizing the associated ion images in each rat brain sample. Images were acquired in negative polarity with a spatial reso-

lution of 100 μm . The ions images allow us to confirm several differences in the metabolite profiles for hippocampus region. For instance, taurine (m/z 124.0743) was upregulated after cocaine administration and downregulated after alcohol and cocaine co-administration comparing to control samples (see Supplementary Fig. S2 in the online version at DOI:10.1016/j.ijms.2017.12.001). Adenosine monophosphate (AMP) (m/z 346.0558) and phosphatidylinositol (PI) (38:4) (m/z 885.5499) can be used as other examples since they are both upregulated in presence of cocaine (Fig. 4). For those compounds, this effect is even reinforced when alcohol was co-administrated. Although hippocampus was targeted as a ROI for multivariate analysis, the possibility of acquiring whole images by MSI also allowed us to reveal that metabolomic perturbations occur in other brain regions (see Supplementary Fig. S2 in the online version at DOI:10.1016/j.ijms.2017.12.001). Taken together, these results reinforce the interest of MSI for investigating the drug-induced metabolomic changes in brain.

4. Conclusion

This work presents a MSI approach to map the in situ metabolomic changes in rat brain induced by drugs of abuse. Herein, we demonstrated significant changes of metabolite levels occurring in hippocampus after acute administration of cocaine and alcohol. However, this first study needs to be confirmed using a larger set of samples and in different experimental conditions, like for instance by investigating the toxicodynamic changes after chronic administration of cocaine. In addition, MSI could also be used to investigate the spatial perturbations of the brain metabolome induced by other drugs of abuse. Although this study focused on metabolomics changes in hippocampus after acute cocaine administration, the approach could remarkably increase our understanding of molecular mechanisms associated to reward-related processes by studying other regions of interest such as the nucleus accumbens and prefrontal cortex. The recent and rapid developments of MSI, in term of instrumentation and data mining strategies, bring new insights into the application of the technology in pharmacological and toxicological studies.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from the Federal Office of Public Health (contract no. 14.013792/204.0001/-1300) and the Swiss National Science Foundation (project no. 310030-156771).

References

- G.F. Koob, et al., Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27 (2004) 739–749.
- B.J. Everitt, T.W. Robbins, Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion, *Nat. Neurosci.* 8 (2005) 1418–1489.
- X. Guan, Y. Guan, Proteomic profile of differentially expressed proteins in the medial prefrontal cortex after repeated cocaine exposure, *Neuroscience* 236 (2013) 262–270.
- M.G. Kutlu, T.J. Gould, Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory: contributions to development and maintenance of addiction, *Learn. Mem.* 23 (2016) 515–533.
- Z. Zhou, Q. Yuan, D.C. Mash, D. Goldman, Substance-specific and shared transcription and epigenetic changes in the human hippocampus chronically exposed to cocaine and alcohol, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 6626–6631.
- B. Boury-Jamot, O. Halfon, P.J. Magistretti, B. Boutrel, Lactate release from astrocytes to neurons contributes to cocaine memory formation, *Bioessays* 38 (2016) 1266–1273.
- N.M. White, Addictive drugs as reinforcers: multiple partial actions on memory systems, *Addiction* 91 (1996) 921–949, discussion 951–965.
- J. Goodman, M.G. Packard, Memory systems and the addicted brain, *Front. Psychiatry* 7 (2016) 24.
- N.D. Volkow, et al., Addiction: decreased reward sensitivity and increased expectation sensitivity conspire to overwhelm the brain's control circuit, *Bioessays* 32 (2010) 748–755.
- M.J. Thomas, P.W. Kalivas, Y. Shaham, Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction, *Br. J. Pharmacol.* 154 (2008) 327–342.
- S.E. Hyman, R.C. Malenka, Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence, *Nat. Rev. Neurosci.* 2 (2001) 695–703.
- J.M. Bossert, U.E. Ghitza, L. Lu, D.H. Epstein, Y. Shaham, Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: an update and clinical implications, *Eur. J. Pharmacol.* 526 (2005) 36–50.
- W. Mittenberg, S. Motta, Effects of chronic cocaine abuse on memory and learning, *Arch. Clin. Neuropsychol.* 8 (1993) 477–483.
- I.A. Mendez, et al., Long-term effects of prior cocaine exposure on Morris water maze performance, *Neurobiol. Learn. Mem.* 89 (2008) 185–191.
- H. Garavan, J.N. Kaufman, R. Hester, Acute effects of cocaine on the neurobiology of cognitive control, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363 (2008) 3267–3276.
- S.C. Wood, J. Fay, J.R. Sage, S.G. Anagnostaras, Cocaine and Pavlovian fear conditioning: dose-effect analysis, *Behav. Brain Res.* 176 (2007) 244–250.
- E.J. Nestler, The neurobiology of cocaine addiction, *Sci. Pract. Perspect.* 3 (2005) 4–10.
- N.D. Volkow, J.S. Fowler, G.J. Wang, The addicted human brain: insights from imaging studies, *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 1444–1451.
- P. Gao, J.C. de Munck, J.H.W. Limpens, L. Vanderschuren, P. Voorn, A neuronal activation correlate in striatum and prefrontal cortex of prolonged cocaine intake, *Brain Struct. Funct.* 222 (2017) 3453–3475.
- T.F. Tropea, B.E. Kosofsky, A.M. Rajadhyaksha, Enhanced CREB and DARPP-32 phosphorylation in the nucleus accumbens and CREB, ERK, and GluR1 phosphorylation in the dorsal hippocampus is associated with cocaine-conditioned place preference behavior, *J. Neurochem.* 106 (2008) 1780–1790.
- O. Fiehn, Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes, *Plant Mol. Biol.* 48 (2002) 155–171.
- A. Thomas, et al., Histology-driven data mining of lipid signatures from multiple imaging mass spectrometry analyses: application to human colorectal cancer liver metastasis biopsies, *Anal. Chem.* 85 (2013) 2860–2866.
- A. Thomas, P. Chaurand, Advances in tissue section preparation for MALDI imaging MS, *Bioanalysis* 6 (2014) 967–982.
- E. Patel, et al., MALDI-MS imaging for the study of tissue pharmacodynamics and toxicodynamics, *Bioanalysis* 7 (2015) 91–101.
- M. Irie, Y. Fujimura, M. Yamato, D. Miura, H. Wariishi, Integrated MALDI-MS imaging and LC-MS techniques for visualizing spatiotemporal metabolomic dynamics in a rat stroke model, *Metabolomics* 10 (2014) 473–483.
- A. Bodzon-Kulakowska, et al., Brain lipidomic changes after morphine, cocaine and amphetamine administration – DESI – MS imaging study, *Biochim. Biophys. Acta* 1862 (2017) 686–691.
- S. Khatib-Shahidi, M. Andersson, J.L. Herman, T.A. Gillespie, R.M. Caprioli, Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by imaging MALDI mass spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (2006) 6448–6456.
- N.H. Patterson, et al., Assessment of pathological response to therapy using lipid mass spectrometry imaging, *Sci. Rep.* 6 (2016) 36814.
- R. Tibshirani, T. Hastie, N. Balasubramanian, G. Chu, Class prediction by nearest shrunken centroids, with applications to DNA microarrays, *Stat. Sci.* 18 (1) (2003) 104–117.
- K.D. Bemis, et al., Probabilistic segmentation of mass spectrometry (MS) images helps select important ions and characterize confidence in the resulting segments, *Mol. Cell. Proteomics* 15 (2016) 1761–1772.
- T. Alexandrov, J.H. Kobarg, Efficient spatial segmentation of large imaging mass spectrometry datasets with spatially aware clustering, *Bioinformatics* 27 (2011) i230–i238.
- B. Bystrowska, et al., LC/MS/MS evaluation of cocaine and its metabolites in different brain areas, peripheral organs and plasma in cocaine self-administering rats, *Pharmacol. Rep.* 64 (2012) 1337–1349.