

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le vendredi 21 octobre 2022
Par M. Corentin Grenier**

**VALIDATION D'UNE METHODE DE SCREENING TOXICOLOGIQUE DANS LE
SANG ET L'URINE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE HAUTE RESOLUTION EN
VUE DE SON ACCREDITATION**

Membres du jury :

Président :

Pr Delphine Allorge, PU-PH, Faculté de Pharmacie - Université de Lille

Directeur, conseiller de thèse :

Dr Marie Lenski, AHU, Faculté de Pharmacie - Université de Lille

Assesseurs :

Pr Annabelle Dupont, PU-PH, Faculté de Pharmacie - Université de Lille

Dr Jean-Michel Gaulier, PH, UF de Toxicologie, Pôle de Biologie Pathologie Génétique
– CHU Lille

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le vendredi 21 octobre 2022
Par M. Corentin Grenier**

**VALIDATION D'UNE METHODE DE SCREENING TOXICOLOGIQUE DANS LE
SANG ET L'URINE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE HAUTE RESOLUTION EN
VUE DE SON ACCREDITATION**

Membres du jury :

Président :

Pr Delphine Allorge, PU-PH, Faculté de Pharmacie - Université de Lille

Directeur, conseiller de thèse :

Dr Marie Lenski, AHU, Faculté de Pharmacie - Université de Lille

Assesseurs :

Pr Annabelle Dupont, PU-PH, Faculté de Pharmacie - Université de Lille

Dr Jean-Michel Gaulier, PH, UF de Toxicologie, Pôle de Biologie Pathologie Génétique
– CHU Lille

Faculté de Pharmacie de Lille
3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille
03 20 96 40 40
<https://pharmacie.univ-lille.fr>

Université de Lille

Président
Premier Vice-président
Vice-présidente Formation
Vice-président Recherche
Vice-présidente Réseaux internationaux et européens
Vice-président Ressources humaines
Directrice Générale des Services

Régis BORDET
Etienne PEYRAT
Christel BEAUCOURT
Olivier COLOT
Kathleen O'CONNOR
Jérôme FONCEL
Marie-Dominique SAVINA

UFR3S

Doyen
Premier Vice-Doyen
Vice-Doyen Recherche
Vice-Doyen Finances et Patrimoine
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires
Vice-Doyen RH, SI et Qualité
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie
Vice-Doyen Territoires-Partenariats
Vice-Doyenne Vie de Campus
Vice-Doyen International et Communication
Vice-Doyen étudiant

Dominique LACROIX
Guillaume PENEL
Éric BOULANGER
Damien CUNY
Sébastien D'HARANCY
Hervé HUBERT
Caroline LANIER
Thomas MORGENROTH
Claire PINÇON
Vincent SOBANSKI
Dorian QUINZAIN

Faculté de Pharmacie

Doyen
Premier Assesseur et Assesseur en charge des études
Assesseur aux Ressources et Personnels
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement
Assesseur à la Vie de la Faculté
Responsable des Services
Représentant étudiant

Delphine ALLORGE
Benjamin BERTIN
Stéphanie DELBAERE
Anne GARAT
Emmanuelle LIPKA
Cyrille PORTA
Honoré GUISE

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques	87
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85

M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques	87
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BLONDIAUX	Nicolas	Bactériologie - Virologie	82
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81

Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique	85
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	85
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie	87
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27

Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie	87
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85

M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques	85

Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	GEORGE	Fanny	Bactériologie - Virologie / Immunologie	87
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	RUEZ	Richard	Hématologie	87
M.	SAIED	Tarak	Biophysique - RMN	85
M.	SIEROCKI	Pierre	Chimie bioinorganique	85

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière

Faculté de Pharmacie de Lille

3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille

03 20 96 40 40

<https://pharmacie.univ-lille.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Remerciements

Je remercie Madame le Professeur Delphine Allorge d'avoir accepté d'être la présidente de ce jury de thèse. Je tiens également à vous remercier de m'avoir accueilli dans votre service de Toxicologie durant 4 semestres. La Toxicologie m'a permis de m'épanouir pendant cet internat et fera partie intégrante de mon futur travail de biologiste médicale.

J'adresse tous mes remerciements à Madame le Professeur Annabelle Dupont pour l'honneur que vous m'accordez de faire partie de ce jury de thèse.

Je remercie également le Docteur Jean-Michel Gaulier d'avoir accepté de prendre part à ce jury et de l'aide précieuse que vous m'avez donné pour la réalisation de ce travail.

Je remercie tout particulièrement Madame le Docteur Marie Lenski. Je suis très honoré que tu aies accepté d'être ma directrice de thèse. C'est une première pour toi et je voulais que tu saches que sans toi, cette thèse n'aurait pas vu le jour. Tu as su être disponible, à l'écoute et surtout très patiente avec moi. Tu as toujours été là pour me soutenir dans les moments difficiles. Tu as été une formidable directrice de thèse.

Je tiens également à remercier tout particulièrement Madame le Docteur Camille Richeval pour l'ensemble des connaissances que tu m'as apporté sur la spectrométrie de masse et sur la méthode du screening toxicologique. Je te remercie également d'avoir participé à la réalisation de ce travail.

Je remercie mes co-internes le Docteur Alexandr Gish et le Docteur Florian Hakim de l'aide et du soutien que vous m'avez apporté durant ces derniers mois. Depuis 3 semestres, c'est un plaisir de partager le bureau des internes avec vous.

Je remercie également mes collègues le Docteur Benjamin Hennart et le Docteur Nicolas Beauval pour leur aide à la réalisation de ce projet.

Je remercie également l'équipe du laboratoire de toxicologie pour leur aide indispensable au projet. Je remercie plus particulièrement les techniciens de laboratoire pour m'avoir laissé du temps sur l'appareil de screening toxicologique. La communication a toujours été très bonne et a permis d'effectuer ce travail en parallèle de la routine du laboratoire.

Enfin, je remercie mes frères, mes parents, ma famille ainsi que mes amis pour leur soutien durant ces 9 années d'études.

Table des matières

Liste des abréviations.....	15
Liste des figures	16
Liste des tableaux.....	16
1. Introduction	17
1.1. Screening toxicologique	17
1.1.1. Définition et contexte de demande d'analyse en biologie médicale	17
1.1.2. Approches analytiques.....	18
1.2. Accréditation et validation de méthode.....	24
1.2.1. Cadre réglementaire	24
1.2.2. Validation d'une méthode qualitative utilisant la spectrométrie de masse	25
1.2.3. Recommandations SFBC-SFTA	26
1.2.4. COFRAC – SH GTA 04	28
2. Travaux personnels.....	30
2.1. Objectifs	30
2.2. Matériel et méthode.....	30
2.2.1. Méthode de screening toxicologique.....	30
2.2.2. Échantillons.....	30
2.2.3. Pré-analytique.....	31
2.2.4. Appareillage	31
2.2.5. Interprétation des résultats	33
2.2.6. Protocole expérimental	34
2.3. Résultats	35
2.3.1. Fidélité	35
2.3.2. Limite d'identification.....	36
2.3.3. Tableaux de résultats.....	37
3. Discussion.....	45
3.1. Paramètres de validation testés	45

3.1.1. Fidélité	45
3.1.2. Limite d'identification.....	46
3.2. Limites	46
3.3. Perspectives.....	48
4. Conclusion	50
Bibliographie.....	51
Annexes.....	56

Liste des abréviations

AOC	Amphétamines et ses dérivés, opioïdes et cocaïne et ses métabolites
ASC	Aire sous la courbe
CHU	Centre hospitalier universitaire
CID	Collision induite
CIQ	Contrôle de qualité interne
CL	Chromatographie liquide
COFRAC	Comité français d'accréditation
CV	Coefficient de variation
Da	Dalton
DDA	Acquisition dépendante des données
DIA	Acquisition indépendante des données
EI	Etalon interne
ESI	Electrospray
FN	Faux négatif
FP	Faux positif
GTA	Guide technique d'accréditation
LDD	Limite de détection
LOI	Limite d'identification
<i>m/z</i>	Rapport masse sur charge
NABM	Nomenclature des actes en biologie médicale
PM	Phase mobile
PS	Phase stationnaire
QTOF	Quadripôle - temps de vol
SFBC	Société française de biologie clinique
SFTA	Société française de toxicologie analytique
SH	Santé humaine
SM	Spectrométrie de masse
SMHR	Spectrométrie de masse haute résolution
SM/SM	Spectrométrie de masse en tandem
SPE	Extraction en phase solide
TOF	Temps de vol

Liste des figures

Figure 1 : Principe de la spectrométrie de masse.....	19
Figure 2 : Electrospray d'après Banerjee S. et al. (11).....	20
Figure 3 : La résolution en spectrométrie de masse d'après Balogh MP (15)	21
Figure 4 : Schéma d'un QTOF d'après Saint-Lary L. (16)	21
Figure 5 : Équation utilisée pour le temps de vol	22
Figure 6 : Exemple des spectres de masse de la bêta-hydroxyéthylthéophylline (Etalon Interne (EI)) en fonction 1 et en fonction 2.....	23
Figure 7 : Exemple d'un chromatogramme de la bêta-hydroxyéthylthéophylline (EI) extrait du logiciel Mass Lynx®	34
Figure 8 : Calcul du CV.....	36
Figure 9 : Chromatogramme représentant la coélution entre la protriptyline et la N-desmethylmaprotiline.....	47
Figure 10 : Formule de l'effet matrice (ME) d'après Matuszewski & al (44).....	48

Liste des tableaux

Tableau 1 : Performances à évaluer lors d'une vérification/validation de méthode quantitative ou qualitative (SH GTA 04 rev 01).....	29
Tableau 2 : Gradient de PM appliqué pendant la SPE en mode ONLINE	32
Tableau 3 : Gradient de PM appliqué pendant la séparation chromatographique	32
Tableau 4 : Exemple de résultat obtenu avec le logiciel Mass Lynx®	34
Tableau 5 : Molécules incluses par panel dans la validation de méthode avec leurs caractéristiques chromatographiques (temps de rétention) et physico-chimiques (masse exacte).....	35
Tableau 6 : Dilutions effectuées en fonction du panel	36
Tableau 7 : Résumé des résultats de la validation de méthode	37
Tableau 8 : Proportion des molécules respectant les paramètres de validation de méthode.....	44

1. Introduction

1.1. Screening toxicologique

1.1.1. Définition et contexte de demande d'analyse en biologie médicale

Le screening toxicologique, en biologie médicale, est une analyse permettant la recherche et l'identification, dans une matrice biologique (sérum, urine), d'un grand nombre de molécules (médicaments, stupéfiants, toxiques). C'est une approche spécifique de la toxicologie analytique faisant appel à des outils analytiques nécessitant une séparation par chromatographie (1).

Les principales indications de la prescription d'un screening toxicologique sont les intoxications médicamenteuses, qui sont les premières causes d'intoxications en France (2). La prise en charge initiale d'une intoxication médicamenteuse est symptomatique reposant sur l'anamnèse et l'examen clinique afin de rechercher des toxidromes qui permettent d'orienter vers les examens complémentaires à réaliser dont fait partie le screening toxicologique (3). Les recommandations de prescription du screening toxicologique dans le cas d'une intoxication grave sont « pour les patients dont l'évolution clinique et les examens complémentaires sont incompatibles avec l'anamnèse et le toxidrome initial, notamment en cas de défaillance cardio-vasculaire ou de coma inexplicables » (4). Dans ce cadre, le screening toxicologique pourra être utile pour confirmer les résultats de recherche de toxiques par immunoanalyse, rechercher la présence d'autres substances, ou encore pour le diagnostic d'exclusion d'une cause toxique (3). Le screening toxicologique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (CL-SMHR) est de plus en plus prescrit par les services cliniques. Au cours de l'année 2021, 2225 demandes de screening toxicologiques ont été effectuées au laboratoire de Toxicologie du centre hospitalier universitaire (CHU) de Lille, soit environ 6 demandes chaque jour.

La cotation des actes de biologie médicale remboursés par la sécurité sociale est décrite dans la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM). Le screening toxicologique ne figure pas dans cette NABM, mais est présent dans la liste complémentaire des actes de 2022 (code M116) car l'analyse doit faire l'objet d'une évaluation de la Haute Autorité de Santé. Le screening toxicologique y est défini comme une analyse permettant l'identification d'au moins 200 molécules distinctes à partir d'un échantillon biologique par une méthode de chromatographie (5).

1.1.2. Approches analytiques

La recherche et l'identification de molécules (médicaments, stupéfiants ou toxiques) en toxicologie ont beaucoup évolué ces dernières années. Les méthodes immunologiques peuvent être mises en œuvre, mais ne permettent souvent pas une identification précise du composé et sont limitées le plus souvent à une classe pharmacologique (ex : opiacés) (6). Les méthodes dites « séparatives » telles que la chromatographie sont de plus en plus fréquemment utilisées, couplées à des systèmes de détection en évolution permanente, tels que la spectrométrie de masse, permettant une meilleure spécificité (7).

Les techniques analytiques utilisées pour le screening toxicologique sont la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (8), la chromatographie liquide couplée à une détection à barrette de diodes (9), une détection par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) (10), ou par CL-SMHR (1). Cette dernière est la méthode mise en œuvre au laboratoire de toxicologie du CHU de Lille.

1.1.2.1. Principe de la chromatographie liquide en phase inverse

Le but est de séparer les molécules en fonction de leur polarité. En phase inverse, la phase stationnaire (PS) est la colonne qui est apolaire. Le plus souvent, elle est composée de groupements silanols auxquels sont greffées des chaînes alkyles hydrophobes (C8 ou C18). Tandis que la phase mobile (PM) éluante est polaire.

L'échantillon à analyser est poussé à travers la colonne par la PM, la séparation va s'effectuer en fonction de l'affinité des molécules vis-à-vis de la PS. Un composé apolaire sera retenu plus longtemps par la PS qu'un composé polaire. Cela se traduira par un temps de rétention plus élevé pour le composé apolaire.

L'éluion des molécules par la PM peut se faire selon 2 modes différents :

- Le mode isocratique : la composition de la PM reste inchangée au cours de la chromatographie ;
- Le mode gradient : la composition de la PM varie au cours du temps. En phase inverse, la PM aura un caractère polaire en début d'analyse pour éluer les composés polaires. En deuxième moitié d'analyse, la PM aura un caractère apolaire pour éluer les molécules plus apolaires.

1.1.2.2. Principe de la spectrométrie de masse haute résolution

Le spectromètre de masse permet de détecter en phase gazeuse des molécules en mesurant leur rapport de masse sur charge (m/z) et également en caractérisant leur structure chimique par production de fragments spécifiques de la molécule d'intérêt. Le spectromètre de masse est composé de plusieurs éléments : une source d'ionisation, un analyseur, un détecteur, et un système informatique pour le traitement du signal (Figure 1).

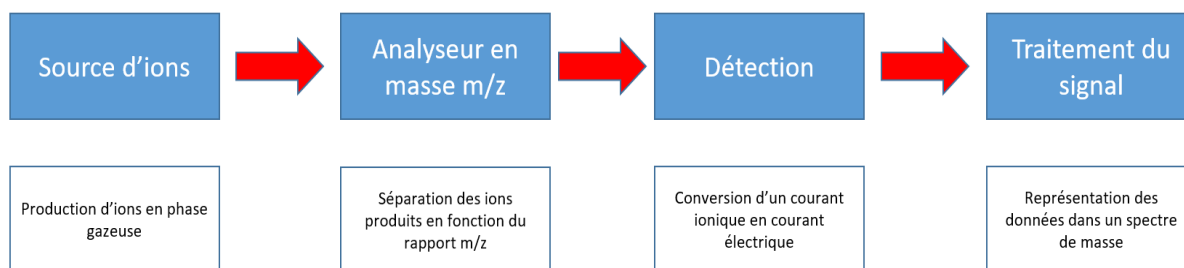


Figure 1 : Principe de la spectrométrie de masse

1.1.2.2.1. Ionisation par électrospray

L'analyse dans le spectromètre de masse se déroule en phase gazeuse. Le principe général de l'électronébulisation ou électrospray (ESI) (Figure 2) est de charger les molécules en phase liquide (en solution dans la PM) pour donner des ions dans une phase gazeuse. Il existe différentes méthodes d'ionisation, et notamment l'ESI (11) qui est utilisée dans ce travail.

La phase mobile contenant les molécules d'intérêt traverse un capillaire portant un haut potentiel électrique. Le champ électrique appliqué à la sortie du capillaire va permettre la formation de microgouttelettes chargées. Un gaz de désolvatation (azote chauffé) provoque l'évaporation de la phase mobile et diminue la taille des gouttelettes pour obtenir des ions libres chargés. Selon le mode d'ionisation choisi, les ions peuvent être chargés positivement (ESI+) ou négativement (ESI-). Une différence de potentiel électrique permet de diriger les ions vers l'analyseur. Ce trajet se fait à pression élevée, ce qui provoque de multiples collisions des ions avec les molécules de gaz et de solvant et permet de finaliser la désolvatation. Il est possible de plus ou moins fragmenter les ions dans la source en faisant varier la tension au niveau du cône échantillonneur. Ce phénomène est appelé dissociation par collision induite (CID).

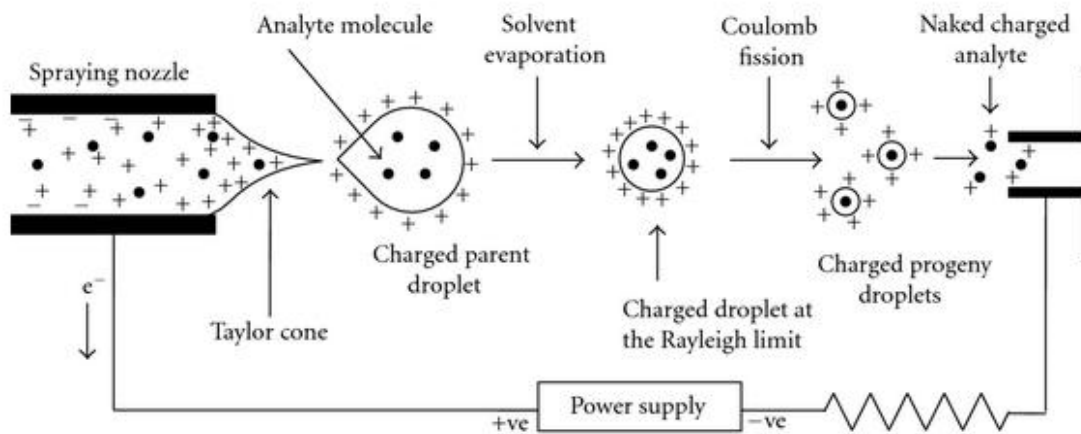


Figure 2 : Electropray d'après Banerjee S. et al. (11)

1.1.2.2.2. Spectrométrie de masse haute résolution de type quadripôle-time of flight (QTOF)

Une définition de la SMHR est donnée par la Royal Society of Chemistry : « Tout type de spectrométrie de masse permettant de déterminer la masse "exacte" des ions moléculaires dans l'échantillon, par opposition à la masse "nominale" (le nombre de protons et de neutrons) » (12). En effet, les spectromètres de masse sont discriminés par leur résolution dont i) la basse résolution, les analyseurs sont les quadripôles ou les pièges à ions ; ii) la haute résolution, les analyseurs sont le temps de vol (TOF), détecteur par résonance cyclotronique à transformée de Fourier et l'Orbitrap (13,14). En spectrométrie de masse, la résolution peut être définie comme l'aptitude à séparer 2 pics de masse proche. Elle peut être exprimée par le rapport entre la masse et la différence de masse à la moitié de la hauteur de pic (figure 3). Cette approche permet de distinguer une résolution d'environ 2000 pour la spectrométrie basse résolution et d'une résolution d'environ 20000 pour la SMHR (15).

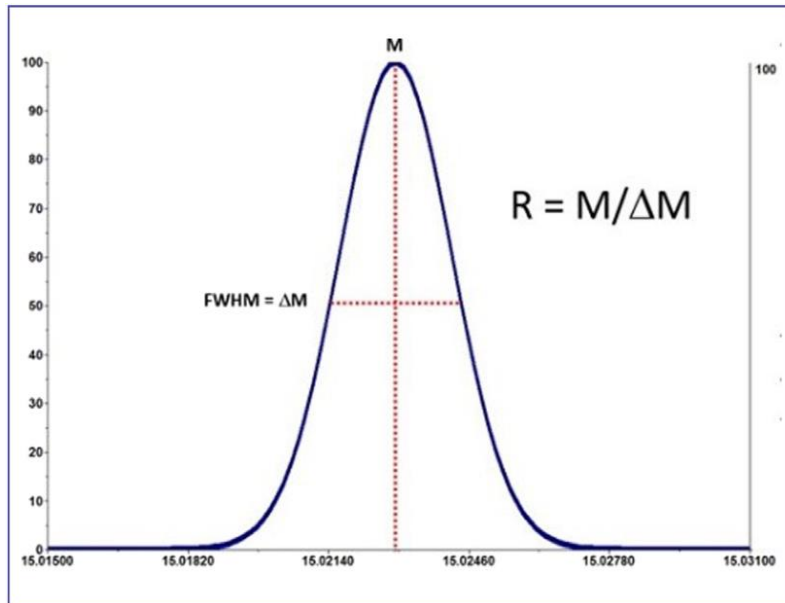


Figure 3 : La résolution en spectrométrie de masse d'après Balogh MP (15)

Dans un spectre de masse, la résolution (R) est définie par le rapport de la masse (M) sur la différence de masse à la moitié du pic (ΔM). FWHM : full width at half maximum

Au laboratoire de Toxicologie du CHU de Lille, nous disposons d'un Xevo® G2-QTOF (WATERS). Cet analyseur est composé d'un quadripôle, d'une chambre de collision et d'un tube de vol (Figure 4).

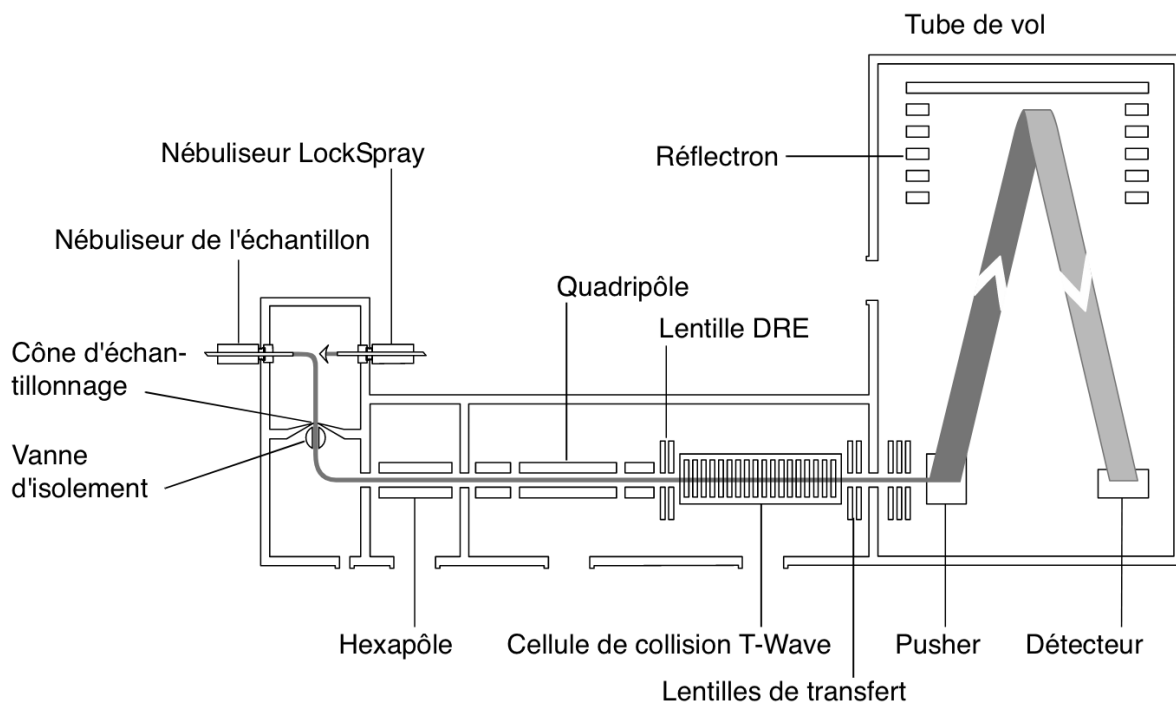


Figure 4 : Schéma d'un QTOF d'après Saint-Lary L. (16)

Les ions sortant de l'ESI entrent dans un hexapôle puis un quadripôle qui permet de filtrer les masses en fonction de leur rapport m/z (16). Ce quadripôle est constitué de 4 électrodes cylindriques chargées 2 à 2 (positifs et négatifs). Un potentiel sinusoïdal est appliqué. Pour traverser l'analyseur, un ion positif sera attiré par l'électrode chargée négativement, le potentiel de l'électrode va changer avant que l'ion se décharge sur cette électrode, entraînant un changement de direction de l'ion qui entrera en résonance (17). Les ions entrent dans la chambre de collision, ayant pour fonction de fragmenter les ions par le phénomène de CID décrit précédemment. Ces ions néoformés sont ensuite séparés par le temps de vol qui consiste à propulser les ions par une impulsion à haut volts dans un tube de vol. Le temps de vol mesuré dépendra du rapport m/z de l'ion car l'énergie (E) et la distance (d) sont constantes (figure 5). Les ions de petite taille auront un temps de vol plus faible que les ions de grande taille (13,18) ce qui permet leur séparation. Les ions arrivent finalement au niveau d'un détecteur qui les convertira en un signal.

$E = \frac{1}{2}(m \cdot v^2)$	$v = d/t$
$m = 2E/v^2$	$t = (m/2E)^{1/2} \cdot d$
$m = (2E/d^2) \cdot t^2$	

Figure 5 : Équation utilisée pour le temps de vol

$m =$ masse ; $E =$ énergie ; $v =$ vitesse ; $d =$ distance ; $t =$ temps de vol

1.1.2.2.3. Acquisition des données (screening non ciblé / mode MS^e)

Le but du screening non ciblé est de rechercher et d'identifier des molécules présentes dans un échantillon. L'acquisition de données peut se faire de 2 façons différentes : en acquisition dépendante des données (DDA) ou en acquisition indépendante des données (DIA).

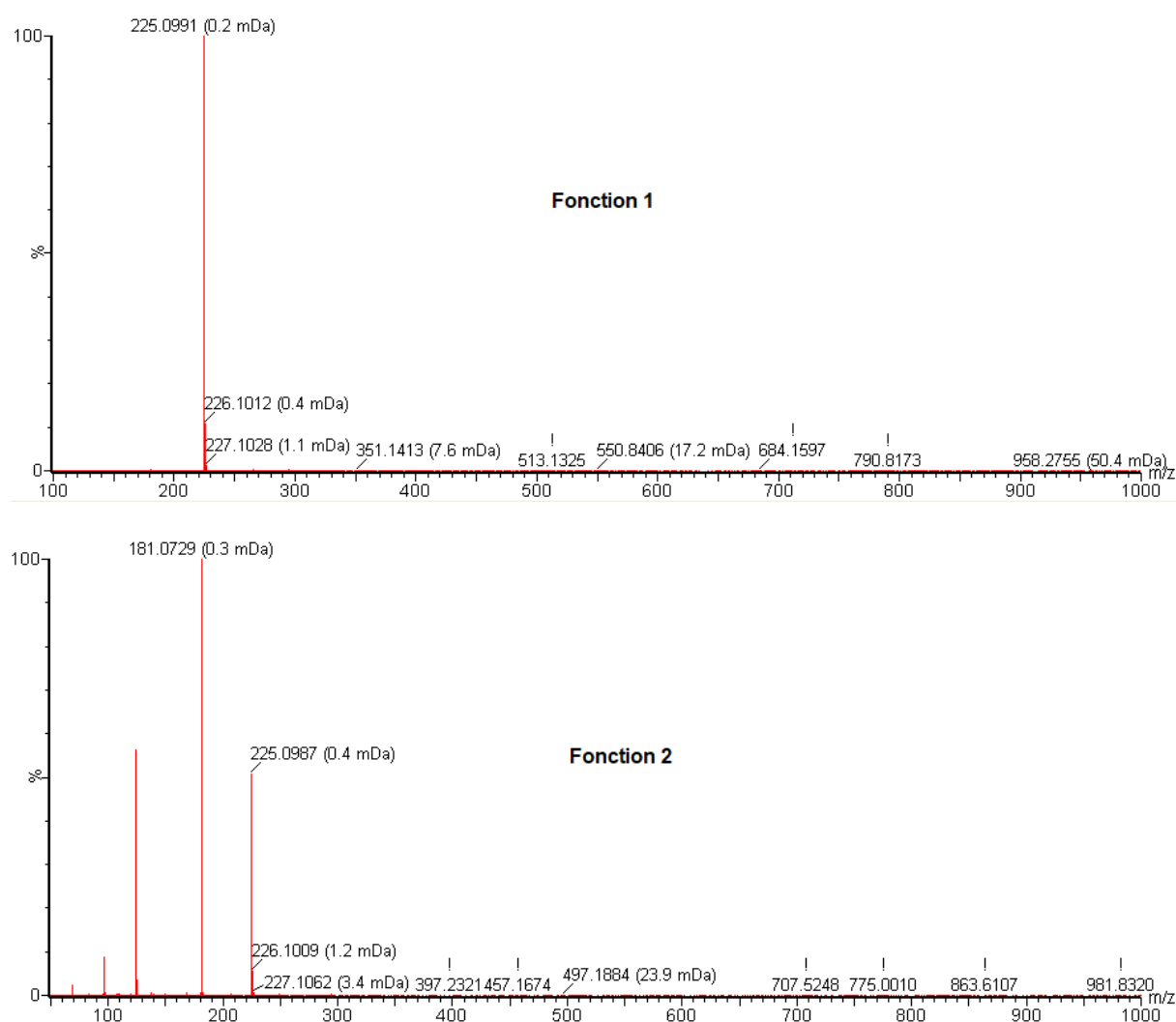
En DDA, une fois le full scan terminé (l'ensemble des ions sélectionnés par le quadripôle sont analysés), les données sont analysées à nouveau en sélectionnant dans le quadripôle, les ions dont l'intensité du signal dépasse un seuil préétabli. Ces ions sont fragmentés dans la chambre de collision permettant la production de fragments. L'inconvénient de la DDA est que les ions dont l'intensité ne dépasse pas ce seuil, ne sont pas sélectionnés et sont donc non détectés, pouvant théoriquement entraîner des faux négatifs (13,18).

A la différence de la DDA, la DIA sélectionne l'ensemble des ions compris dans la gamme de masse sélectionnée ce qui permet de s'affranchir de l'intensité du signal.

Le mode d'acquisition est le mode MS^e (19) pour l'appareillage Xevo® G2-QTOF (WATERS). Ce mode se fait en double acquisition dans une gamme de masse prédéfinie (17,20) :

- Une acquisition des données à basse énergie (6 eV), permettant d'obtenir le spectre de masse de l'ion moléculaire (fonction 1) ;
- Une acquisition des données à haute énergie (rampe de 10 à 40 eV) permettant d'obtenir le spectre de fragmentation de l'ion moléculaire (fonction 2) (Figure 6) ;

Les signaux acquis sont calibrés par rapport à une masse de référence ou lock mass (21,22). Cette lock mass est injectée en parallèle de l'échantillon et permet d'éviter une erreur systématique sur la masse des composés (acquisition sur la fonction 3).



*Figure 6 : Exemple des spectres de masse de la bêta-hydroxyéthylthéophylline (Etalon Interne (EI)) en fonction 1 et en fonction 2
masse exacte de la Bêta-hydroxyethylthéophylline : 225.0991*

1.1.2.2.4. *Traitement des données*

Pour permettre l'identification des molécules, il est nécessaire d'avoir une base de données contenant les informations acquises dans les mêmes conditions analytiques telles que la masse exacte de l'ion moléculaire et de ses fragments spécifiques obtenus après la collision, le temps de rétention, la formule brute. De plus, le logiciel de traitement de données est paramétré selon des critères d'acceptation d'identification qui vont permettre de minimiser le nombre de faux positifs et de faux négatifs (23). Ces critères vont dépendre de l'instrument et du logiciel de traitement de données et par extension vont être propre à chaque laboratoire.

Au laboratoire de toxicologie du CHU de Lille, ces critères sont définis dans la méthode et reposent sur l'erreur de temps de rétention, l'erreur de masse exacte de l'ion parent, la détection des fragments et l'aire sous la courbe (ASC) du pic chromatographique. Le laboratoire dispose également d'une base de données « maison » de spectre de masse (24).

1.2. *Accréditation et validation de méthode*

1.2.1. *Cadre réglementaire*

Selon l'article L6221-1 du code de la santé publique « Un laboratoire de biologie médicale ne peut réaliser d'examen de biologie médicale sans accréditation. » (25).

Selon l'arrêté du 16 juillet 2020 définissant le cadre de l'accréditation mentionnée à l'article L. 6221-1 du code de la santé publique « Un laboratoire de biologie médicale est considéré accrédité, [...] lorsque l'ensemble de ses lignes de portée sont accréditées par l'instance nationale d'accréditation [...]. Une ligne de portée correspond à un ensemble d'examens de biologie médicale ayant des caractéristiques communes mobilisant une méthodologie commune d'accréditation. » (26).

Le Comité français d'accréditation (Cofrac) est l'organisme chargé de délivrer les accréditations aux structures intervenant dans l'évaluation de la conformité en France, notamment les laboratoires de biologie médicale. Selon la procédure d'accréditation des laboratoires de biologie médicale - Ministère des Solidarités et de la Santé publiée le 06/07/2021 « [...] la ligne de portée est règlementairement considérée comme accréditée dès lors qu'un ou des examens représentatifs de la ligne de portée considérée associant les compétences professionnelles communes (métrologie, habilitation des personnels, etc.), sont accrédités par le Cofrac. [...] » (27). Le screening toxicologique réalisé au laboratoire de toxicologie du CHU de Lille est basé

sur le principe de la CL-SMHR. Cet examen fait ainsi parti de la ligne de portée BM PT 09 (28) et a été désigné par le laboratoire comme examen représentatif de cette ligne de portée, et doit donc être accrédité par le Cofrac. Puisque cette ligne de portée était manquante à l'attestation d'accréditation, une demande d'extension d'accréditation a été déposée en novembre 2021.

Les demandes d'accréditation des structures sont classées en 2 catégories (A ou B) reposant sur le choix de la structure à mettre en œuvre des méthodes à adopter (portée A) ou à adapter/développer (portée B) (29). Le screening toxicologique est une analyse à accréditer en portée B selon la norme NF EN ISO 15189 qui spécifie les exigences de qualité et de compétence applicables en biologie médicale.

Le Cofrac met à disposition une documentation spécifique en santé humaine (SH) dont les guides techniques d'accréditation (GTA). Le SH GTA 04 rev 01 est le guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes de biologie médicale. Le SH GTA 06 rev 00 concerne le contrôle qualité en biologie médicale.

1.2.2. Validation d'une méthode qualitative utilisant la spectrométrie de masse

L'accréditation d'une analyse nécessite une validation de la méthode. Ce processus doit démontrer la qualité inhérente d'une méthode analytique en biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 par des paramètres de validation.

Concernant le screening toxicologique par CL-SMHR, les référentiels internationaux et nationaux ne mettent pas à disposition de paramètres de validation à suivre spécifiquement pour cette analyse. Une adaptation des recommandations fournies par ces organismes tels que l'agence européenne du médicament (EMA) (30) ou les recommandations fournies par l'American academy of forensic Sciences standards boards (ASB) (31) et le Scientific Working Group for Toxicology (SWGTOX) (32) est nécessaire pour établir une stratégie de validation de méthode.

Le screening par CL-SMHR est une méthode qualitative dont les paramètres les plus importants à tester sont la sensibilité/spécificité, la limite de détection et la contamination (33). *Pedersen & al.* ont effectué une validation de méthode d'un screening toxicologique par CL-SMHR en réalisant les paramètres de validation suivants : détermination de la limite d'identification (LOI) et de l'effet matrice (34). *Will et al.* ont proposé des paramètres de validation pour les méthodes qualitatives utilisant

la CL-SMHR dont la sensibilité/spécificité, l'effet matrice, la limite d'identification (LOI), la stabilité et la contamination (35,36).

Le screening toxicologique étant une analyse de plus en plus présente dans les laboratoires de biologie médicale notamment hospitaliers et dans un but d'harmonisation des méthodes, la Société Française de Toxicologie Analytique (SFTA) et la Société Française de Biologie Clinique (SFBC) ont effectué un travail commun sur les recommandations d'accréditation du screening toxicologique selon la norme NF EN ISO 15189 (1).

1.2.3. Recommandations SFBC-SFTA

1.2.3.1. Phase pré-analytique

1.2.3.1.1. Echantillons

« La procédure de validation doit être réalisée à partir de toutes les matrices biologiques (ou non biologiques) soumises à analyse en routine au laboratoire. Des protocoles du type « équivalence » de matrices pourront être appliqués. » (1).

Pour valider la méthode, des solutions pures issues de matériaux de référence certifiés sont préconisées. Cependant, si le laboratoire ne peut disposer de ces dernières, des solutions obtenues, soit après pesée de poudres pures mises en solution dans un solvant adéquat, soit à partir de solution pharmaceutique pour préparation injectable peuvent être utilisées (1).

1.2.3.1.2. Renseignements cliniques

« Toutes les informations nécessaires à l'interprétation doivent être disponibles avec l'échantillon. Idéalement, pour une prestation de conseil adaptée, il est nécessaire de disposer des éléments suivants :

- Contexte clinique et symptomatologie ;
- Traitements médicamenteux éventuels ;
- Composés suspectés d'avoir été absorbés ;
- Administrations thérapeutiques après la prise en charge médicale ;
- Date et heure supposée de l'intoxication. » (1).

1.2.3.2. Phase analytique

1.2.3.2.1. Limite de détection

« La limite de détection pour chaque composé pourra être déterminée de différentes manières :

- en appliquant une procédure déjà accréditée pour des méthodes quantitatives ;
- au minimum sur 3 jours de test non consécutif, la valeur retenue correspondra à la plus petite concentration qui aura pu être systématiquement détectée. » (1).

Sur ce dernier point, la plus petite concentration correspondra à celle qui respecte l'ensemble des critères d'identification (cf. la partie traitements de données), correspondant à la LOI (34). Elle concernera au moins 50 composés distincts (médicaments et/ou produits stupéfiants) représentant d'au moins 5 familles thérapeutiques distinctes. Le niveau de la LOI sera adapté aux concentrations thérapeutiques ou toxiques établies consensuellement. Les classes chimiques ou pharmacologiques à privilégier sont les benzodiazépines, les antidépresseurs, les bêtabloquants, les antidiabétiques, les antiépileptiques, les antiarythmiques, les produits stupéfiants, les antalgiques, anesthésiques (1).

1.2.3.2.2. Contamination inter-échantillons

La recommandation est d'analyser « un échantillon blanc matrice suivi de trois échantillons dans la matrice contenant les composés à des concentrations significatives (au moins égales à vingt fois la LOI) puis de ré-analyser un échantillon blanc matrice en vérifiant l'absence de signal ou d'un signal inférieur à la LOI. » (1).

1.2.3.2.3. Contrôle interne de qualité (CIQ)

Le CIQ doit être réalisé à partir d'une matrice biologique et contenir un mélange de molécules « selon une périodicité adaptée à l'activité du laboratoire de manière à contrôler les performances analytiques de l'appareil analytique utilisé pour le screening. [...] Le CIQ doit comporter au minimum 10 composés :

- Représentants d'au moins cinq familles thérapeutiques différentes (et une présence recommandée des produits stupéfiants) ;
- dont les temps de rétention couvrent l'ensemble du chromatogramme ;
- à des concentrations faibles et plus élevés, en lien avec les concentrations thérapeutiques et/ou toxiques des composés ;
- dont la distribution du rapport masse/charge est large (classiquement entre 50 et 700) ;

- permettant de vérifier une analyse réalisée avec une ionisation en mode positif et/ou en mode négatif, simultanément ou non. » (1).

1.2.3.2.4. *Etalon interne*

« Au minimum, 2 étalons internes devront être ajoutés à l'échantillon. Le choix des EI se fera en fonction de leur nature (molécule exogène, non thérapeutiques) et encadrant le chromatogramme. » (1).

1.2.3.3. *Phase post-analytique*

« L'interprétation des résultats doit prendre en compte divers paramètres liés à la nature des composés comme l'instabilité *in vitro* ou leur métabolisme ou liés aux renseignements cliniques. Pour une demande de screening toxicologique qualitatif, un résultat pourra être rendu sous forme de « composé non détecté » ou « inférieure à la LOI » uniquement pour les composés pour lesquels une LOI a été déterminée. Pour les composés ne disposant pas de LOI, seule leur présence pourra être précisée sur le compte-rendu. Le laboratoire pourra mettre à disposition un document aux prescripteurs mentionnant les molécules dont la LOI aura été établie. » (1).

1.2.4. COFRAC – SH GTA 04

«Ce guide contient les recommandations reconnues par le Cofrac comme étant appropriées pour répondre aux exigences des normes NF EN ISO 15189, NF EN ISO 17025 et NF EN ISO 22870, ainsi qu'aux documents COFRAC SH REF 02 rev 06 et SH REF 08 rev 06 (37).

Ce document n'envisage que la phase analytique en termes de validation de méthode. Il permet l'élaboration d'une procédure de validation qui doit contenir :

- La présentation du processus analytique (étape, méthode, élément à valider) ;
- La maîtrise des risques ;
- La détermination des critères de performances (figure 1) ;
- La détermination des spécifications ou limites acceptables (objectifs à atteindre de ces critères) ;
- La vérification bibliographique ;
- Le plan d'expérience et mise en œuvre expérimentale dans le laboratoire
- La compilation et le traitement statistique des données obtenues ;
- La conclusion et la décision quant à la validation opérationnelle de la technique, au regard des spécifications (limites acceptables initialement fixées).

Le Cofrac met à disposition un document synthétisant cette validation de méthode, le SH FORM 43. (37).

Tableau 1 : Performances à évaluer lors d'une vérification/validation de méthode quantitative ou qualitative (SH GTA 04 rev 01).

CRITERES A EVALUER	Vérification (portée A)		Validation (portée B)	
	Méthode quantitative	Méthode qualitative	Méthode quantitative	Méthode qualitative
Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Essai	Essai	Essai	Essai
Justesse/exactitude (approche)	Essai	Essai	Essai	Essai
Incertitudes/facteurs de variabilité et évaluation	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité
Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire (appareil en miroir ⁹ , EBMD) et analyse des discordances ¹⁰	Essai	Essai	Essai	Essai
Intervalle de mesure (Limite de quantification et limites de linéarité)	Bibliographie	/	Essai	/
Interférences (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments, ...)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Robustesse	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Stabilité réactifs (après ouverture, embarqués)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
Intervalle de référence (valeurs usuelles)	Bibliographie (fournisseur ou autre, s'assurer de la cohérence avec l'état de l'art)	Bibliographie	Essai	Essai
Limite de détection	/	Bibliographie	/	Essai
Spécificité/sensibilité analytique	/	Bibliographie	/	Essai
Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude¹¹ de la méthode ou du système analytique.				

2. Travaux personnels

2.1. Objectifs

L'objectif de ce travail est de réaliser la validation d'une méthode de screening toxicologique dans le sang et l'urine par chromatographe liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution, pour répondre aux exigences réglementaires d'accréditation pour le laboratoire selon la norme NF EN ISO 15189. Les paramètres de validation de méthode et les molécules incluses ont été choisis en fonction des recommandations de la SFTA-SFBC et de l'appareillage utilisé. La réalisation des tests pour la validation de méthode a été effectuée dans les conditions de travail du laboratoire, selon la procédure établie concernant le pré-analytique, l'analytique et le post-analytique, et installée en routine hospitalière depuis 2020.

2.2. Matériel et méthode

2.2.1. Méthode de screening toxicologique

La méthode de screening toxicologique utilisée a été développée au sein du laboratoire de Toxicologie du CHU de Lille. L'identification de composés est basée sur une bibliothèque de référence adaptée à la méthode utilisée, comprenant le nom, la formule brute, le temps de rétention et les fragments spécifiques de chaque molécule (24). Cette bibliothèque comprend environ 1700 molécules (composés mères ou métabolites).

2.2.2. Échantillons

Les molécules intégrées dans la validation de méthode sont composées de principes actifs de spécialités pharmaceutiques qui peuvent être accompagnés d'un ou plusieurs métabolites. Ils sont disponibles sous forme de 6 panels fournisseurs et 1 panel « maison » de composés regroupés selon leur classe pharmacologique ou chimique (liste détaillée en Annexe 1). Chaque panel présente 2 niveaux de concentrations (niveau 1 et niveau 2) :

- Antiarythmiques, panel Mass Tox (Chromsystems), 25 molécules ;
- Antidépresseurs, panel Recipe (RECIPE Chemicals), 37 molécules ;
- Antidépresseurs tricycliques, panel Recipe (RECIPE Chemicals), 15 molécules ;
- Antiépileptiques, panel Mass Tox (Chromsystems), 29 molécules ;
- Benzodiazépines et ses apparentées, panel Recipe (RECIPE Chemicals), 35 molécules ;
- Neuroleptiques, panel Recipe (RECIPE Chemicals), 28 molécules ;

- Amphétamines et ses dérivés, Opiacés/Opioides et Cocaïne et ses métabolites (AOC), panel « maison » à base de standards sous forme de poudres (EUROMEDEX, LGC Standards), 20 molécules.

Ainsi, un total de 189 molécules a été testé à partir de ces 7 panels.

Les panels antidépresseurs, antidépresseurs tricycliques, antiépileptiques, benzodiazépines et neuroleptiques permettent la validation dans la matrice sérum. Les échantillons de sérum lyophilisé sont reconstitués par 1 mL d'eau distillée. Ensuite des aliquots de 200 µL ont été réalisés et conservés à -20 °C.

Le panel AOC est disponible sous forme d'une solution mère méthanolique de ces 3 familles pharmacologiques à une concentration de 1000 µg/L. Ce panel permet la validation dans les matrices sérum et l'urine. A partir de la solution mère, 5 mL de solutions filles à 2 niveaux de concentrations ont été constituées (niveau 1 à 50 µg/L et niveau 2 à 100 µg/L) à partir de blanc sérum fourni par l'Etablissement Français du Sang et des urines choisies par une absence de détection de molécules au screening toxicologique. Ensuite des aliquots de 200 µL ont été réalisés et conservés à -20 °C.

2.2.3. Pré-analytique

A 100 µL d'échantillon sont ajoutés 100 µL de solution méthanolique d'EI pour screening (méthylclonazépam à 1,25 mg/L et la bêta-hydroxyéthylthéophylline à 16 mg/L) et 400 µL d'acide sulfosalicylique 3% permettant la précipitation des protéines. La préparation est vortexée puis centrifugée à +4°C, à 14000 tour/min pendant 10 minutes. 200 µL de surnageant est transféré dans un vial. Le volume d'injection est fixé à 75 µL.

2.2.4. Appareillage

Ce travail a été réalisé à partir de la méthode décrite dans les travaux de Richeval C. (17).

2.2.4.1. Chromatographie

Ce procédé analytique est composé de deux étapes. Une première étape permettant l'extraction en phase solide (SPE) en mode online. Le mode online est défini par l'injection de l'échantillon dans la colonne chromatographique directement après l'extraction. Il est à distinguer avec une SPE en mode offline où une étape d'évaporation de l'échantillon est nécessaire avant l'analyse (38). Le but de la SPE est de « nettoyer l'échantillon » permettant de réduire l'effet matrice (39). La seconde

étape est une séparation chromatographique à proprement dite. Les colonnes analytiques sont thermostatées à 50°C et le temps d'analyse est de 18 minutes.

2.2.4.1.1. *Extraction en phase solide*

L'échantillon est injecté dans une colonne OASIS® (2,1 x 30 mm, 20 µm) (WATERS) éluée par un gradient de phase mobile composé d'eau avec un tampon ammoniacal à 0,2% (A2) et de méthanol (B2) (Tableau 2).

Tableau 2 : Gradient de PM appliqué pendant la SPE en mode ONLINE

Temps (min)	Débit (mL/min)	A2 (%)	B2 (%)
0,5	2,0	100	0
1,0	0,2	100	0
5,0	0,2	0	100
14,0	2,0	0	100
14,2	2,0	100	0
18,0	2,0	100	0

2.2.4.1.2. *Séparation chromatographique*

La séparation chromatographique est réalisée grâce à une colonne ACQUITY HSS C₁₈ (150 x 2 mm, 1,8 µm) (WATERS) éluée par un gradient de la phase mobile composé de tampon formiate d'ammonium à 5 mM pH 3 (A1) et d'acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique (B1) (Tableau 3).

Tableau 3 : Gradient de PM appliqué pendant la séparation chromatographique

Temps (min)	Débit (mL/min)	A1 (%)	B1 (%)
0,5	0,4	97	3
4,2	0,4	70	30
9,0	0,4	50	50
9,5	0,4	0	100
14,0	0,4	0	100
16,0	0,4	97	3
18,0	0,4	97	3

2.2.4.2. Paramètres de spectrométrie de masse

La détection est réalisée par un Xevo® G2-QTOF (WATERS). Les paramètres de la spectrométrie de masse sont les suivants : le mode d'ionisation est l'ESI+, la tension du cône est de 20 V, la température de la source est de 140 °C, la température de désolvatation est de 500 °C, le débit de gaz de désolvatation (azote) est de 900 L/h, le gaz de collision est l'argon.

L'acquisition des données est réalisée en mode MS^e par le logiciel Mass Lynx® (version 4.1). Les conditions sont les suivantes :

- Fonction 1 : la gamme de masse est de 100 à 1000 m/z sans énergie de collision (molécule sans la fragmentation) ; Le temps de balayage est de 0,2 seconde ;
- Fonction 2 : la gamme de masse est de 50 à 1000 m/z avec une rampe de collision de 10 à 40 eV (permet de former les fragments spécifiques de la molécule d'intérêt) ; Le temps de balayage est de 0,2 seconde ;
- Fonction 3 : Lock mass : la gamme de masse est de 50 à 1000 m/z ; Le temps de balayage est de 1,0 seconde.

2.2.5. Interprétation des résultats

Les données acquises sont comparées aux données de référence de la méthode, réunissant dans une bibliothèque les données de masse exacte, fragmentation, et temps de rétention pour chaque composé indexé dans la bibliothèque créée au sein du laboratoire. Ainsi, un composé est identifié lorsque les critères suivants sont réunis :

- Masse exacte mesurée (fonction 1) : +/- 0,01 Dalton (Da) masse exacte attendue ;
- Fragments (fonction 2) : +/- 0,01 Da masse exacte attendue ;
- Temps de rétention : +/- 0,35 minute temps de rétention attendue ;
- ASC : ≥ 1000 .

Ces critères d'identification sont nécessaires pour limiter les faux positifs (FP) ou les faux négatifs (FN). En effet, une fenêtre large de détection pour la masse exacte (40), le temps de rétention (20) et l'ASC accroît le nombre de FP. Tandis qu'une fenêtre de détection plus étroite accroît le nombre de FN.

Tableau 4 : Exemple de résultat obtenu avec le logiciel Mass Lynx®

Name	Trace	Found Mass	Error (mDa)	Pred.RT	RT	Area
Beta hydroxyethyl theophylline EI	225.0988	225.0990	0.3	3.43	3.51	111116
Methyl Clonazepam EI	330.0645	330.0652	0.7	9.10	9.24	62828

Légende : Trace : masse exacte théorique ; Found Mass : Mass exacte mesurée ; Error (mDa) = Found Mass – Trace ; Pred RT : Temps de rétention théorique ; RT : Temps de rétention mesuré ; Area : Aire sous la courbe.

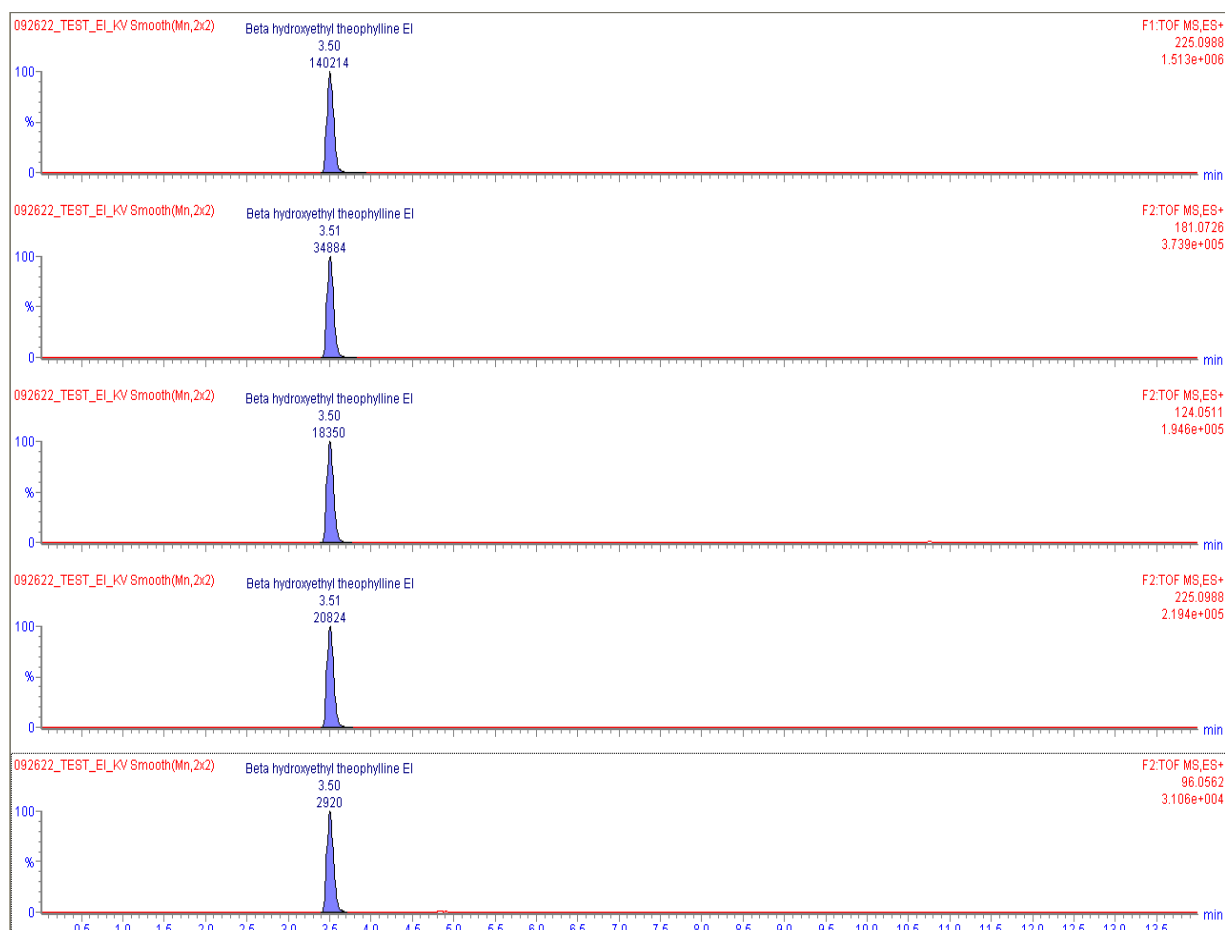


Figure 7 : Exemple d'un chromatogramme de la bêta-hydroxyéthylthéophylline (EI) extrait du logiciel Mass Lynx®

2.2.6. Protocole expérimental

La première partie de ce travail était de tester chaque panel à différents niveaux : un niveau 1 et niveau 2 ; et des dilutions au ¼ de niveau 1, au ½ de niveau 1 et au ½ de niveau 2. Cela a permis d'observer l'ASC de chaque molécule à différentes concentrations. La seconde étape a été de tester les différents paramètres de validation : la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la LOI. Lors de ces tests, un échantillon blanc (contenant uniquement du méthanol) est analysé avant le premier test et après le dernier test. Cela permet de constater une contamination en amont ou en aval de la séquence. Après chaque analyse, les résultats sont présentés sous la

forme d'un ratio : ASC de l'analyte / l'ASC du méthylclonazépam (EI). Cela a permis de s'affranchir de la variation des performances analytiques au cours du temps (30) notamment pour la fidélité intermédiaire et la LOI.

2.3. Résultats

Un total de 564 analyses a été réalisé (417 tests de panel et 147 blancs). Parmi les 189 molécules testées, 136 molécules ont respecté les critères d'identification (dont l'ASC supérieure à 1000) et ont pu être retenues dans la validation de méthode. 53 molécules n'ont pas été retenues, notamment en cas d'impossibilité de détecter ces composés par CL-SMHR, ou lorsque les critères d'identification décrits précédemment ne sont pas atteints (Annexe 4 et 5).

Tableau 5 : Molécules incluses par panel dans la validation de méthode avec leurs caractéristiques chromatographiques (temps de rétention) et physico-chimiques (masse exacte)

Panels	Rapport M/P	Gamme de temps de rétention (min)	Gamme de masse exacte (Da)
Antiarythmiques	19/25 (76%)	2,92 à 10,58	179,1310 à 645,0236
Antidépresseurs	29/37 (78%)	3,89 à 8,64	161,0065 à 469,2244
Antidépresseurs tricycliques	11/15 (73%)	6,51 à 8,74	263,1673 à 314,1549
Antiépileptiques	16/29 (55%)	3,49 à 8,00	159,1259 à 375,1326
Benzodiazépines et ses apparentées	22/35 (62%)	3,88 à 10,58	251,1058 à 387,1513
Neuroleptiques	20/28 (71%)	3,23 à 9,36	263,1685 à 447,1480
AOC	19/20 (95%)	2,28 à 8,10	135,1047 à 398,2205

Légende : Ratio : M/P avec M : nombre de molécules incluses dans la validation de méthodes et P nombre de molécules dans le panel

2.3.1. Fidélité

La fidélité d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures obtenues à partir de plusieurs prises d'essai d'un même échantillon dans les conditions de la procédure analytique. Elle est notamment caractérisée par :

- la répétabilité : résultats obtenus successivement dans des conditions identiques (permet d'évaluer le pré-analytique) ;
- la fidélité intermédiaire : résultats obtenus successivement dans des conditions différentes. Les paramètres variables peuvent être l'opérateur ou le temps. En

effet, pour cette validation de méthode, la fidélité intermédiaire a été déterminée sur des jours différents.

L'évaluation de ces paramètres a été effectuée sur un nombre d'échantillons $n = 5$ et sur les deux niveaux de concentrations des molécules testées (Annexe 1).

Le coefficient de variation (CV) exprimé en pourcentage a permis de qualifier ces paramètres. Un CV inférieure à 20% est le seuil d'acceptabilité (32).

$$CV (\%) = \frac{ET}{M} \times 100$$

Figure 8 : Calcul du CV

ET pour écart-type et M pour moyenne

2.3.2. Limite d'identification

Dans le cadre de cette validation, la plus petite valeur mesurande est une ASC à 1000 (critère d'identification). Pour évaluer ce paramètre, des dilutions ont été effectuées sur le niveau 1 de chaque panel (tableau 6). Chaque dilution a été effectué dans un blanc matrice (blanc sérum ou blanc urine). Les niveaux de dilution ont été choisis en fonction de la réponse analytique de chaque molécule au niveau 1 de concentration.

Tableau 6 : Dilutions effectuées en fonction du panel

Panel	Dilutions du niveau 1						
	1/100	1/50	1/20	1/10	1/5	1/4	1/2
Anti arythmiques							
Antidépresseurs							
Antidépresseurs tricycliques							
Antiépileptiques							
Benzodiazépines							
Neuroleptiques							
AOC							

Légende : Rouge : dilution non réalisée ; vert dilution réalisée

2.3.3. Tableaux de résultats

Ce tableau présente les résultats des paramètres de validation testés dans le sérum pour les panels anti arythmiques, antidépresseurs, antidépresseurs tricycliques, antiépileptiques, benzodiazépines, neuroleptiques et dans le sérum et l'urine pour le panel AOC.

Tableau 7 : Résumé des résultats de la validation de méthode

Anti arythmiques						
Molécules	Répétabilité		Fidélité intermédiaire		LOI : ASC > 1000	
	CV Niveau 1 (%)	CV Niveau 2 (%)	CV Niveau 1 (%)	CV Niveau 2 (%)	CV (%)	Concentration (µg/L)
Acebutolol (SECTRAL)	6,2	3,5	6,9	11,0	12,3	13,7
Amiodarone (CORDARONE)	15,9	13,1	26,5	30,3	26,5	672,0
Amiodarone-M (Desethyl)	13,8	19,4	18,8	19,2	18,8	766,0
Aprindine	6,0	4,3	7,6	8,4	18,7	7,8
Atenolol (TENORMINE)	5,6	6,2	17,6	21,3	13,7	35,7
Bisoprolol (DETENSIEL)	7,2	3,7	4,7	4,4	14,1	10,6
Disopyramide (RYTHMODAN)	6,3	7,0	18,1	21,9	20,3	24,4
Flecainide (FLECAINE)	7,3	4,1	5,9	7,4	17,9	17,9
Flunarizine (SIBELIUM)	8,1	9,7	6,1	5,2	6,1	274,0
Hydroquinidine (SERECOR)	10,3	4,7	7,3	14,0	19,6	58,3
Lidocaine (XYLOCAINE)	7,8	5,0	18,0	28,8	29,0	13,7
Metoprolol (LOPRESSOR)	7,5	5,5	10,3	17,2	15,1	16,9
Mexiletine (MEXILETINE)	7,9	3,7	8,9	9,6	20	26,5
Propafenone (RYTHMOL)	6,2	6,4	5,2	9,2	12,8	16,0
Propranolol (AVLOCARDYL)	6,2	5,0	2,7	6,6	20,6	11,4
Quinidine	6,4	3,8	10,9	16,5	10,3	42,1
Sotalol (SOTALLEX)	7,4	6,4	16,2	18,1	11,7	44,6
Verapamil (ISOPTINE)	6,1	4,9	3,5	6,4	13,4	11,3
Verapamil-M (N-desmethyl)	7,3	11,3	5,8	7,3	18,1	20,2

Antidépresseurs						
Molécules	Répétabilité		Fidélité intermédiaire		LOI : ASC > 1000	
	CV Niveau 1 (%)	CV Niveau 2 (%)	CV Niveau 1 (%)	CV Niveau 2 (%)	CV (%)	Concentration (µg/L)
Acide ritalinique	8,9	4,0	14,3	5,2	22,6	30,5
Agomelatine (VALDOXAN)	6,4	5,1	13,3	9,2	21,0	14,6
Bupropion (ZYBAN)	6,7	9,1	18,4	10,4	12,1	11,9
Hydroxybupropion-M (Hydroxy)	6,9	3,9	20,3	15,3	18,1	8,4
Citalopram (SEROPRAM)	6,5	5,2	15,2	9,2	13,0	4,9
Citalopram-M (Desmethyl)	6,5	4,3	15,1	9,7	12,8	5,3
Clomethiazole (HEMINEURINE 2004)	9,3	5,4	15,0	6,0	15,0	511,0
Dosulepine (PROTHIADEN)	5,1	2,2	12,2	8,5	16,6	8,9
Fluoxetine (PROZAC)	7,4	1,7	15,4	13,7	21,9	10,3
Fluoxetine-M (Desmethyl)	12,4	5,5	36,4	21,8	36,4	113,0
Fluvoxamine (FLOXYFRAL)	11,7	7,3	19,8	12,2	15,1	10,4
Methylphenidate (RITALINE)	8,7	7,5	17,2	7,4	15,8	5,2
Miansérine (ATHYMIL)	6,4	3,8	15,0	10,5	15,0	6,4
Miansérine-M (Desmethyl)	7,4	4,8	13,2	9,4	11,2	15,6
Milnacipran (IXEL)	6,8	5,0	19,7	15,5	15,5	3,5
Mirtazapine (NORSET)	9,8	4,0	13,9	6,7	11,7	7,3
Mirtazapine-M (Desmethyl)	7,8	4,5	16,5	8,2	11,8	7,1
Moclobemide (MOCLAMINE) N06A	6,4	4,1	13,8	8,8	10,3	9,5
Nefazodone	8,4	3,1	11,8	7,8	14,3	19,9
Opipramol	7,2	4,5	17,1	10,8	12,6	5,7
Paroxetine (DEROXAT)	11,0	6,5	14,4	8,7	2,5	21,2
Reboxetine (EDRONAX)	6,5	4,1	17,6	12,6	14,5	7,5
Tianeptine (STABLON)	6,3	4,2	14,2	10,1	4,5	16,4
Tramadol (TOPALGIC)	6,4	4,0	16,0	9,8	18,1	4,7
Tramadol-M (O-Desmethyl)	6,8	4,0	15,5	8,8	17,9	3,3

Trazodone	5,6	5,4	13,3	8,8	13,1	11,4
Venlafaxine (EFFEXOR)	6,7	3,9	14,9	8,8	12,9	3,5
Venlafaxine-M (O-desmethyl)	6,6	4,0	16,2	8,6	6,6	5,5
Vortioxetine (BRINTELLIX)	10,7	4,7	6,4	7,2	6,4	22,8
Antidépresseurs tricycliques						
Molécules	Répétabilité		Fidélité intermédiaire		LOI : ASC > 1000	
	CV Niveau 1 (%)	CV Niveau 2 (%)	CV Niveau 1 (%)	CV Niveau 2 (%)	CV (%)	Concentration (µg/L)
Amitriptyline (LAROXYL)	3,3	4,5	9	7,9	11	11,5
Amitriptyline-M (Nortriptyline)	4,2	6,4	9,3	9,3	9,3	67,1
Clomipramine (ANAFRANIL)	4,7	5	7,2	6,3	7,2	80,7
Clomipramine-M (N-Desmethyl)	3,7	4,3	10,1	7,6	10,1	78,4
Doxepine (QUITAXON)	3,1	5,3	14,4	7,1	14,4	50,0
Doxepine-M (Desmethyl)	5,6	5,6	14,3	7,4	14,3	54,9
Imipramine (TOFRANIL)	5	6,1	12	6,2	21,3	11,0
Imipramine-M (Desipramine [NORPRAMINE])	5	5,6	9,5	4	9,5	64,7
Maprotiline (LUDIOMIL)	5,2	8,4	9,6	6,9	9,6	84,4
Trimipramine (SURMONTIL)	1,6	6,8	13,1	5,4	17,6	22,4
Trimipramine-M (Desmethyl)	7,5	6,2	12,1	4,5	23,1	12,0
Antiépileptiques						
Molécules	Répétabilité		Fidélité intermédiaire		LOI : ASC > 1000	
	CV Niveau 1 (%)	CV Niveau 2 (%)	CV Niveau 1 (%)	CV Niveau 2 (%)	CV (%)	Concentration (µg/L)
10-OH-Carbamazépine	2,1	5,6	12,9	5,8	3,0	807,0
Carbamazépine (TEGRETOL)	2,0	3,9	10,8	6,4	19,4	31,0
Carbamazépine-10,11-époxyde	2,2	6,9	11,7	27,3	11,7	1110,0
Carbamazépine-Diol	2,3	7,0	12,0	4,9	12,0	913,0
Oxcarbazépine (TRILEPTAL)	2,0	6,6	10,4	6,5	14,9	48,4
Felbamate (TALOXIA)	2,8	6,3	13,4	7,7	28,9	2870,0

Lacosamide (VIMPAT)	3,5	6,3	14,3	6,6	12,4	182,0
Lamotrigine (LAMICTAL)	2,4	6,2	12,4	9,2	13,7	32,4
Levetiracetam (KEPPRA)	2,5	6,6	14,5	10,7	15,4	165,0
Rufinamide (INOVELON)	3,0	5,7	11,6	7,2	24,1	74,7
Gabapentine (NEURONTIN)	1,5	5,2	23,2	19,1	12,4	402,0
Pregabalin (LYRICA)	6,9	8,0	31,9	49,3	31,9	1250,0
Tiagabine (GABITRIL)	3,6	3,9	47,9	13,6	47,9	39,1
Phenytoine (DILANTIN)	2,6	7,7	10,9	4,8	13,7	6,0
Primidone-M (PEMA)	2,2	5,6	10,4	7,8	9,9	197,0
Brivaracetam (BRIVIACT)	2,2	5,1	12,7	8,6	8,6	793,0
Benzodiazépines						
Molécules	Répétabilité		Fidélité intermédiaire		LOI : ASC > 1000	
	CV Niveau 1 (%)	CV Niveau 2 (%)	CV Niveau 1 (%)	CV Niveau 2 (%)	CV (%)	Concentration (µg/L)
Alprazolam (XANAX)	-	8,9	-	16,0	16,0	53,2
Bromazepam (LEXOMIL)	-	10,1	-	19,5	19,5	322,0
Chlordiazepoxide (LIBRAX)	7	6,8	10,6	14,0	10,6	630,0
Clobazam (URBANYL)	6,7	5,3	15,3	16,3	15,3	95,7
Clobazam-M (Desmethyl)	5,7	14,4	20,7	16,8	20,7	827,0
Clonazepam-M (7-amino)	10,2	8,6	14,8	15,4	14,8	15,6
Diazepam (VALIUM)	3,7	13,7	10,7	12,3	10,7	312,0
Diazepam-M (Nor [NORDAZ])	7	4,7	15,2	12,8	15,2	226,0
Estazolam (NUCTALON)	8,2	7,3	17,6	12,9	17,6	130,0
Flunitrazepam (ROHYPNOL 2013)	-	5,1	-	6,1	6,1	50,9
Flunitrazepam-M (7-amino)	7,7	7,3	9,7	13,3	9,7	14,7
Flurazepam	6,3	7,2	11,4	11,9	11,4	47,6
Midazolam (HYPNOVEL)	8,3	6,2	6,5	13,5	6,5	32,5
Midazolam-m (alpha-OH)	5,7	8,4	17,9	17,9	17,9	57,3
Nitrazepam (MOGADON)	-	7,2	-	15,9	15,9	134,0

Nitrazepam-M (7-amino)	5,1	6,8	19,8	17,4	19,8	60,3
Oxazepam (SERESTA)	11,6	6,8	21,0	15,8	21,0	338,0
Prazepam (LYSANXIA)	8,8	9,4	21,7	8,2	21,7	264,0
Temazepam (NORMISON)	5,5	3,7	13,3	6,6	13,3	230,0
Tetrazeepam (MYOLASTAN)	4,7	7	14,7	7,7	14,7	133,0
Zaleplon	9,9	5,2	25,5	22,4	25,5	26,4
Zolpidem (STILNOX)	6,5	8	10,8	9,5	10,8	116,0
Neuroleptiques						
Molécules	Répétabilité		Fidélité intermédiaire		LOI : ASC > 1000	
	CV Niveau 1 (%)	CV Niveau 2 (%)	CV Niveau 1 (%)	CV Niveau 2 (%)	CV (%)	Concentration (µg/L)
Amisulpride (SOLIAN)	5,3	7,1	10,0	6,5	16,5	13,5
Aripiprazole (ABILIFY)	10,1	6,9	27,6	23,3	27,6	212
Chlorpromazine (LARGACTIL)	4,9	4,4	11,2	10,9	11,2	74,3
Chlorprothixene (CLOXAN)	4,8	3,3	11,4	11,2	11,4	72,9
Clozapine (LEPONEX)	4,8	6,6	9,4	7,1	22,3	23,5
Clozapine-M (Desmethyl)	6,2	6,1	12,3	10,6	22,2	36,8
Levomepromazine (NOZINAN)	7,3	4,8	7,3	5,6	23,5	26,05
Melperone (BURONIL)	5,2	6,6	7,8	8,3	16,4	8,22
Olanzapine (ZYPREXA)	6,2	6,7	11,8	6,2	13,8	14,95
Olanzapine-M (N-Desmethyl)	5,2	6,8	13,5	7,8	13,5	29,7
Paliperidone (INVEGA)	4,7	6,6	11,8	10,7	11,8	26,3
Perazine	9	5,2	11,7	8,8	12	18,9
Pipamperone (DIPIPERON)	5,3	6,5	14,0	8,5	16,2	25
Promethazine (PHENERGAN)	6,8	3,9	8,6	7,2	8,6	22,9
Prothipendyl (DOMINAL)	5,7	6,4	10,5	9,2	10,5	11,9
Quetiapine (XEROQUEL)	4,4	6,1	10,0	7,0	33,3	14,2
Quetiapine-m (Nor)	4,7	5,2	13,0	9,8	13	70,2
Risperidone (RISPERDAL)	5,5	6,5	10,9	9,6	12,8	12,9

Sulpiride (DOGMATIL)	4,3	5,3	11,8	6,9	13	11,25
Thioridazine	7,8	3,2	7,2	6,9	25,7	40,3
AOC - Sérum						
Molécules	Répétabilité		Fidélité intermédiaire		LOI : ASC > 1000	
	CV Niveau 1 (%)	CV Niveau 2 (%)	CV Niveau 1 (%)	CV Niveau 2 (%)	CV (%)	Concentration (µg/L)
Amphetamine	6,9	11,4	12,4	7,9	17,3	50
MDA	7,3	10,6	11,9	9,3	11,9	50
MDEA	11,5	10,7	13,4	11,2	18,1	5
MDMA	6,4	9,0	12,5	12,9	17,8	5
Methamphetamine	6,6	9,4	14,6	14,2	19,0	5
Ephedrine Pseudoephedrine (EPHEDRINE)	5,8	12,5	14,6	14,3	21,0	5
x-MMC (x-Methylmethcathinone)	5,0	11,4	14,2	13,7	17,2	5
Cocaine	10,7	10,4	13,3	14,1	14,4	10
Cocaine-M (Benzoylecgonine)	5,9	10,6	13,5	11,2	13,4	10
Cocaine-M (Cocaethylene)	8,6	11,5	9,2	13,3	15,9	10
Cocaine-M (Ecgonine methyl ester)	5,7	10,9	7,6	12,3	26,9	5
Codeine (NEOCODION)	7,0	14,5	12,1	12,6	21,8	10
Heroine-M (6-MAM)	7,7	11,7	14,0	10,4	13,9	25
Morphine	10,4	9,3	12,5	14,1	15,1	10
Oxycodone (OXYCONTIN)	7,6	12,2	11,0	9,2	12,6	10
Oxycodone-M (Nor)	6,8	12,7	11,0	6,3	11,0	50
Pholcodine (BIOCALYPTOL)	8,9	9,5	13,3	13,1	23,9	10
Methadone (METHADONE)	8,7	9,5	14,7	11,7	21,3	2,5
Methadone-M (EDDP)	8,0	10,3	13,4	9,8	12,9	5
AOC - Urine						
Molécules	Répétabilité		Fidélité intermédiaire		LOI : ASC > 1000	
	CV Niveau 1 (%)	CV Niveau 2 (%)	CV Niveau 1 (%)	CV Niveau 2 (%)	CV (%)	Concentration (µg/L)

Amphetamine	8,8	12,2	17,3	19,8	17,3	50
3,4-Méthylènedioxyamphétamine (MDA)	10,9	9,0	29,5	21,7	29,5	50
3,4-Méthylènedioxy-N-éthylamphétamine (MDEA)	6,2	9,8	15,4	15,8	15,4	50
3,4-Méthylènedioxyméthamphétamine (MDMA)	8,3	12,8	17,6	19,4	17,6	50
Methamphetamine	8,2	12,8	17,2	11,5	17,2	50
Ephedrine Pseudoephedrine (EPHEDRINE)	10,8	12,3	15,9	12,7	15,9	50
x-MMC (x-Methylmethcathinone)	7,5	10,7	15,4	16,8	15,4	50
Cocaine	5,6	7,8	12,6	18,8	12,6	50
Cocaine-M (Benzoylecgonine)	4,9	11,1	13,5	20,3	13,5	50
Cocaine-M (Cocaethylene)	6,2	6,4	11,6	11,3	11,6	50
Cocaine-M (Ecgonine methyl ester)	12,2	3,9	22,9	27,2	22,9	50
Codeine (NEOCODION)	10,4	12,2	14,3	9,5	14,3	50
Heroine-M (6-MAM)	11,3	11,1	14,2	10,2	14,2	50
Morphine	8,9	7,6	15,9	10,1	15,9	50
Oxycodone (OXYCONTIN)	8,9	12,9	11,4	8,7	11,4	50
Oxycodone-M (Nor)	8,5	11,9	12,9	9,2	12,9	50
Pholcodine (BIOCALYPTOL)	7,9	4,6	21,4	16,4	21,4	50
Methadone (METHADONE)	5,1	4,4	12,2	13,9	12,2	50
Methadone-M (EDDP)	4,6	7,1	11,9	11,7	11,9	50

Légende : M : métabolite

Le tableau 8 représente la proportion de molécules respectant les critères de validation de la répétabilité, de la fidélité intermédiaire et de la LOI exprimées par le CV (%).

Tableau 8 : Proportion des molécules respectant les paramètres de validation de méthode

Panels	Répétabilité				Fidélité intermédiaire				LOI : ASC > 1000	
	CV < 20%				CV < 20%				CV < 20%	
	Niveau 1		Niveau 2		Niveau 1		Niveau 2			
Anti arythmiques	19	100%	19	100%	18	95%	15	79%	14	74%
Antidépresseurs	29	100%	29	100%	27	93%	28	97%	26	90%
Antidépresseurs tricycliques	11	100%	11	100%	11	100%	11	100%	9	82%
Antiépileptiques	16	100%	16	100%	13	81%	14	88%	12	75%
Benzodiazépines et ses apparentées	18	100%	22	100%	14	78%	21	95%	18	82%
Neuroleptiques	20	100%	20	100%	19	95%	19	95%	14	70%
AOC sérum	19	100%	19	100%	19	100%	19	100%	14	74%
AOC urine	19	100%	19	100%	16	84%	16	84%	16	84%
Total	151	100%	155	100%	137	88%	143	92 %	123	79%

3. Discussion

La validation de méthode du screening toxicologique par CL-HRMS est complexe, de par son processus analytique mais également par le nombre de molécules aux concentrations et aux caractéristiques physico-chimiques différentes pouvant être détectées.

3.1. Paramètres de validation testés

3.1.1. Fidélité

Les effectifs totaux des composés inclus dans l'étude de la fidélité sont respectivement de 151 pour le niveau 1 et de 155 pour le niveau 2 (Tableau 8). La différence observée est expliquée par 4 molécules (alprazolam, bromazépan, flunitrazépan et nitrazépan) pour lesquelles l'aire sous la courbe était supérieure à 1000 uniquement à la plus haute concentration (niveau 2). La répétabilité est validée au seuil de 20% pour l'ensemble des molécules testées et pour les 2 niveaux. Cela démontre une étape pré-analytique maîtrisée.

La fidélité intermédiaire est validée pour 88% des molécules testées pour le niveau 1 et pour 92% des molécules testées pour le niveau 2 au seuil de 20%. Les résultats pour la totalité des molécules des panels antidépresseurs tricycliques et du panel AOC sérum étaient inférieurs à cette limite. Pour les autres panels, des CV allant jusqu'à 47,9% (Tiagabine) pour 14 molécules pour le niveau 1 et allant jusqu'à 49,3% (Prégabaline) pour 12 molécules peuvent s'expliquer par des valeurs du ratio ASC molécule / ASC EI faibles, donnant des écart-type plus élevé. Le screening toxicologique est une méthode qualitative dont l'identification repose sur des critères dont l'un est l'ASC > 1000. Une valeur pouvant varier de plus ou moins de 40% n'aura pas d'impact sur le résultat qualitatif si elle est éloignée de la LOI. Cependant, le risque sera de ne pas détecter les valeurs proches de la LOI.

Pour conclure, la répétabilité et la fidélité intermédiaire testées sur 5 échantillons pour deux niveaux de concentrations a montré les bonnes performances de la méthode en termes de fidélité. Pour quelques composés répartis dans différents panels, les résultats de fidélité intermédiaire ont montré une variabilité des performances analytiques au cours du temps (41).

3.1.2. Limite d'identification

Les LOI ont été établies sur au moins 3 jours non consécutifs (1) et au maximum sur 5 échantillons. La LOI a pu être fixée pour 123 molécules (Tableau 8).

Pour 121 molécules, le screening toxicologique est capable de détecter des concentrations potentiellement toxiques (Annexe 2) (42). Seules les LOI du bromazépam et flunitrazépam sont supérieures aux concentrations potentiellement toxiques. Cependant, pour le panel des benzodiazépines, les dilutions pour estimer les LOI les plus proches du seuil de l'ASC à 1000 sont toujours en cours de test (Tableau 7). Les LOI ont donc été fixées aux valeurs mesurées les plus basses c'est-à-dire le niveau 2 pour l'alprazolam, le bromazépam, le nitrazépam et le flunitrazépam, et le niveau 1 pour le reste du panel. Le panel AOC urinaire n'a également pas encore été testé après dilution, la LOI est donc fixée à la concentration du niveau 1, soit 50 µg/L. Par comparaison à la LOI des méthodes immunochimiques utilisées au laboratoire de toxicologie du CHU de Lille, la LOI par méthode CL-SMHR est plus basse (Annexe 3). Le screening toxicologique peut intervenir comme une analyse complémentaire à la recherche en de toxique en immunoanalyse en cas i) de vrai positif : confirmation et identification de la molécule ; ii) faux positif : réactions croisées ; iii) faux négatif : concentration de la molécule en dessous de seuil de détection en immunoanalyse (43,44).

3.2. Limites

Le screening toxicologique par CL-SMHR au CHU de Lille est une analyse de routine réalisée en continu (24h/24). La première difficulté était la disponibilité de l'analyseur pour passer l'ensemble des échantillons. L'analyse complète d'un échantillon est composée d'une phase pré-analytique rapide, d'une phase analytique de 18 minutes par échantillon, et d'une phase post-analytique de traitement des données demandant du temps étant donné que les panels contiennent entre 15 molécules pour les antidépresseurs tricycliques et 37 molécules pour les antidépresseurs (Tableau 5).

De plus, l'appareil a connu un problème analytique, la résolution chromatographique (séparation des pics chromatographique) n'était plus optimale et a nécessité un changement de colonne chromatographique. Ce problème s'est installé progressivement et a impacté les résultats pour la détermination des LOI des molécules pour l'ensemble des panels. Ainsi pour certains échantillons analysés, les résultats ont dû être retirés des données de validation. Une LOI a pu être établie à partir des dilutions lorsque 3 mesures ont pu être effectuées sur 3 jours consécutifs.

Pour finir, plusieurs pannes techniques avec arrêt d'activité ont également entravé le bon déroulement de la validation de méthode.

Le choix des molécules à valider s'est porté sur plusieurs paramètres : les critères d'identification, la présence dans la base de données de spectre de fragmentation, et la disponibilité des panels au laboratoire.

Les molécules n'ayant pas été intégrés dans la validation de méthode selon ces paramètres sont compilés dans l'annexe 4 et l'annexe 5.

Les panels contiennent de nombreuses molécules, augmentant le risque de coélution des molécules. La coélution se définit comme un ou plusieurs composés étant élués en même temps. Durant les tests, une coélution a été constatée entre la protriptyline et N-desmethylnaprotilline ne permettant pas leur intégration dans la validation de méthode des composés (Figure 9). Ce sont des molécules partageant la même masse exacte, mais les temps de rétention sont différents (temps de rétention protriptyline : 7,48 minutes ; N-desméthylmaprotilline : 7,56 minutes). Dans cette figure, la résolution chromatographique n'est pas suffisante pour séparer ces 2 molécules.

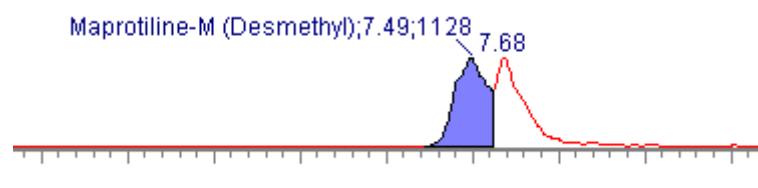


Figure 9 : Chromatogramme représentant la coélution entre la protriptyline et la N-desmethylnaprotilline

Le pic intégré (en bleu) à 7,49 minutes représente à la fois la protriptyline et la N-desmethylnaprotilline ; Le pic non intégré (en blanc) à 7,69 minutes correspond à la protriptyline

La méthode de CL-SMHR contient 2 EI (le méthylclonazépam : temps de rétention = 9,10 minutes ; la bêta-hydroxyéthylthéophylline : temps de rétention = 3,41 minutes). L'EI choisi pour calculer le rapport ASC de l'analyte / l'ASC de EI devrait être celui au temps de rétention de plus proche de l'analyte d'intérêt. Bien qu'ayant des masses exactes différentes, une coélution de la bêta-hydroxyéthylthéophylline et du lévétiracétam a été observé, se traduisant par une baisse de l'intensité du signal de cet EI pouvant être expliquée par un effet de suppression d'ion. Puisque le méthylclonazépam n'a coélué avec aucune des molécules testées, il a été décidé d'utiliser cet EI pour le calcul de l'ensemble des rapports ASC de l'analyte / l'ASC de EI.

3.3. Perspectives

Le processus de validation de la méthode est toujours en cours. Les paramètres restant à tester sont la contamination, la stabilité, l'effet matrice, la sensibilité et la spécificité.

La contamination sera évaluée par le passage d'un blanc matrice, puis de 3 échantillons de la molécule d'intérêt à forte concentration suivi du passage d'un blanc matrice. L'objectif est de vérifier que la molécule d'intérêt n'est pas détectée dans les blancs matrices. Une autre possibilité est de s'adapter aux méthodes quantitatives. La concentration de la molécules d'intérêt dans les blancs matrices ne doit pas dépasser la limite inférieure de quantification de 20% (30). Pour notre méthode de screening, l'ASC ne doit pas dépasser 20% de la LOI, c'est-à-dire 1200.

La stabilité sera évaluée en fonction des conditions de conservation des échantillons du laboratoire. Dans le service de toxicologie du CHU de Lille, les prélèvements sont conservés 14 jours après leur arrivée à +4°C. Le protocole expérimental sera de tester l'ensemble des panels à 2 niveaux de concentration. Les tests se feront à J0 (juste après la constitution des échantillons) et à J14.

L'effet matrice peut être évalué par la méthode décrite par *Matuszewski & al.* qui consiste à calculer le rapport entre l'ASC de la molécule d'intérêt dans la matrice (molécule ajouté après l'extraction du blanc matrice) sur l'ASC de la solution pure en molécule d'intérêt (Figure 10) (45). Un effectif de 5 échantillons sera testé pour chaque molécule.

Cependant, notre analyse comprend une phase d'extraction en phase solide en mode online, il est difficile d'injecter la molécule après l'extraction de la matrice par la colonne SPE. L'EMA recommande pour les techniques analytiques utilisant une extraction ONLINE de passer chaque matrice à des niveaux de concentration en molécule d'intérêt bas et haut (équivalent du niveau 1 et du niveau 2 utilisés dans ce travail). Le calcul du CV à partir du ratio ASC de l'analyte / ASC de l'EI devra être inférieure à 15% pour valider ce paramètre (30).

$$ME (\%) = B / A \times 100$$

Figure 10 : Formule de l'effet matrice (ME) d'après Matuszewski & al. (45)

*Légende : B : Molécule d'intérêt ajouté dans le blanc matrice après l'extraction
A : Solution pure de la molécule d'intérêt*

Une approche de l'estimation de la sensibilité et de la spécificité a été réalisée dans le cadre d'une validation de méthode de 40 molécules par LC-MS/MS par *Camirand Lemyre & al.* consistant à réaliser de part et d'autres d'une valeur seuil la mesure 15 échantillons dont la concentration est à 0,5 fois la valeur seuil et 15 échantillons dont la valeur est 1,5 fois la valeur seuil permettant de déterminer respectivement les faux positifs et les vrai négatifs ; les vrais positifs et les faux négatifs (41,46). Pour l'adapter en CL-HRMS, la valeur seuil pourrait correspondre à une valeur proche de la LOI de la molécule (ASC inférieure à 5000) pour s'assurer de détecter les échantillons dont la concentration est égale à 0,5 fois la valeur seuil.

Seul le panel AOC a pu être testé dans le sérum et l'urine. Les autres panels ont été testés uniquement dans le sérum. Pour tester ces molécules dans l'urine, l'approche consiste à reconstituer ces panels dans un échantillon d'urine exempt de xénobiotiques (blanc urine). Les molécules proviendront de solutions pures de matériaux de référence certifiés ou de poudres pures mis en solution. Les niveaux de concentration choisis se feront en fonction de la LOI, également des niveaux de concentration 1 et 2 dans le sérum utilisé pour ce travail et de la détermination de la contamination.

Après avoir testé l'ensemble des paramètres, des CIQ seront établis pour permettre « la vérification de la maîtrise du processus analytique lors de la mesure d'échantillons biologiques de patients » (47). Cela permet une validation continue de la méthode. Ce CIQ sera composé d'au moins 10 molécules (respectant l'ensemble des paramètres de validation réalisés lors de la validation de méthode) aux propriétés pharmacologiques et physico-chimiques différentes qui permettra de couvrir l'ensemble du chromatogramme, une gamme de m/z large (1). Les concentrations des molécules se situeront proche de la LOI pour détecter toute baisse de sensibilité de l'appareil. Les EI (bêta-hydroxyéthylthéophylline et méthylclonazépam) seront intégrés au CIQ.

Cette validation de méthode concerne uniquement des molécules contenues dans des panels fournisseurs. La bibliothèque de spectre de fragmentation du screening toxicologique de Lille contient environ 1700 molécules. A l'avenir, il sera intéressant d'intégrer dans la validation de méthode certaines molécules qui n'ont pas été testées, mais qui peuvent présenter un intérêt important dans des contextes d'intoxications (tel que la Metformine).

4. Conclusion

L'analyse de screening toxicologique évolue constamment à l'aide d'appareil toujours plus sensible et tend à se démocratiser en devenant plus accessible pour les laboratoires de biologie médicale par une baisse des prix des appareils et une interprétation des données simplifiés (48). Le screening toxicologique par CL-SMHR est de plus en plus prescrit par les services cliniques. Au cours de l'année 2021, 2225 demandes de screening toxicologiques ont été effectuées au laboratoire de Toxicologie, soit environ 6 demandes chaque jour. C'est une analyse qui va s'installer durablement au laboratoire. Le travail effectué a permis d'évaluer la fidélité de la méthode, et d'établir des limites d'identifications pour 123 molécules. Ces dernières étaient inférieures aux concentrations considérées comme toxiques pour 121 molécules ce qui permet de pouvoir détecter ces composés dans le cadre d'une intoxication. C'est une méthode répétable mais dont les performances varient au cours du temps. Suite à cette étude, des paramètres de validation complémentaires, notamment pour tester la contamination, la stabilité et l'effet matrice seront testés. Ils seront utilisés pour réaliser la demande d'accréditation du screening toxicologique, désigné par le laboratoire comme examen représentatif de sa ligne de portée.

Bibliographie

1. Guitton J, Gaulier JM, Citterio-Quentin A, Abé E, Allibé N, Bartoli M, et al. Accréditation du criblage toxicologique : recommandations du groupe SFBC — SFTA. *Toxicol Anal Clin*. 1 mars 2019;31(1):12-7.
2. Villa A, Cochet A, Guyodo G. Les intoxications signalées aux centres antipoison français en 2006. *Intox Signalées Aux Cent Antipoison Fr En 2006*. 2008;58(8):825-31.
3. Compagnon P, Danel V, Goullé JP. Place des analyses toxicologiques. *Réanimation*. oct 2006;15(5):370-3.
4. Szymanowicz A, Capolaghi B, Bartoli M, Berny C, Danel V, Delahaye A, et al. Recommandations pour la prescription, la réalisation et l'interprétation des examens de biologie médicale dans le cadre des intoxications graves. *Ann Toxicol Anal*. 2012;24(4):193-208.
5. Le référentiel des actes innovants hors nomenclature de biologie et d'anatomopathologie (RIHN) - Ministère de la Santé et de la Prévention [Internet]. [cité 25 sept 2022]. Disponible sur: <https://solidarites-sante.gouv.fr/systeme-de-sante-et-medico-social/innovation-et-recherche/rihn>
6. Melanson SEF. The Utility of Immunoassays for Urine Drug Testing. *Clin Lab Med*. 1 sept 2012;32(3):429-47.
7. Sundström M, Pelander A, Ojanperä I. 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*. 2015;7(5):420-7.
8. Becam J, Paolantonacci M, Pourriere-Fabiani C, Lacarelle B, Solas C, Fabresse N. Évaluation d'une méthode de criblage toxicologique en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. *Toxicol Anal Clin*. 1 déc 2021;33(4):288-301.
9. Elliott SP, Hale KA. Applications of an HPLC-DAD Drug-Screening System Based on Retention Indices and UV Spectra. *J Anal Toxicol*. 1 juill 1998;22(4):279-89.
10. Viette V, Hochstrasser D, Fathi M. LC-MS (/MS) in clinical toxicology screening methods. *Chimia*. 2012;66(5):339-42.

11. 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.* 12 mars 2012;2012:e282574.
12. Royal Society of Chemistry. High-resolution mass spectrometry [Internet]. [cité 3 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.rsc.org/publishing/journals/prospect/ontology.asp?id=CMO:0000498&MSID=b101859k>
13. Allen DR, McWhinney BC. Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications. *Clin Biochem Rev.* août 2019;40(3):135-46.
14. Mogollón NGS, Quiroz-Moreno CD, Prata PS, de Almeida JR, Cevallos AS, Torres-Guérrez R, et al. New Advances in Toxicological Forensic Analysis Using Mass Spectrometry Techniques. *J Anal Methods Chem.* 29 août 2018;2018:e4142527.
15. Balogh MP. Debating resolution and mass accuracy. *LC-GC N Am.* 1 févr 2004;22(2):118-26.
16. Saint-Lary L. Metabolomics for the authentication of natural extracts used in flavour and fragrances. 10 juin 2015;
17. Richeval C. Développement d'outils analytiques de mise en évidence de biomarqueurs d'une exposition aux nouvelles substances psychoactives (NPS): approches in vivo, in silico, in vitro [Internet] [Thèse de doctorat]. [2018-2021, France]: Université de Lille; 2018 [cité 4 oct 2022]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2018LILUS024/document>
18. Zarrouk E, Lenski M, Bruno C, Thibert V, Contreras P, Privat K, et al. High-resolution mass spectrometry: Theoretical and technological aspects. *Toxicol Anal Clin.* 1 janv 2022;34(1, Supplement):3-18.
19. Rosano TG, Wood M, Ihenetu K, Swift TA. Drug Screening in Medical Examiner Casework by High-Resolution Mass Spectrometry (UPLC–MSE-TOF). *J Anal Toxicol.* 1 oct 2013;37(8):580-93.
20. Chindarkar NS, Wakefield MR, Stone JA, Fitzgerald RL. Liquid Chromatography High-Resolution TOF Analysis: Investigation of MSE for Broad-Spectrum Drug Screening. *Clin Chem.* 1 août 2014;60(8):1115-25.

21. Olsen JV, Godoy LMF de, Li G, Macek B, Mortensen P, Pesch R, et al. Parts per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer via Lock Mass Injection into a C-trap. *Mol Cell Proteomics*. 1 déc 2005;4(12):2010-21.
22. Brochu F, Plante PL, Drouin A, Gagnon D, Richard D, Durocher F, et al. Mass spectra alignment using virtual lock-masses. *Sci Rep*. 11 juin 2019;9(1):8469.
23. Colby JM, Thoren KL, Lynch KL. Suspect Screening Using LC–QqTOF Is a Useful Tool for Detecting Drugs in Biological Samples. *J Anal Toxicol*. 1 mai 2018;42(4):207-13.
24. Humbert L, Richeval C. Analyse toxicologique avec mesure par « masse exacte ». Caractérisation de métabolites urinaires par couplage UPLC/QTOF : apports et intérêts dans le cadre de la soumission chimique. *Ann Toxicol Anal*. 2012;24(2):87-96.
25. Article L6221-1 - Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 10 oct 2022]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000042012463/2020-06-19
26. Arrêté du 16 juillet 2020 définissant le cadre de l'accréditation mentionnée à l'article L. 6221-1 du code de la santé publique.
27. Procédure d'accréditation des laboratoires de biologie médicale - Ministère de la Santé et de la Prévention [Internet]. [cité 10 oct 2022]. Disponible sur: <https://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/qualite-des-soins-et-pratiques/biologie-medicale/article/procedure-d-accreditation-des-laboratoires-de-biologie-medicale>
28. Document Cofrac, SH INF 50. Portées-types d'accréditation. Révision 07 - Janvier 2020. [Internet]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-INF-50>
29. Document Cofrac, SH REF 08. Expression et évaluation des portées d'accréditation. Révision 06 - Décembre 2019. [Internet]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-REF-08>
30. EMA. Bioanalytical method validation [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cité 5 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>

31. AAFS Standards Board 2019. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. Am Acad Forensic Sci [Internet]. 13 sept 2021; Disponible sur: <https://www.aafs.org/asb-standard/standard-practices-method-validation-forensic-toxicology>
32. Scientific Working Group for Forensic Toxicology. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. J Anal Toxicol. sept 2013;37(7):452-74.
33. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. Forensic Sci Int. 17 janv 2007;165(2):216-24.
34. Pedersen AJ, Dalsgaard PW, Rode AJ, Rasmussen BS, Müller IB, Johansen SS, et al. Screening for illicit and medicinal drugs in whole blood using fully automated SPE and ultra-high-performance liquid chromatography with TOF-MS with data-independent acquisition. J Sep Sci. 2013;36(13):2081-9.
35. Wille S, Peters F, Di Fazio V, Samyn N. Practical aspects concerning validation and quality control for forensic and clinical bioanalytical quantitative methods. Accreditation Qual Assur. 1 juin 2011;16:279-92.
36. Wille SMR, Coucke W, De Baere T, Peters FT. Update of Standard Practices for New Method Validation in Forensic Toxicology. Curr Pharm Des. 2017;23(36):5442-54.
37. Document Cofrac, SH GTA 04. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/ validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. Révision 01 - Avril 2015. [Internet]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
38. Charnot A, Gouveia D, Ayciriex S, Lemoine J, Armengaud J, Almunia C, et al. On-Line Solid Phase Extraction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method for Multiplexed Proteins Quantitation in an Ecotoxicology Test Specie: Gammarus fossarum. J Appl Bioanal. juill 2018;4(3):81-101.
39. Diamanti K, Aalizadeh R, Alygizakis N, Galani A, Mardal M, Thomaidis NS. Wide-scope target and suspect screening methodologies to investigate the occurrence of new psychoactive substances in influent wastewater from Athens. Sci Total Environ. 1 oct 2019;685:1058-65.

40. Ojanperä I, Pelander A, Laks S, Gergov M, Vuori E, Witt M. Application of accurate mass measurement to urine drug screening. *J Anal Toxicol.* févr 2005;29(1):34-40.
41. Camirand Lemyre F, Desharnais B, Laquerre J, Morel MA, Côté C, Mireault P, et al. Qualitative threshold method validation and uncertainty evaluation: A theoretical framework and application to a 40 analytes liquid chromatography–tandem mass spectrometry method. *Drug Test Anal.* 2020;12(9):1287-97.
42. Schulz M, Schmoldt A, Andresen-Streichert H, Iwersen-Bergmann S. Revisited: Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 1100 drugs and other xenobiotics. *Crit Care Lond Engl.* 6 mai 2020;24(1):195.
43. Nieddu M, Baralla E, Pasciu V, Rimoli MG, Boatto G. Cross-reactivity of commercial immunoassays for screening of new amphetamine designer drugs. A review. *J Pharm Biomed Anal.* 5 sept 2022;218:114868.
44. Marin SJ, Doyle K, Chang A, Concheiro-Guisan M, Huestis MA, Johnson-Davis KL. One Hundred False-Positive Amphetamine Specimens Characterized by Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol.* févr 2016;40(1):37-42.
45. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem.* 1 juill 2003;75(13):3019-30.
46. Desharnais B, Lajoie MJ, Laquerre J, Mireault P, Skinner CD. A threshold LC-MS/MS method for 92 analytes in oral fluid collected with the Quantisal® device. *Forensic Sci Int.* déc 2020;317:110506.
47. Document Cofrac, SH GTA 06. Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale. Révision 00 - Avril 2011. [Internet]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-06>
48. Maurer HH, Meyer MR. High-resolution mass spectrometry in toxicology: current status and future perspectives. *Arch Toxicol.* 1 sept 2016;90(9):2161-72.
49. Cheng T, Zhao Y, Li X, Lin F, Xu Y, Zhang X, et al. Computation of Octanol–Water Partition Coefficients by Guiding an Additive Model with Knowledge. *J Chem Inf Model.* 1 nov 2007;47(6):2140-8.

Annexes

Annexe 1 : Tableau des molécules intégrées à la validation de méthode et de leurs caractéristiques :	57
Annexe 2 : Tableau comparant les LOI mesuré sur le TOF et les LOQ mesuré sur le TQD.....	63
Annexe 3 : Tableau comparant la LOI mesuré et la LOD et le seuil de positivité en immunoanalyse dans le panel AOC urine	69
Annexe 4 : Tableau des molécules absentes de la base de données du laboratoire	70
Annexe 5 : Tableau des molécules ne respectant pas les critères d'identification ...	71

Annexe 1 : Tableau des molécules intégrées à la validation de méthode et de leurs caractéristiques :

- physico-chimiques : formule brute, masse exacte en Da, estimation de leur coefficient de partage : XLogP3 (49) ;
- chromatographiques : temps de rétention en minute ;
- biologiques : concentration des zones usuelles et des zones toxiques en µg/L.

Anti arythmiques								
Molécules	Formule brute	Masse exacte (Da)	XLogP3	Temps de rétention (min)	Zone usuelle (µg/L) (42)	Zone toxique (µg/L) (42)	Niveau 1 (µg/L)	Niveau2 (µg/L)
Acebutolol (SECTRAL)	C18H28N2O4	336,2049	1,7	4,83	200 - 2000	-	357,0	1702,0
Amiodarone (CORDARONE)	C25H29I2NO3	645,0237	7,6	10,58	500 - 2500	2500	672,0	2266,0
Amiodarone-M (Desethyl)	C23H25I2NO3	616,9924	6,7	10,45	-	-	766,0	2840,0
Aprindine	C22H30N2	322,2409	5,2	8,70	1000 - 2000	2000 - 3000	784,0	2108,0
Atenolol (TENORMINE)	C14H22N2O3	266,1630	0,2	2,92	10 - 100	200-300	270,0	1688,0
Bisoprolol (DETENSIEL)	C18H31NO4	325,2253	1,9	5,86	10 - 100	200	17,6	83,4
Disopyramide (RYTHMODAN)	C21H29N3O	339,2311	3,2	5,10	2000-7000	8000	2441,0	6812,0
Flecainide (FLECAINE)	C17H20F6N2O3	414,1378	3,8	7,00	200 - 1000	1000	274,0	1053,0
Flunarizine (SIBELIUM)	C26H26F2N2	404,2064	6,0	10,20	25 - 200	300	40,1	173,0
Hydroquinidine (SERECOR)	C20H26N2O2	326,1994	3,1	4,91			1166,0	8699,0
Lidocaine (XYLOCAINE)	C14H22N2O	234,1732	2,3	4,51	500 - 5000	6000 - 7000	1369,0	5040,0
Metoprolol (LOPRESSOR)	C15H25NO3	267,1834	1,9	4,81	35 - 500	650	70,5	492,0
Mexiletine (MEXILETINE)	C11H17NO	179,1310	2,1	5,14	500 - 2000	1500 - 2000	265,0	1657,0
Propafenone (RYTHMOL)	C21H27NO3	341,1991	3,3	7,66	300-2000	1100	320,0	2505,0
Propranolol (AVLOCARDYL)	C16H21NO2	259,1572	3,0	6,04	20 - 300	1000	47,4	266,0
Quinidine	C20H24N2O2	324,1838	2,9	4,66	2000 - 5000	8000 - 10000	841,0	5393,0
Sotalol (SOTALEX)	C12H20N2O3S	272,1195	0,2	3,08	500 - 3000	7500 - 16000	892,0	4253,0

Verapamil (ISOPTINE)	C27H38N2O4	454,2832	3,8	7,88	20 - 250	800	113,0	647,0
Verapamil-M (N-desmethyl)	C26H36N2O4	440,2675	3,3	7,80	-	-	84,5	365,0
Antidépresseurs								
Molécules	Formule brute	Masse exacte (Da)	XLogP3	Temps de rétention (min)	Zone usuelle (µg/L) (42)	Zone toxique (µg/L) (42)	Niveau 1 (µg/L)	Niveau 2 (µg/L)
Acide ritalinique	C13H17NO2	219,1259	-2,4	4,29	-	-	60,9	145,0
Agomelatine (VALDOXAN)	C15H17NO2	243,1259	2,7	8,38	7 - 300	600	29,2	305,0
Bupropion (ZYBAN)	C13H18CINO	319,0339	3,2	5,60	550 - 1000	2000	23,7	53,1
Bupropion-M (Hydroxy)	C13H18CINO2	255,1026	2,2	4,89	-	-		
Citalopram (SEROPRAM)	C20H21FN2O	324,1638	3,2	6,65	50 - 110	220	48,6	114,0
Citalopram-M (Desmethyl)	C19H19FN2O	310,1481	2,8	6,19	-	-	52,5	124,0
Clomethiazole (HEMINEURINE 2004)	C6H8CINS	161,0066	2,1	6,72	100 - 5000	2800 - 15000	511,0	3115,0
Dosulepine (PROTHIADEN)	C19H21NS	295,1395	4,5	7,31	45 - 100	200	44,6	104,0
Fluoxetine (PROZAC)	C17H18F3NO	309,1340	4,0	8,31	120 - 500	1000	103,0	244,0
Fluoxetine-M (Desmethyl)	C16H16F3NO	295,1184	3,5	8,06			113,0	265,0
Fluvoxamine (FLOXYFRAL)	C15H21F3N2O2	318,1555	2,6	7,78	60 - 230	500	104,0	244,0
Methylphenidate (RITALINE)	C14H19NO2	233,1416	0,2	5,00	13 - 23	44	10,3	21,9
Miansérine (ATHYMIL)	C18H20N2	264,1626	3,4	6,59	15 - 70	140	32,1	76,7
Miansérine-M (Desmethyl)	C17H18N2	250,1470	2,9	6,46	-	-	31,1	69,3
Milnacipran (IXEL)	C15H22N2O	246,1732	1,4	5,63	100 - 150	300	69,1	160,0
Mirtazapine (NORSET)	C17H19N3	265,1579	3,3	4,97	30 - 80	160	36,3	86,0
Mirtazapine-M (Desmethyl)	C16H17N3	251,1422	2,8	4,76	-	-	35,5	82,3
Moclobemide (MOCLAMINE)	C13H17CIN2O2	268,0979	1,5	4,46	300 - 1000	2000	477,0	1102,0
Nefazodone	C25H32CIN5O2	469,2245	4,3	8,40	30 - 2500	5500	99,7	228,0
Opipramol	C23H29N3O	363,2311	3,6	6,63	50 - 500	1000	114,0	266,0
Paroxetine (DEROXAT)	C19H20FNO3	329,1427	3,5	7,23	20 - 65	120	42,3	98,4
Reboxetine (EDRONAX)	C19H23NO3	313,1678	3,0	6,65	60 - 350	700	150,0	353,0
Tianeptine (STABLON)	C21H25CIN2O4S	436,1224	1,2	6,90	30 - 80	160	32,8	77,7

Tramadol (TOPALGIC)	C16H25NO2	263,1885	2,6	4,92	100 - 300	1000	233,0	529,0
Tramadol-M (O-Desmethyl)	C15H23NO2	249,1729	2,3	3,89	100-300	1000	167,0	382,0
Trazodone	C19H22CIN5O	371,1513	2,8	5,55	700-1000	1200	572,0	1310,0
Venlafaxine (EFFEXOR)	C17H27NO2	277,2042	2,9	5,72	100 -400	800	70,2	167,0
Venlafaxine-M (O-desmethyl)	C16H25NO2	263,1885	2,6	4,49			109,0	253,0
Vortioxetine (BRINTELLIX)	C18H22N2S	298,1504	4,2	8,64	10 - 40	80	22,8	50,4
Antidépresseurs Tricycliques								
Molécules	Formule brute	Masse exacte (Da)	XLogP3	Temps de rétention (min)	Zone usuelle (µg/L) (42)	Zone toxique (µg/L) (42)	Niveau 1 (µg/L)	Niveau2 (µg/L)
Amitriptyline (LAROXYL)	C20H23N	277,1830	5,0	7,95	80-200 (Amitriptyline + Nortriptyline)	300	57,4	137,0
Amitriptyline-M (Nortriptyline)	C19H21N	263,1674	4,5	7,76	70 - 170		67,1	161,0
Clomipramine (ANAFRANIL)	C19H23CIN2	314,1550	5,2	8,74	230 - 450	450	80,7	192,0
Clomipramine-M (N-Desmethyl)	C18H21CIN2	300,1393	4,7	8,52			78,4	189,0
Doxepine (QUITAXON)	C19H21NO	279,1623	4,3	6,87	50-150	300	50,0	119,0
Doxepine-M (Desmethyl)	C18H19NO	265,1467	3,8	6,51			54,9	133,0
Imipramine (TOFRANIL)	C19H24N2	280,1939	4,8	7,65	175-300 (Imipramine + Desipramine)	300	55,2	135,0
Imipramine-M (Desipramine [NORPRAMINE])	C18H22N2	266,1783	4,9	7,46	100-300		64,7	159,0
Maprotiline (LUDIOMIL)	C20H23N	277,1830	4,6	7,82	75 - 130	220	84,4	203,0
Trimipramine (SURMONTIL)	C20H26N2	294,2096	5,8	8,20	150-300	600	112,0	266,0
Trimipramine-M (Desmethyl)	C19H24N2	280,1939	5,3	8,18	-	-	60,1	151,0
Antiépileptiques								
Molécules	Formule brute	Masse Exacte (Da)	XLogP3	Temps de rétention (min)	Zone usuelles (µg/L)	Zone toxique (µg/L)	Niveau 1 (µg/L)	Niveau2 (µg/L)
Licarbazépine (10-OH-Carbazépine)	C15H14N2O2	254,1055	1,4	5,53	10000 - 35000	70000	8070	32900
Carbamazépine (TEGRETOL)	C15H12N2O	236,0950	2,5	7,32	4000 - 12000	20000	3100	10800
Carbamazépine-10,11-époxyde	C15H12N2O2	252,0899	1,3	5,87	500 - 6000	-	1110	6820
Carbamazépine-Diol	C15H14N2O3	270,1004	0,3	5,10	-	-	913	8820

Oxcarbazepine (TRILEPTAL)	C15H12N2O2	252,0899	1,7	6,24	600 - 13000	35000	484	2880
Felbamate (TALOXIA)	C11H14N2O4	238,0954	0,6	5,00	30000 - 80000	100000	28700	101000
Lacosamide (VIMPAT)	C13H18N2O3	250,1317	0,3	5,10	1000 - 10000	20000	1820	8230
Lamotrigine (LAMICTAL)	C9H7Cl2N5	255,0079	1,4	4,69	3000 - 14000	20000	3240	12900
Levetiracetam (KEPPRA)	C8H14N2O2	170,1055	-0,3	3,49	12000 - 45000	50000	16500	67700
Rufinamide (INOVELON)	C10H8N4OF2	238,0666	0,7	5,33	5000 - 30000	40000	7470	24200
Gabapentine (NEURONTIN)	C9H17NO2	171,1259	-1,1	3,66	2000 - 20000	25000	4020	19500
Pregabalin (LYRICA)	C8H17NO2	159,1259	-1,6	3,69	2000 - 5000	10000	1250	9450
Tiagabine (GABITRIL)	C20H25NO2S2	375,1327	2,7	8,00	20 - 200	300	39,1	184
Phenytoine (DILANTIN)	C12H14N2O2	218,1055	0,9	4,86	5000 - 12000	25000	5050	13800
Primidone-M (PEMA)	C11H14N2O2	206,1055	0,1	4,24	-	-	1970	7740
Brivaracetam (BRIVIACT)	C11H20N2O2	212,1525	1,0	5,82	500 - 900	1800	793	3760
Benzodiazépines								
Molécules	Formule brute	Masse exacte (Da)	XLogP3	Temps de rétention (min)	Zone usuelle (µg/L) (42)	Zone toxique (µg/L) (42)	Niveau 1 (µg/L)	Niveau2 (µg/L)
Alprazolam (XANAX)	C17H13ClN4	308,0829	2,1	8,20	5 - 50	100	15,7	53,2
Bromazepam (LEXOMIL)	C14H10BrN3O	315,0007	1,7	6,80	50-200	300	95,3	322,0
Chlordiazepoxide (LIBRAX)	C16H14ClN3O	299,0825	2,4	6,09	400-3000	3500	630,0	1962,0
Clobazam (URBANYL)	C16H13ClN2O2	300,0666	2,1	8,99	30-300	500	95,7	300,0
Clobazam-M (Desmethyl)	C15H11ClN2O2	286,0509	1,9	7,98	300-3000	5000	827,0	2883,0
Clonazepam-M (7-amino)	C15H12ClN3O	285,0669	1,8	4,91	-	-	15,6	52,4
Diazepam (VALIUM)	C16H13ClN2O	284,0716	3,0	9,95	100 - 2000	3000	312,0	991,0
Diazepam-M (Nor [NORDAZ])	C15H11ClN2O	270,0560	2,9	8,64	120 - 800	1500	226,0	736,0
Estazolam (NUCTALON)	C16H11ClN4	294,0672	1,7	7,83	55 -200	-	130,0	444,0
Flunitrazepam (ROHYPNOL)	C16H12FN3O3	313,0863	2,1	8,55	5 - 15	50	15,2	50,9
Flunitrazepam-M (7-amino)	C16H14FN3O	283,1121	1,3	5,33	-	-	14,7	47,9
Flurazepam	C21H23ClFN3O	387,1514	3,0	6,67	75 - 165	330	47,6	160,0
Midazolam (HYPNOVEL)	C18H13ClFN3	325,0782	2,5	6,61	40 - 100	1000	32,5	87,8

Midazolam-M (alpha-OH)	C18H13ClFN3O	341,0731	2,7	6,73	-	-	57,3	189,0
Nitrazepam (MOGADON)	C15H11N3O3	281,0800	2,2	7,73	30 - 100	200	40,6	134,0
Nitrazepam-M (7-amino)	C15H13N3O	251,1059	1,0	3,88	-	-	60,3	200,0
Oxazepam (SERESTA)	C15H11ClN2O2	286,0509	2,2	7,82	200 - 1500	2000	338,0	1182,0
Prazepam (LYSANXIA)	C19H17ClN2O	324,1029	3,6	10,58	120 - 800	1500	264,0	851,0
Temazepam (NORMISON)	C16H13ClN2O2	300,0666	2,2	8,93	20 - 150	1000	230,0	611,0
Tetrazepam (MYOLASTAN)	C16H17ClN2O	288,1029	3,2	10,38	50 - 600	-	133,0	452,0
Zaleplon	C17H15N5O	305,1277	1,0	6,80	20 - 40	200	26,4	86,8
Zolpidem (STILNOX)	C19H21N3O	307,1685	2,5	5,50	80 - 160	320	116,0	409,0
Neuroleptiques								
Molécules	Formule brute	Masse exacte (Da)	XLogP3	Temps de rétention (min)	Zone usuelle (µg/L) (42)	Zone toxique (µg/L) (42)	Niveau 1 (µg/L)	Niveau2 (µg/L)
Amisulpride (SOLIAN)	C17H27N3O4S	369,1722	1,5	4,28	100 - 400	640	135,0	317,0
Aripiprazole (ABILIFY)	C23H27Cl2N3O2	447,1480	4,6	8,20	100-350 ; 150-500 (Aripiprazole + métabolite)	1000	212,0	488,0
Chlorpromazine (LARGACTIL)	C17H19ClN2S	318,0957	5,2	8,40	30 - 100	600	74,3	172,0
Chlorprothixene (CLOXAN)	C18H18ClNS	315,0848	5,2	8,59	20 - 300	400	72,9	170,0
Clozapine (LEPONEX)	C18H19ClN4	326,1298	3,1	6,28	350 - 600	1000	235,0	551,0
Clozapine-M (Desmethyl)	C17H17ClN4	312,1142	2,6	5,82	-	-	184,0	424,0
Levomepromazine (NOZINAN)	C19H24N2OS	328,1609	4,7	7,93	5 - 25	320	52,1	122,0
Melperone (BURONIL)	C16H22FNO	263,1685	3,3	5,50	30 - 100	200	41,1	93,4
Olanzapine (ZYPREXA)	C17H20N4S	312,1409	2,9	3,74	20 - 80	100	29,9	70,2
Olanzapine-M (N-Desmethyl)	C16H18N4S	298,1252	2,4	3,61	6 - 24	-	29,7	68,5
Paliperidone (INVEGA)	C23H27FN4O3	426,2067	2,2	5,38	20 - 60	120	26,3	61,7
Perazine	C20H25N3S	339,1769	4,1	7,54	100 - 230	460	94,5	217,0
Pipamperone (DIPIPERON)	C21H30FN3O2	375,2322	2,0	4,64	100 - 400	500	125,0	288,0
Promethazine (PHENERGAN)	C17H20N2S	284,1347	4,8	7,13	10 - 50	100	22,9	51,7
Prothipendyl (DOMINAL)	C16H19N3S	285,1300	3,4	6,68	30 - 80	500	11,9	28,1

Quetiapine (XEROQUEL)	C21H25N3O2S	383,1667	2,1	6,50	100 - 500	1000	142,0	322,0
Quetiapine-M (Nor)	C17H17N3S	295,1143	2,5	6,38	100-250	1000	70,2	168,0
Risperidone (RISPERDAL)	C23H27FN4O2	410,2118	2,7	5,67	20 - 60 (Rispéridone + Hydroxyrispéridone)	120	25,8	59,9
Sulpiride (DOGMATIL)	C15H23N3O4S	341,1409	0,6	3,23	50 - 400	1000	225,0	529,0
Thioridazine	C21H26N2S2	370,1537	5,9	9,36	100 - 200	400	80,6	194,0
AOC								
Molécules	Formule brute	Masse exacte (Da)	XLogP3	Temps de rétention (min)	Zone usuelle (µg/L) (42)	Zone toxique (µg/L) (42)	Niveau 1 (µg/L)	Niveau2 (µg/L)
Amphétamine	C9H13N	135,1048	1,8	3,82	20 - 100	200	50,0	100,0
3,4-Méthylènedioxyamphétamine (MDA)	C10H13NO2	179,0946	1,6	3,83	< 400	1500	50,0	100,0
3,4-Méthylènedioxy-N- éthylamphétamine (MDEA)	C12H17NO2	207,1259	2,5	4,46	< 200	-	50,0	100,0
3,4-Méthylènedioxyméthamphétamine (MDMA)	C11H15NO2	193,1103	2,2	3,96	100 - 350	-	50,0	100,0
Méthamphétamine	C10H15N	149,1204	2,1	4,15	< 100	200	50,0	100,0
Ephedrine Pseudoephedrine (EPHEDRINE)	C10H15NO	165,1154	0,9	3,53	20 - 200	1000	50,0	100,0
x-MMC (x-Methylmethcathinone)	C11H15NO	177,1154	2,0	4,36	-	-	50,0	100,0
Cocaine	C17H21NO4	303,1471	2,3	5,25	50 - 300	500	50,0	100,0
Cocaine-M (Benzoylécgonine)	C16H19NO4	289,1314	-0,3	4,34	< 100	-	50,0	100,0
Cocaine-M (Cocaéthylène)	C18H23NO4	317,1627	2,7	5,87	-	-	50,0	100,0
Cocaine-M (Ecgonine méthyl ester)	C10H17NO3	199,1208	0,6	2,28	-	-	50,0	100,0
Codeine (NEOCODION)	C18H21NO3	299,1521	1,1	3,53	30 - 250	500	50,0	100,0
Heroïne-M (6-MAM)	C19H21NO4	327,1471	1,3	3,79	-	-	50,0	100,0
Morphine	C17H19NO3	285,1365	0,8	2,74	10 - 100	100	50,0	100,0
Oxycodone (OXYCONTIN)	C18H21NO4	315,1471	1,2	3,79	5 - 100	200	50,0	100,0
Oxycodone-M (Nor)	C17H19NO4	301,1314	0,7	3,71	-	-	50,0	100,0
Pholcodine (BIOCALYPTOL)	C23H30N2O4	398,2206	0,8	2,37	20 - 80	100	50,0	100,0
Methadone (METHADONE)	C21H27NO	309,2093	3,9	8,10	50 - 600	600	50,0	100,0
Methadone-M (EDDP)	C20H23N	277,1830	5,2	7,18	-	-	50,0	100,0

Annexe 2 : Tableau comparant les LOI mesuré sur le TOF et les LOQ mesuré sur le TQD

LOQ = Limite de quantification ; TQD = Chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse en tandem, Appareil utilisé pour les dosages de routine pour les panels suivants : anti arythmiques, antidépresseurs, antidépresseurs tricycliques, antiépileptiques, benzodiazépines, neuroleptiques.

Anti arythmiques				
Molécules	LOI (TOF)	LOQ (TQD)	Zone usuelle (µg/L)	Zone toxique (µg/L)
	Concentration (µg/L)			
Acebutolol (SECTRAL)	13,7	-	200 - 2000	-
Amiodarone (CORDARONE)	672	-	500 - 2500	2500
Amiodarone-M (Desethyl)	766	-	-	-
Aprindine	7,8	-	1000 - 2000	2000 - 3000
Atenolol (TENORMINE)	35,7	-	10 - 100	200-300
Bisoprolol (DETENSIEL)	10,6	-	10 - 100	200
Disopyramide (RYTHMODAN)	24,4	-	2000-7000	8000
Flecainide (FLECAINE)	17,9	-	200 - 1000	1000
Flunarizine (SIBELIUM)	274	-	25 - 200	300
Hydroquinidine (SERECOR)	58,3	-		
Lidocaine (XYLOCAINE)	13,7	-	500 - 5000	6000 - 7000
Metoprolol (LOPRESSOR)	16,9	-	35 - 500	650
Mexiletine (MEXILETINE)	26,5	-	500 - 2000	1500 - 2000
Propafenone (RYTHMOL)	16	-	300-2000	1100
Propranolol (AVLOCARDYL)	11,4	-	20 - 300	1000
Quinidine	42,1	-	2000 - 5000	8000 - 10000
Sotalol (SOTALEX)	44,6	-	500 - 3000	7500 - 16000

Verapamil (ISOPTINE)	11,3	-	20 - 250	800
Verapamil-M (N-desmethyl)	20,2	-	-	-
Antidépresseurs				
Molécules	LOI (TOF)	LOQ (TQD)	Zone usuelle (µg/L)	Zone toxique (µg/L)
	Concentration (µg/L)			
Acide ritalinique	30,5	-	-	-
Agomelatine (VALDOXAN)	14,6	-	7 - 300	600
Bupropion (ZYBAN)	11,9	-	550 - 1000	2000
Hydroxybupropion-M (Hydroxy)	8,4	-	-	-
Citalopram (SEROPRAM)	4,9	8	50 - 110	220
Citalopram-M (Desmethyl)	5,3	9	-	-
Clomethiazole (HEMINEURINE)	511	-	100 - 5000	2800 - 15000
Dosulepine (PROTHIADEN)	8,9	-	45 - 100	200
Fluoxetine (PROZAC)	10,3	30	120 - 500	1000
Fluoxetine-M (Desmethyl)	113	40		
Fluvoxamine (FLOXYFRAL)	10,4	16	60 - 230	500
Methylphenidate (RITALINE)	5,2	-	13 - 23	44
Miansérine (ATHYMIL)	6,4	5	15 - 70	140
Miansérine-M (Desmethyl)	15,6	15	-	-
Milnacipran (IXEL)	3,5	-	100 - 150	300
Mirtazapine (NORSET)	7,3	6	30 - 80	160
Mirtazapine-M (Desmethyl)	7,1	7	-	-
Moclobemide (MOCLAMINE)	9,5	-	300 - 1000	2000
Nefazodone	19,9	-	30 - 2500	5500
Opipramol	5,7	-	50 - 500	1000
Paroxetine (DEROXAT)	21,2	8	20 - 65	120
Reboxetine (EDRONAX)	7,5	-	60 - 350	700

Tianeptine (STABLON)	16,4	-	30 - 80	160
Tramadol (TOPALGIC)	4,7	20	100 - 300	1000
Tramadol-M (O-Desmethyl)	3,3	10	100-300	1000
Trazodone	11,4	-	700-1000	1200
Venlafaxine (EFFEXOR)	3,5	10	100 -400	800
Venlafaxine-M (O-desmethyl)	5,5	15		
Vortioxetine (BRINTELLIX)	22,8	-	10,0 - 40	80
Antidépresseurs tricycliques				
Molécules	LOI (TOF)	LOQ (TQD)	Zone usuelle (µg/L)	Zone toxique (µg/L)
	Concentration (µg/L)			
Amitriptyline (LAROXYL)	11,5	8,2	80-200 (Amitriptyline + Nortriptyline)	300
Amitriptyline-M (Nortriptyline)	67,1	9	70 - 170	
Clomipramine (ANAFRANIL)	80,7	9,2	230 - 450	450
Clomipramine-M (N-Desmethyl)	78,4	10,6		
Doxepine (QUITAXON)	50	7,4	50-150	300
Doxepine-M (Desmethyl)	54,9	-		
Imipramine (TOFRANIL)	11	8,3	175-300 (Imipramine + Desipramine)	300
Imipramine-M (Desipramine [NORPRAMINE])	64,7	9,1	100-300	
Maprotiline (LUDIOMIL)	84,4	12,1	75 - 130	220
Trimipramine (SURMONTIL)	22,4	13,6	150-300	600
Trimipramine-M (Desmethyl)	12	-	-	-
Antiépileptiques				
Molécules	LOI (TOF)	LOD (TQD)	Zone usuelle (µg/L)	Zone toxique (µg/L)
	Concentration (µg/L)			
Licarbazépine (10-OH-Carbazépine)	807	744	10000 - 35000	70000
Carbamazépine (TEGRETOL)	31	483	4000 - 12000	20000
Carbamazépine-10,11-époxyde	1110	50	500 - 6000	-

Carbamazépine-Diol	913	-	-	-
Oxcarbazepine (TRILEPTAL)	48,4	37,5	600 - 13000	35000
Felbamate (TALOXIA)	2870	4200	30000 - 80000	100000
Lacosamide (VIMPAT)	182	150	1000 - 10000	20000
Lamotrigine (LAMICTAL)	32,4	441	3000 - 14000	20000
Levetiracetam (KEPPRA)	165	1362	12000 - 45000	50000
Rufinamide (INOVELON)	74,7	840	5000 - 30000	40000
Gabapentine (NEURONTIN)	402	750	2000 - 20000	25000
Pregabalin (LYRICA)	1250	160	2000 - 5000	10000
Tiagabine (GABITRIL)	39,1	-	20 - 200	300
Phénytoïne (DILANTIN)	6	1120		
Primidone-M (PEMA)	197	-	-	-
Brivaracetam (BRIVIACT)	793	-	500 - 900	1800
Benzodiazépines				
Molécules	LOI (TOF)	LOD (TQD)	Zone usuelle (µg/L)	Zone toxique (µg/L)
	Concentration (µg/L)			
Alprazolam (XANAX)	53,2	-	mai-50	100
Bromazepam (LEXOMIL)	322	-	50-200	300
Chlordiazepoxide (LIBRAX)	630	-	400-3000	3500
Clobazam (URBANYL)	95,7	-	30-300	500
Clobazam-M (Desmethyl)	827	-	300-3000	5000
Clonazepam-M (7-amino)	15,6	-	-	-
Diazepam (VALIUM)	312	-	100 - 2000	3000
Diazepam-M (Nor [NORDAZ])	226	-	120 - 800	1500
Estazolam (NUCTALON)	130	-	55 -200	-
Flunitrazepam (ROHYPNOL)	50,9	-	5,0 - 15	50
Flunitrazepam-M (7-amino)	14,7	-	-	-

Flurazepam	47,6	-	75 - 165	330
Midazolam (HYPNOVEL)	32,5	5	40 - 100	1000
Midazolam-m (alpha-OH)	57,3	5	-	-
Nitrazepam (MOGADON)	134	-	30 -100	200
Nitrazepam-M (7-amino)	60,3	-	-	-
Oxazepam (SERESTA)	338	-	200 -1500	2000
Prazepam (LYSANXIA)	264	-	120 - 800	1500
Temazepam (NORMISON)	230	-	20 - 150	1000
Tetrazepam (MYOLASTAN)	133	-	50 - 600	-
Zaleplon	26,4	-	20 - 40	200
Zolpidem (STILNOX)	116	-	80 - 160	320
Neuroleptiques				
Molécules	LOI (TOF)	LOD (TQD)	Zone usuelle (µg/L)	Zone toxique (µg/L)
	Concentration (µg/L)			
Amisulpride (SOLIAN)	13,5	15	100 - 400	640
Aripiprazole (ABILIFY)	212	25	100-350 ; 150-500 (Aripiprazole + métabolite)	1000
Chlorpromazine (LARGACTIL)	74,3	-	30 - 100	600
Chlorprothixene (CLOXAN)	72,9	-	20 - 300	400
Clozapine (LEPONEX)	23,5	25	350 - 600	1000
Clozapine-M (Desmethyl)	36,8	20	-	-
Levomepromazine (NOZINAN)	26,05	-	5,0 - 25	320
Melperone (BURONIL)	8,22		30 - 100	200
Olanzapine (ZYPREXA)	14,95	3	20 - 80	100
Olanzapine-M (N-Desmethyl)	29,7	-	6,0 - 24	-
Paliperidone (INVEGA)	26,3	-	20 - 60	120
Perazine	18,9	-	100 - 230	460
Pipamperone (DIPIPERON)	25	-	100 - 400	500

Promethazine (PHENERGAN)	22,9	-	oct-50	100
Prothipendyl (DOMINAL)	11,9	-	30 - 80	500
Quetiapine (XEROQUEL)	14,2	-	100 - 500	1000
Quetiapine-m (Nor)	70,2	-	100-250	1000
Risperidone (RISPERDAL)	12,9	3	20 - 60 (Rispéridone + Hydroxyrispéridone)	120
Sulpiride (DOGMATIL)	11,25	3	50 - 400	1000
Thioridazine	40,3	-	100 - 200	400

Annexe 3 : Tableau comparant la LOI mesuré et la LOD et le seuil de positivité en immunoanalyse dans le panel AOC urine

AOC - Urine			
Molécules	LOI (TOF)	LOD (immunochimie)	Seuil de positivité (immunochimie)
	Concentration (µg/L)		
Amphétamine	50	47	1000
3,4-Méthylènedioxyamphétamine (MDA)	50		
3,4-Méthylènedioxy-N- éthylamphétamine (MDEA)	50		
3,4-Méthylènedioxyméthamphétamine (MDMA)	50		
Méthamphetamine	50		
Ephedrine Pseudoephedrine (EPHEDRINE)	50	-	-
x-MMC (x-Méthylmethcathinone)	50	-	-
Cocaine	50	13	300
Cocaine-M (Benzoylcgonine)	50		
Cocaine-M (Cocaethylene)	50	-	-
Cocaine-M (Ecgonine methyl ester)	50	13	300
Codeine (NEOCODION)	50	21,6	300
Heroïne-M (6-MAM)	50	1,1	10
Morphine	50	21,6	300
Oxycodone (OXYCONTIN)	50	-	-
Oxycodone-M (Nor)	50	-	-
Pholcodine (BIOCALYPTOL)	50	21,6	300
Méthadone (METHADONE)	50	17,8	300
Méthadone-M (EDDP)	50	6,3	100

Annexe 4 : Tableau des molécules absentes de la base de données du laboratoire

Panel	Molécule
Anti arythmique	Tocainide
	Gallopamil
	Dronédarone
	Debutyldronédarone
Antidépresseurs	Atomoxétine
	Dihydrobupropion
	Guanfacine
	Tranlycypromine
Antiépileptiques	Théophylline
	N-desmethylnesuximide
	Stiripentol
	Ethosuximide
	Phenobarbital
	Acide valproïque
	Sultiame
	Pérampanel

Annexe 5 : Tableau des molécules ne respectant pas les critères d'identification

Panel	Molécules
Anti arythmique	Diltiazem
Antidépresseurs	Sertraline
	Desmethylsertraline
	Dosulépine
	Zonisamide
	Desmethylsertraline
	Dosulépine
Antiépileptiques	Zonisamide
Benzodiazépines	3-hydroxybromazépam
	Hydroxyalprazolam
	hydroxytriazolam
	Clonazépam
	Desalkylflurazépam
	Desmethylflurazépam
	Triazolam
	Zopiclone
Neuroleptiques	Dehydro aripiprazole
	Flupentixol
	Fluphénazine
	Halopéridol
	Sertindole
AOC	Dihydrocodéine

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2021/2022

Nom : Grenier
Prénom : Corentin

Titre de la thèse : Validation d'une méthode de screening toxicologique dans le sang et l'urine par spectrométrie de masse haute résolution en vue de son accréditation.

Mots-clés : screening toxicologique, CL-SMHR, sérum, urine, accréditation, LOI

Résumé : Le screening toxicologique est une analyse permettant l'identification d'au moins 200 molécules distinctes à partir d'un échantillon biologique par une méthode de chromatographie. Sa prescription entre dans le cadre des intoxications médicamenteuses ou pour écarter toute étiologie toxique. Au laboratoire de toxicologie du CHU de Lille, la technique analytique utilisée est la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution. La SFTA et la SFBC ont établi des recommandations pour accréditer les méthodes de screening toxicologique selon la norme NF EN ISO 15189. L'objectif de ce travail est la validation de la méthode de screening toxicologique dans le sang et l'urine selon ces recommandations. La répétabilité, la fidélité intermédiaire et la détermination de la LOI ont été réalisés sur 155 molécules divisées en 7 panels (7 dans le sérum et 1 dans l'urine). Les résultats ont permis de valider les performances de la méthode en termes de fidélité, et d'établir 123 LOI dont 121 sont inférieures aux concentrations toxiques. Ces résultats seront complétés par des paramètres de validation complémentaires, notamment pour tester la contamination, la stabilité et l'effet matrice. Ils seront utilisés pour réaliser la demande d'accréditation du screening toxicologique, désigné par le laboratoire comme examen représentatif de sa ligne de portée.

Membres du jury :

Président :

Pr Delphine Allorge, PU-PH, Faculté de Pharmacie - Université de Lille

Directeur, conseiller de thèse :

Dr Marie Lenski, AHU, Faculté de Pharmacie - Université de Lille

Assesseurs :

Pr Annabelle Dupont, PU-PH, Faculté de Pharmacie - Université de Lille

Dr Jean-Michel Gaulier, PH, UF de Toxicologie, Pôle de Biologie Pathologie Génétique
– CHU Lille