

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DE SANTE
DEPARTEMENT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2024

THESE 2024/TOU3/2102

THESE D'EXERCICE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PHASE D'APPROFONDISSEMENT

Interne en BIOLOGIE MEDICALE

Présentée et soutenue publiquement
par

Guillaume LABARTHE

Développement et validation de méthode du dosage de
cannabinoïdes en GC-MS/MS au laboratoire sur différentes
matrices : focus sur la matrice capillaire

Le 18 octobre 2024

Directeur de thèse : Thomas LANOT

JURY

Président : Peggy GANDIA, Professeur
1er assesseur : Thomas LANOT, Docteur
2ème assesseur : Michel LAVIT, Docteur
3ème assesseur : Isabelle CLAUDET, Professeur

PERSONNEL ENSEIGNANT
du Département des Sciences Pharmaceutiques
de la Faculté de santé
au 08 mars 2023

Professeurs Emérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B. (Directrice-adjointe)	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BERNARDES-GENISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COSTE A.	Parasitologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Doyen-directeur)	Physiologie
Mme DERAËVE C.	Chimie Thérapeutique
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
Mme WHITE-KONING M.	Mathématiques

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
Mme KELLER L.	Biochimie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C. (*)	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie Analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS C. (*)	Immunologie
Mme ECHINARD-DOUIN V. (*)	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme GADEA A.	Pharmacognosie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C. (*)	Pharmacognosie
M. LE NAOUR A.	Toxicologie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONFERRAN S	Biochimie
M. PILLOUX L.	Microbiologie
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEEELANDT M.	Pharmacognosie

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

M. AL SAATI A	Biochimie
Mme BAKLOUTI S.	Pharmacologie
Mme CLARAZ P.	Pharmacie Clinique
Mme CHAGNEAU C.	Microbiologie
Mme DINTILHAC A.	Droit Pharmaceutique
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
Mme RIGOLOT L.	Biologie Cellulaire, Immunologie
Mme STRUMIA M.	Pharmacie Clinique

Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Mme HAMZA Eya	Biochimie
Mme MALLI Sophia	Pharmacie Galénique
M. TABTI Redouane	Chimie Thérapeutique

Serment de Galien

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés

- D'actualiser mes connaissances

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

- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité

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

- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens

- De coopérer avec les autres professionnels de santé

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

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

Remerciements

Remerciements aux membres du jury

A ma présidente de jury de thèse, Madame le Professeur Peggy GANDIA, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier et chef de service dans le secteur de Pharmacologie-Toxicologie,

Je vous exprime ma gratitude pour avoir accepté de présider cette thèse et d'évaluer mon travail. Je tiens à vous assurer de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A mon directeur de thèse, Monsieur le Docteur Thomas LANOT, Praticien Hospitalier en Pharmacologie-Toxicologie,

Je te suis très reconnaissant d'avoir accepté de diriger ma thèse. Je te remercie d'avoir pris le temps de m'encadrer, depuis mon stage au sein du service de Pharmaco-Toxicologie qui a inspiré le sujet de thèse, jusqu'à l'aboutissement de ce parcours avec la soutenance. Les connaissances en analytique que tu m'as enseigné me seront précieuses pour mon futur métier. Je tiens à encore à te remercier pour ton dévouement et ta disponibilité tout au long de ce cheminement.

Monsieur le Docteur Michel LAVIT, Praticien Hospitalier au sein du service de Pharmacologie-Toxicologie,

Je vous exprime ma gratitude pour avoir accepté de faire partie de ce jury, de l'intérêt que vous portez à mon travail ; ainsi que pour votre accompagnement et connaissances apportées lors de mon semestre dans le service.

Madame le Professeur Isabelle CLAUDET, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier et chef de service des Urgences Pédiatriques,

Je vous remercie d'avoir accepté de siéger à ce jury, de l'attention que vous accordez à ce sujet de thèse. Soyez assurée de ma gratitude.

Remerciements aux personnes ayant contribué directement ou indirectement à ce travail

A ma famille : à mes parents, ma sœur, mes grands-parents ; que je remercie pour leur amour et soutien indéfectible qui m'ont porté tout au long de ces études. A mes tantes : Babeth et Marie-Thé.

A la famille Rebouil.

A la famille Mazel.

A mes amis de longue date : Carbo et Micha, mes valeureux coéquipiers depuis la sixième ; Corba, Alva, Bonji, Titi, Jeanselme et Julien. Ainsi que Cloclo, Célia, Eloïse et Lola qui chérissent tant leur partenaire.

J'ai hâte de continuer à partager de bons moments de rire avec vous.

A Valentin, mon fidèle acolyte du collège jusqu'au lycée.

Aux « Pharmas » : Auré, Fabinho, Yoyo, Jojo, Mymy, Julie, Chloé, Fonfon. Des rigolades aux premiers TP de P2 jusqu'à vos soutenances de thèse, c'est passé vite ! Je suis reconnaissant d'avoir partagé ce parcours avec vous.

A la team Hemato : Yoann la bonne humeur incarnée, Manon et sa bienveillance, Sarah, Léa, Justine, Marie-Amélie, Emma, Morgane, Julien et Soufiane ; Lamia et Iman les deux queens de l'IUC. Merci pour cet agréable stage en votre présence, vous m'avez laissé le temps nécessaire pour finaliser ma thèse. Nos échanges, moments passés ensemble et votre esprit d'équipe ont été précieux !

A la team de biochimie : Clara, Aurore, Louis, Sami et Nicolas. J'ai passé un super semestre avec vous ! En espérant me retrouver avec vous dans le même stage pour les « moins vieux » d'entre vous 😊.

A Mehdi, mon partenaire de choc durant le stage de Pharmacotox, j'ai pu voir à tes côtés le développement d'une thèse. Merci pour ces 6 mois.

Et à tous mes autres co-internes que j'ai eu la chance, ou non, de cotoyer en stage, et avec qui j'ai passé d'excellents moments : Alex, Benji (et cette fameuse garde), Justine (« oh la guille »), Clément et Ophé, Fat, Jess, Rima, PJ, Max, Baptiste, Angelo, Emma, Anouk, Clarisse.

Aux techniciens du service de Pharmaco-Toxicologie, et notamment Eric pour ses précieux conseils et son aide pour cette machine capricieuse.

Sommaire

I-Introduction.....	15
II-Etat de l'art de l'exposition humaine au cannabis	17
II)1. Origine du cannabis.....	17
II)2. Epidémiologie.....	19
II)2. a. En France.....	19
II)2. b. Dans le monde.....	20
II)3 : Pharmacocinétique des cannabinoïdes	21
II)3. a. Sang, urine, salive.....	21
II)3. b. Cheveux.....	24
II)3. b.1) Physiologie et interet de la matrice capillaire.....	24
II)3. b.2) Voies d'incorporation du cannabis dans le cheveu.....	27
II)3.c. Pharmacodynamie.....	29
II)3.d. Effets sur l'Homme.....	31
II)3.e. Pédiatrie et matrice capillaire : un cas à part.....	33
III-Matériel et méthodes.....	35
III)1. Conditions analytiques.....	35
III)1.a. GC-MS/MS.....	35
III)1. a.1) GC.....	36
III)1. a.2) MS/MS.....	36
III)1. a.3) Avantages et inconvénients.....	38
III)1. a.4) Modes d'acquisition.....	38
III)1. b. Réactifs.....	40
III)1. c. Paramètres instrumentaux.....	41
III)2. Protocoles de dosage.....	43
III)2. a. Méthode 1.....	43
III)2. b. Méthode 2 et 3.....	44
III)3. Retraitement des données.....	46
III)4. Critères pour la validation de méthode.....	47
III)4. a. Répétabilité.....	47
III)4. b. Reproductibilité.....	48
III)4. c. Justesse.....	48
III)4. d. Spécificité.....	49

III)4. e. Contribution isotopique.....	49
III)4. f. Dilution.....	50
III)4. g. Effet mémoire.....	50
III)4. h. Stabilité de l'injecteur.....	51
III)5. Modalité de prélèvement capillaire.....	51
IV-Résultats.....	52
IV)1. Méthode 1.....	52
IV)1. a. Sérum.....	52
IV)1. b. Urine.....	56
IV)1. c. Sang total.....	60
IV)1. d. Critères d'acceptation.....	62
IV)2. Méthode 2.....	63
IV)2. a. Répétabilité.....	65
IV)2. b. Reproductibilité.....	65
IV)2. c. Justesse.....	66
IV)2. d. Spécificité.....	66
IV)2. e. Contribution isotopique.....	66
IV)2. f. Effet mémoire.....	67
IV)2. g. Stabilité de l'injecteur.....	67
IV)2. h. Exactitude.....	68
IV)3. Méthode 3.....	68
V-Discussion.....	72
V)1. Validation analytique sur les matrices sanguines et urinaires.....	72
V)2. Validation sur la matrice capillaire.....	78
V)2.a. Stratégie de validation.....	78
V)2.b. Choix des analytes.....	79
V)2.c. Méthode 2.....	82
V)2.d. Méthode 3.....	82
V)2.e. Application des méthodes 2 et 3 sur des échantillons.....	84
VI-Conclusion.....	86

Liste des figures :

Figure 1 : Structure du cannabis.....	17
Figure 2 : Principaux cannabinoïdes, principaux métabolites et leurs structures	18
Figure 3: Concentrations moyennes de cannabinoïdes dans 35 312 préparations à base de cannabis confisquées aux États-Unis entre 1980 et 1997	19
Figure 4 : Répartition du THC dans le corps	22
Figure 5 : Concentrations urinaires moyennes de THC, 11-OH-THC et THC-COOH chez 8 huit ayant une consommation légère de marijuana après avoir fumé une cigarette contenant 27 mg de THC	23
Figure 6.a : Structure et constituants de la tige du cheveu humain.....	26
Figure 6.b : Formation de cheveux dans un follicule à partir des cellules matricielles de la membrane basale jusqu'à la tige du cheveu mature.....	26
Figure 7 : Cycle des cheveux avec la physiologie des différentes phases	27
Figure 8 : Diagramme de phase du « high » par rapport à la concentration de THC de 0 à 360 minutes après l'ingestion orale de 15 mg de THC dans un biscuit au chocolat	30
Figure 9 : Principe de la GC-MS/MS	35
Figure 10 : Différentes étapes de la MS/MS	37
Figure 11 : Différents modes d'acquisitions en GC-MS/MS	40
Figure 12 : Réaction chimique pour la dérivatisation du THC-COOH	45
Figure 13 : Degré de récupération du CBD (en vert), du CBG (en orange), du CBN (en bleu) et du Δ^9 -THC (en rouge) calculé à partir de l'analyse GC-MS (A) et LC-MS (B) en LLE à partir de surnageant d'échantillons de plasma contenant 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (pour GC-MS) ou 0,2 $\mu\text{g/mL}$ (pour LC-MS) de chaque cannabinoïde	76

Figure 14 : Degré de récupération du CBD (en vert), du CBG (en orange), du CBN (en bleu) et du Δ^9 - THC (en rouge) calculé à partir de l'analyse GC-MS (A) et LC-MS (B) par précipitation des protéines sur des surnageants à partir d'échantillons de plasma humain contenant 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (pour GC-MS) ou 0,2 $\mu\text{g/mL}$ (pour LC-MS) de chaque cannabinoïde 77

Figure 15 : Degré de récupération du CBD calculé en GC-MS sur des surnageants à partir d'échantillons de plasma avec différentes concentrations de cannabinoïdes.. 77

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Identification des différents composés en mode MRM pour la méthode 1	42
Tableau 2 : Identification des différents composés en mode MRM pour les méthodes 2 et 3.....	43
Tableau 3 : Résultats de la répétabilité sur les concentrations des quatre cannabinoïdes mesurées par GC-MS/MS	65
Tableau 4 : Résultats de la reproductibilité sur les concentrations des quatre cannabinoïdes mesurées par GC-MS/MS.....	65
Tableau 5 : Résultats de la justesse sur les concentrations des quatre cannabinoïdes mesurées par GC-MS/MS	66
Tableau 6 : Résultats de la spécificité sur les concentrations des quatre cannabinoïdes mesurées par GC-MS/MS	66
Tableau 7 : Résultats de la contribution isotopique sur les concentrations des quatre cannabinoïdes mesurées par GC-MS/MS	66
Tableau 8 : Résultats de l'effet mémoire sur les concentrations des quatre cannabinoïdes mesurées par GC-MS/MS	67
Tableau 9 : Résultats de la stabilité de l'injecteur sur les concentrations des quatre cannabinoïdes mesurées par GC-MS/MS	67
Tableau 10 : Résultats de l'exactitude sur les concentrations du THC et CBD mesurées par GC-MS/MS à l'aide de deux patients et quatre EEQ	68
Tableau 11 : Résultats de l'exactitude sur les concentrations du THC-COOH mesuré par GC-MS/MS à l'aide de deux patients et quatre EEQ.....	71
Tableau 12 : Résultats de la répétabilité sur les signaux des étalons internes du THC dans les différentes matrices.....	73

Liste des abréviations :

- ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
- ATU : autorisation temporaire d'utilisation
- BSTFA : N, O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
- CBD: cannabidiol
- CBG: cannabigérol
- CBN: cannabinoïde
- CB1 : récepteur cannabinoïde de type 1
- CB2 : récepteur cannabinoïde de type 2
- CHU : Centre Hospitalier Universitaire
- Cmax : concentration maximale
- CQ : contrôle qualité
- CQD : contrôle qualité dilué
- CV : coefficient de variation
- ESCAPAD : Enquête sur la santé et les consommations lors de l'appel de préparation à la défense
- EEQ : évaluation externe de qualité
- EI : impact électronique
- eV : électron volt
- FDA : Food and Drug Administration
- GC-MS/MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
- HFIP : hexafluoropropan-2-ol
- LC-MS/MS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
- LLE : extraction liquide/liquide
- LOQ : limite de quantification
- MgSO₄ : sulfate de magnésium
- MRM : multiple reaction monitoring
- NaCl : chlorure de sodium
- NCI : negative chemical ionization
- OFDT : Observatoire français des drogues et tendances addictives
- PFFA : acide perfluoropropionique

- r : coefficient de corrélation de Pearson
- SPE : extraction en phase solide
- SoHT : Society of Hair Testing
- THC : Δ^9 -tétrahydrocannabinol
- THCA-A : acide delta-9-tétrahydrocannabinolique A
- THC-COOH: acide 11-nor-delta 9-THC-carboxylique
- Vd : volume de distribution
- VPN : valeur prédictive négative
- 11-OH-THC: 11-hydroxy-delta 9-tétrahydrocannabinol

I-Introduction:

La consommation de cannabis soulève de nombreux enjeux importants en matière de santé publique, juridique et médico-légale. Son usage entraîne des risques sanitaires significatifs notamment lors de l'exposition prénatale (effets néfastes sur le développement du fœtus), du petit enfant (problèmes cognitifs et comportementaux à long terme) ainsi que des effets sur la santé mentale (schizophrénie, dépression). La substance peut exposer l'utilisateur régulier à une dépendance, accompagné de symptômes de sevrage. Cette situation soulève de nombreuses questions juridiques complexes, notamment en matière de sécurité routière avec un risque accru d'accidents, de responsabilité pénale nécessitant une évaluation précise de l'intoxication lors de crimes. Ainsi que pour la protection des mineurs où l'exposition au cannabis, qu'elle soit passive ou active, pose des questions cruciales sur la responsabilité parentale. Les aspects médico-légaux liés au cannabis sont nombreux : cas d'empoisonnements intentionnels ou accidentels au cannabis et en toxicologie post-mortem où la détection et la quantification des cannabinoïdes dans les tissus sont essentielles pour déterminer le rôle potentiel de la substance dans les décès.

Au sein du Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie, le dosage des principaux phytocannabinoïdes : Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC) et ses métabolites, ainsi que le cannabidiol (CBD); est une analyse effectuée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) depuis plusieurs années sur des matrices telles que l'urine, la salive et le sang. Le laboratoire a pour projet de mettre en place depuis un certain temps le dosage de ces substances dans la matrice capillaire, car cette dernière fait l'objet d'une préparation, mise en place protocolaire et interprétation différente du résultat toxicologique. Elle présente plusieurs avantages : une capacité unique de stockage à long terme des substances étrangères contrairement au sang, la possibilité de dater une exposition ou de faire une analyse chronologique de la prise d'une substance.

Le premier objectif vise donc à développer l'analyse des échantillons sur cette matrice. Les efforts précédents n'avaient pas abouti en raison d'une sensibilité insuffisante, principalement due à l'ancienneté de l'équipement LC-MS/MS actuel

(avec une détection de l'ordre du microgramme). L'arrivée au laboratoire du nouvel appareil GC-MS/MS Shimadzu-®TQ8050NX a pour but de pallier ces contraintes par de meilleures performances analytiques (sensibilité, spécificité...) avec une détection de concentrations allant jusqu'au nanogramme/picogramme.

Le second objectif consiste à transférer les analyses de sang, d'urine et de salive, actuellement réalisées sur la LC-MS/MS, vers ce nouvel instrument récemment acquis par le laboratoire. Cet objectif ne découle pas à proprement parler d'impératifs techniques mais plus d'une volonté de regrouper l'ensemble des dosages des cannabinoïdes sur le même appareil.

Nous avons alors effectué avec l'équipe du laboratoire le développement et la validation analytique du dosage des cannabinoïdes dans l'idée d'étoffer le panel d'analyses toxicologiques disponibles au CHU de Toulouse. Le dosage des cannabinoïdes dans différentes matrices biologiques permet de distinguer une exposition active d'une exposition passive au cannabis, d'évaluer la chronicité de la consommation (usage unique ou usage régulier) et d'aider à l'interprétation des résultats dans des contextes cliniques et médico-légaux complexes. Ces avancées analytiques facilitent le travail des biologistes et des cliniciens en fournissant des données plus précises et fiables sur l'exposition au cannabis, contribuant ainsi à une meilleure prise en charge des patients et à une application plus juste de la loi.

II-Etat de l'art de l'exposition humaine au cannabis :

1) Origine du cannabis

Le cannabis est une plante originaire d'Asie centrale ou d'Asie du Sud faisant partie de la famille des *Cannabaceae*. Elle est communément appelée Chanvre ou *Cannabis sativa* L. et il en existe trois sous-espèces : le Chanvre industriel qui a une utilisation commerciale et industrielle, le Chanvre indien connu pour ses effets psychotropes et le Chanvre sauvage¹. Il s'agit d'une substance peu à peu réglementée voire interdite au cours du XX^e siècle et encore actuellement au cœur de nombreux débats.

Il se caractérise physiquement par une taille moyenne, des pales larges avec une ramification importante (Figure 1) et sa concentration en principes actifs dépend du climat et de l'environnement dans lesquels la plante a évolué². L'herbe de cannabis contient plus de 400 composés, dont plus de 60 cannabinoïdes : ces composés sont des méroterpènes à substitution aryle uniques (Figure 2). Le Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC), le cannabidiol (CBD) et le cannabinoïde (CBN) sont les substances chimiques plus répandues et sont produites par des glandes spécialisées présentes sur les parties aériennes de la plante (dans les tiges, les feuilles, les fleurs et les graines). L'agent psychoactif le plus puissant est le THC, celui-ci se décompose lorsqu'il est exposé à l'air, à la chaleur ou à la lumière.

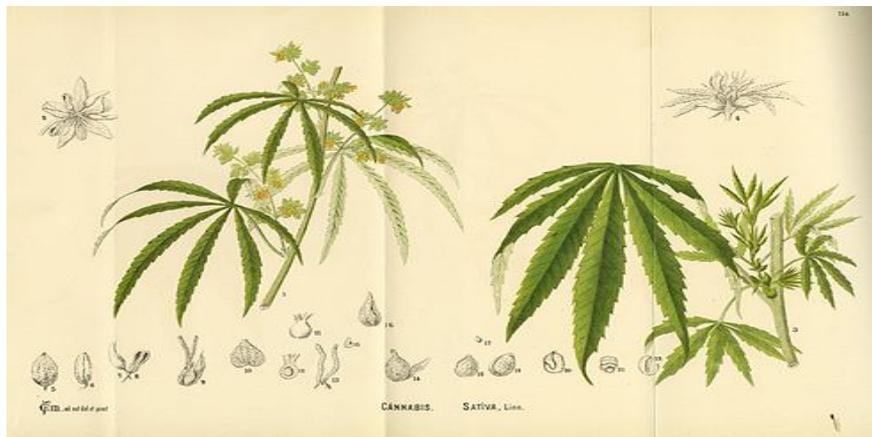
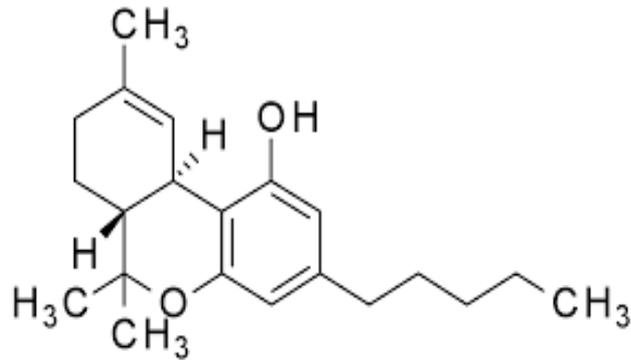
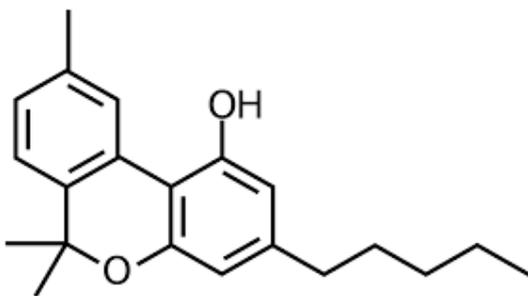


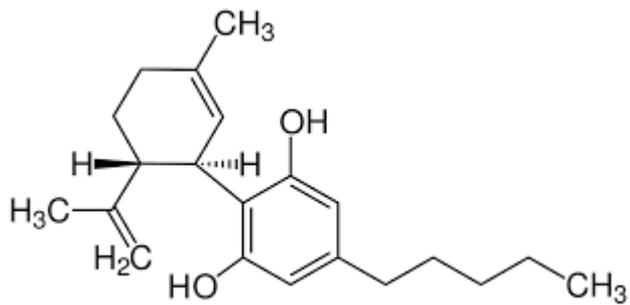
Figure 1 : Structure du cannabis³



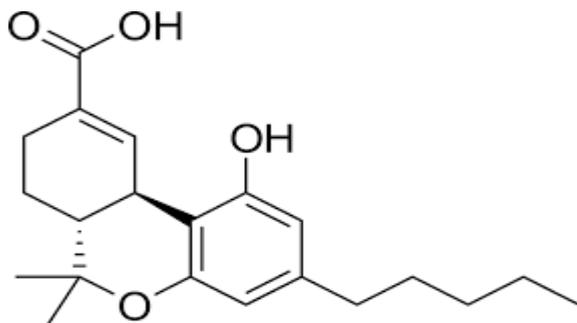
Δ-9-tétrahydrocannabinol (THC)



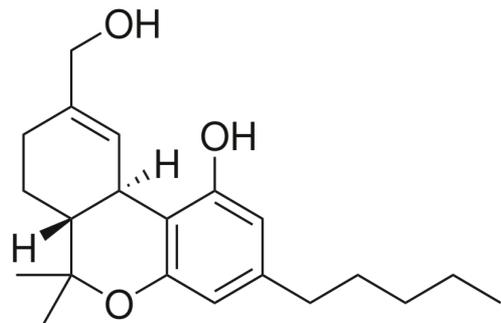
Cannabinol (CBN)



Cannabidiol (CBD)



Acide 11-nor-delta 9-THC-carboxylique (THC-COOH)



11-hydroxy-delta 9-tétrahydrocannabinol (11-OH-THC)

Figure 2 : Principaux cannabinoïdes, principaux métabolites et leurs structures ⁴

Le cannabis se consomme principalement sous forme d'herbe et de résine (le haschisch ainsi que le skuff, dérivé du cannabis obtenu par un tamisage plus grossier que le haschich), et plus rarement sous forme d'huile. Ces deux premières

formes se fument généralement sous forme de « joint », « pétard » ou se vapotent (pipe à eau, vaporisateur, chicha) afin d'éviter les effets de la combustion. Il est parfois consommé cuit dans des biscuits, gâteaux ou bu sous forme d'extrait, infusion pour la dernière forme. La teneur en THC varie énormément entre les différentes sources et préparations de cannabis (Figure 3). La marijuana regroupe les fleurs séchées pour leur taux élevés en THC ou autres cannabinoïdes.

	THC (%)	CBD (%)	CBC (%)	CBN (%)
Marijuana	3.1	0.3	0.2	0.3
Sinsemilla	8.0	0.6	0.2	0.2
Hashish	5.2	4.2	0.4	1.7
Hashish oil	15.0	2.7	1.1	4.1

CBC = cannabichromene; CBD = cannabidiol; CBN = cannabinol; THC = Δ^9 -tetrahydrocannabinol.

Figure 3: Concentrations moyennes de cannabinoïdes dans 35 312 préparations à base de cannabis confisquées aux États-Unis entre 1980 et 1997 ⁵

Il ne convient pas de l'utiliser par voie intraveineuse car il est relativement insoluble dans l'eau.

2) Epidémiologie

a. En France

Le cannabis ainsi que le THC et ses dérivés sont des produits et substances classés comme stupéfiants et leur usage est interdit, conformément à l'arrêté du 22 février 1990, dont les dispositions ont été intégrées dans le Code pénal et le Code de la santé publique⁶.

En 2020, le cannabis demeure de très loin le produit illicite le plus expérimenté en France, près de la moitié des adultes (46%) en ont déjà consommé mais sa diffusion reste stable depuis 2017 (45% en 2017). De plus, la proportion des usagers réguliers (au moins 10 fois dans le mois) apparaît en léger recul, passant de 3,6% en 2017 à 3,2% en 2020 ⁷. La consommation de cannabis reste globalement plus importante

parmi les moins de 35 ans, néanmoins l'âge moyen des usagers actuels de cannabis ne cesse d'augmenter en passant de 25,1 ans à 32,8 ans entre 1992 et 2021. Cette tendance est la conséquence de deux phénomènes cumulés. D'une part, le vieillissement des générations d'adultes (qui ont actuellement entre 40 et 50 ans) qui déclaraient consommer à la fin des années 1990, et dont une partie a continué de consommer. Et d'autre part, l'arrivée dans les âges de consommation de la génération née dans les années 2000 qui se révèle moins consommatrice que les précédentes : en 2022, moins de trois adolescents de 17 ans sur dix ont déjà fumé du cannabis au cours de leur vie (29,9 %)⁸. Cette prévalence est la plus basse jamais enregistrée depuis 2000 dans l'Enquête sur la santé et les consommations lors de l'appel de préparation à la défense (ESCAPAD) alors qu'elle était aux alentours de 40 % en 2017 et 50 % en 2002 ⁹. Selon l'OFDT, la consommation de cannabis en France métropolitaine présente des disparités régionales marquées. Les régions du nord et du centre affichent des taux d'expérimentation et d'usage de cannabis inférieurs à la moyenne nationale. À l'inverse, les régions du sud et de l'ouest du pays montrent une prévalence plus élevée avec un niveau d'expérimentation supérieur à la moyenne.

La loi du 26 décembre 2023 de financement de sécurité sociale pour 2024 qui prévoit une ATU par l'Agence nationale de sécurité du médicament (ANSM) pour les médicaments à base de cannabis peut remettre en cause ces chiffres dans un futur proche. Néanmoins, il est relativement facile de distinguer sur le plan épidémiologique cet usage par rapport à un usage récréatif, non médicamenteux.

b. Dans le monde

Le cannabis reste la drogue la plus consommée dans le monde : en 2020 celle-ci était utilisée par 209 millions de personnes (15-64 ans ; devant les opiacés et les amphétamines), avec une augmentation du nombre d'usagers depuis 2010 (plus de 23%). En janvier 2022, les dispositions légales autorisant la production et la vente de cannabis à des fins non médicales ont été approuvées au Canada, en Uruguay et dans 21 juridictions des Etats-Unis. Elles semblent avoir accru l'augmentation de

l'usage quotidien déclaré de cette drogue, notamment sur l'usage de produits à haute teneur en THC ¹⁰. Dernièrement, c'est l'Allemagne qui donne son feu vert à l'utilisation récréative du THC (1 avril 2024). En revanche, la prévalence de l'usage de cannabis chez les adolescents n'a pas beaucoup évolué.

3) Pharmacocinétique des cannabinoïdes

a. Sang, urine, salive

Le THCA-A (acide delta-9-tétrahydrocannabinolique A) est le précurseur biosynthétique non psychoactif du THC et le principal cannabinoïde de la plante. Quand cette substance est chauffée (pendant le fumage) ou utilisée en condition alcaline, elle subit une décarboxylation la convertissant en THC. Le THCA-A est également transformé en THC dans la plante au cours du temps.

Les cannabinoïdes sont dégradés dans l'estomac puis métabolisés dans le foie. Le métabolite majeur (via oxydation catalysée par des enzymes du complexe cytochrome P450) est le 11-OH-THC (11-hydroxy-delta 9-tétrahydrocannabinol) qui peut être plus puissant que le THC lui-même et être responsable de certains des effets du cannabis. Le 11-OH-THC est ensuite transformé en THC-COOH (ou acide 11-nor-delta 9-THC-carboxylique) qui est inactif. Ce dernier est rapidement conjugué à l'acide glucuronique, formant THC-COOH-glucuronide.

Environ 50% du THC contenu dans un joint d'herbe de cannabis est inhalé dans la fumée principale ; presque tout est absorbé par les poumons et pénètre rapidement dans la circulation sanguine pour atteindre le cerveau en quelques minutes. Le volume d'inhalation, le nombre, la durée et l'espacement des bouffées influencent ce degré d'exposition ⁴. La Cmax par inhalation est de 10 minutes pour le THC, 30 minutes pour le 11-OH-THC et 2h pour le THC-COOH ¹¹.

L'absorption du cannabis par voie orale est nettement moins efficace avec des concentrations sanguines équivalentes à seulement 25-30% de celles obtenues en fumant la même dose. Cette différence s'explique en partie par le métabolisme de premier passage entérohépatique, qui transforme une grande partie du THC en 11-OH-THC avant qu'il n'atteigne la circulation sanguine générale.

Le THC est une substance extrêmement soluble dans les lipides avec une séquestration dans les graisses atteignant une concentration maximale en 4/5 jours (Figure 4), s'en suit un relargage dans d'autres compartiments du corps.

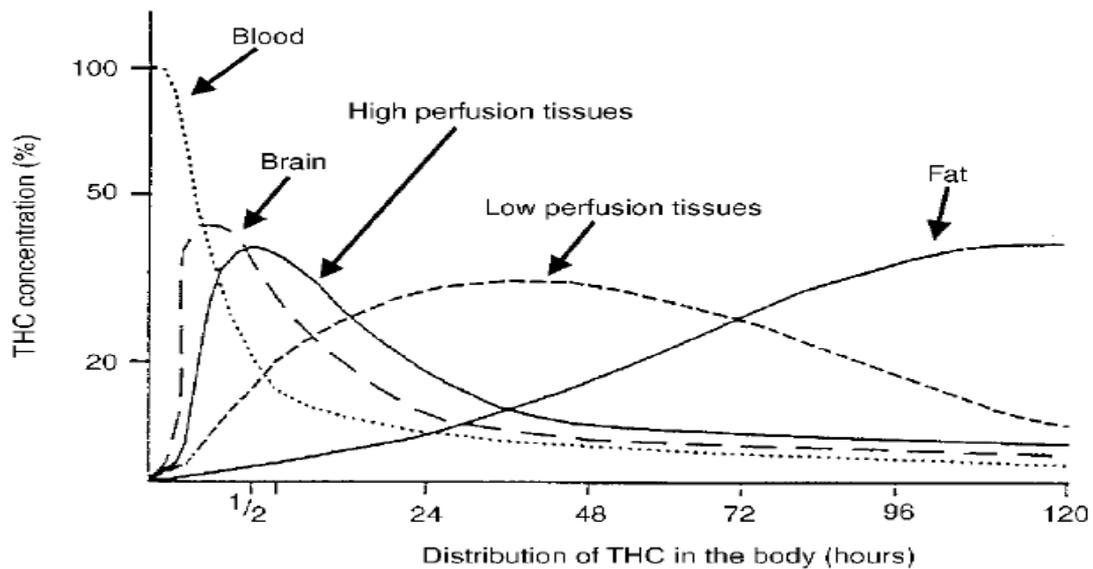


Figure 4 : Répartition du THC dans le corps ¹²

La majeure partie du THC se trouve dans le plasma sanguin avec une liaison aux protéines plasmatiques de 95 à 99% ^{13 14}. Le Vd à l'état d'équilibre (qui correspond au volume fictif dans lequel la substance devrait être répartie pour être à la même concentration que dans le plasma) peut atteindre 3,4 L/Kg soit presque 20 fois supérieur au volume plasmatique lorsque la majorité se trouve dans les tissus¹⁵. La libération lente de THC à partir des compartiments de stockage des lipides ainsi qu'une circulation entérohépatique importante contribuent à une longue demi-vie terminale du THC avec deux pics plasmatiques. La demi-vie d'élimination tissulaire du THC est d'environ 7 jours ^{16 17} pour les consommateurs fréquents et de 20 à 36 heures pour les consommateurs peu fréquents ^{4 18 19}.

Les métabolites sont principalement excrétés dans l'intestin à partir duquel ils sont réabsorbés, prolongeant encore leur action, puis dans les fèces (65%). Si l'élimination du sang est rapide (fenêtre de détection de 12 à 24 heures suivant le

degré de consommation), l'élimination de l'organisme est très lente (jours à semaines).

Au niveau urinaire, le THC est éliminé principalement sous forme THC-COOH-glucuronide. Cette élimination est mineure en raison d'une liaison protéique importante des cannabinoïdes.

*Falck*²⁰, *Cone et Johnson*²¹ ont mis en évidence de nombreux facteurs influençant ces concentrations urinaires : les quantités d'eau bues avant la collecte de l'urine, la quantité d'urine évacuée et le moment de l'absorption du cannabis par rapport à la miction, la durée et la fréquence de l'exposition à la fumée, les caractéristiques rénales. De plus, les méthodes d'inhalation du cannabis peuvent également modifier les niveaux d'exposition des non-fumeurs (contamination involontaire ou inhalation passive)²² : le THC-COOH peut être détecté dans leur urine environ 1 heure après l'exposition. Les concentrations urinaires maximales de THC-COOH sont plus rapides pour les fumeurs (entre 4 et 5 heures, Figure 5) chez qui, le délai moyen jusqu'au dernier résultat positif était de 31,5 jours pour les consommateurs fréquents²³.

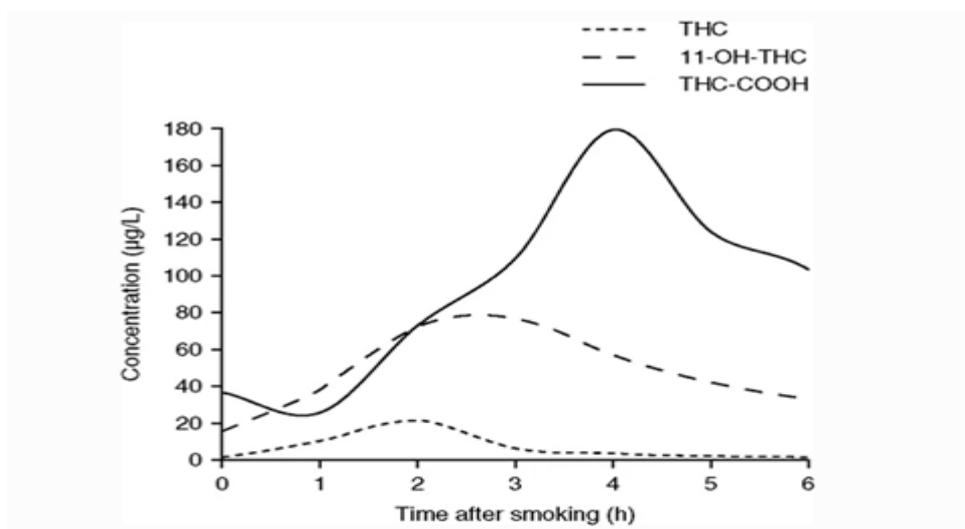


Figure 5 : Concentrations urinaires moyennes de THC, 11-OH-THC et THC-COOH chez 8 huit ayant une consommation légère de marijuana après avoir fumé une cigarette contenant 27 mg de THC²⁴

Le THC se concentre également dans le lait maternel à partir du plasma maternel en raison de sa haute lipophilie. Les concentrations retrouvées dans le sang fœtal se rapprochent de celle du sang maternel, tandis que le 11-OH-THC et THC-COOH traversent le placenta beaucoup moins efficacement.

Quant au CBD, il s'agit d'un constituant naturel non psychoactif présent également dans le chanvre. Sa biodisponibilité après inhalation est de 31% ²⁵ avec un métabolisme similaire à celui du THC. Le CBD ne se transforme pas en THC lors de l'exposition à la chaleur pendant la consommation par inhalation, ni par le métabolisme humain (à la différence du rat²⁶). La clairance plasmatique, la demi-vie plasmatique, la Cmax et les taux d'excrétions urinaires sont similaires à ceux du THC, mais il possède un Vd supérieur (30 L/Kg).

b. Cheveux

b.1) Physiologie et intérêt de la matrice capillaire

La recherche de toxiques et plus particulièrement des cannabinoïdes dans le cheveu trouve son intérêt aussi bien dans un contexte d'analyse médico-légale (parmi lesquelles on peut citer de manière non exhaustive les suspicions de soumissions chimiques, toxicologie post mortem...) que dans un contexte juridique, médical (suivi de consommation des patients en psychiatrie), de santé publique (expositions des mineurs...).

Un cheveu est une fibre constituée de cellules kératinisées qui forment ensemble trois structures concentriques : la cuticule, le cortex et la moelle (ou médulla) (Figure 6.a). La cuticule est la partie extérieure la plus vulnérable aux attaques chimiques et mécaniques (notamment les variations climatiques et thermiques ; les traitements cosmétiques ²⁷). Les cheveux proviennent du follicule pileux (Figure 6.b) situé à 3–5 mm sous la surface de la peau est entouré d'un riche système capillaire qui fournit aux cheveux en croissance le matériel métabolique nécessaire. Les cheveux poussent selon un cycle composé des phases anagène (croissance active), catagène (transition) et télogène (repos) (Figure 7). La phase de croissance dure plusieurs mois à plusieurs années, période où laquelle les cellules du bulbe pileux se multiplient rapidement. La phase catagène est une phase de transition qui dure 2 à 3

semaines, le bulbe pileux se rétracte et la croissance cellulaire se stoppe. La phase télogène est une phase de repos de 2 à 4 mois, le cheveu finit par tomber et un nouveau cycle démarre avec le développement d'un nouveau cheveu dans le follicule. La longueur individuelle des cheveux dépend de la durée de chaque phase et du taux de croissance propre à l'âge de l'individu (environ 85 % des cheveux du cuir chevelu adulte sont en phase de croissance et les 15 % restants en phase de repos) ²⁸, leur vitesse de pousse varie de 0,6 à 1,4 cm par mois en général.

Le cheveu se distingue qualitativement des autres échantillons biologiques tout en étant complémentaire. Il présente plusieurs avantages : sa collecte est moins invasive et intrusive que celle du sang ou de l'urine. De plus, l'échantillon de cheveux peut être conservé à température ambiante et stocké indéfiniment grâce à l'extrême stabilité des xénobiotiques en l'absence de lumière et d'humidité, néanmoins un gonflement des cheveux peut se produire au congélateur. Sa fenêtre de détection des cannabinoïdes est plus longue (mois voire années) que le sang et l'urine (jours voire semaines) : le dosage peut donc être effectué longtemps après un incident par rapport aux autres prélèvements dont l'analyse est limitée par le temps car la drogue et ses métabolites sont éliminés du corps avant l'échantillonnage. Il est donc possible d'établir la chronologie d'une exposition en analysant plusieurs segments de cheveux, permettant ainsi de faire une datation précise d'un contact avec une substance.

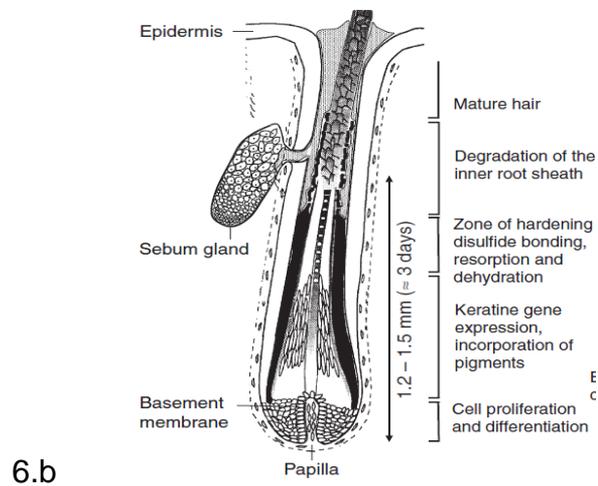
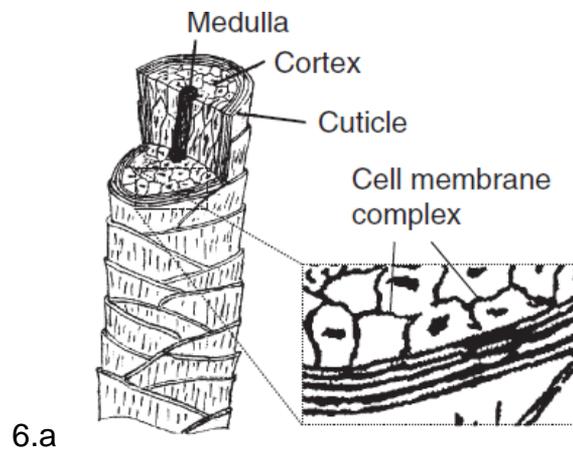


Figure 6.a : Structure et constituants de la tige du cheveu humain ²⁸

Figure 6.b : Formation de cheveux dans un follicule à partir des cellules matricielles de la membrane basale jusqu'à la tige du cheveu mature

The hair cycle

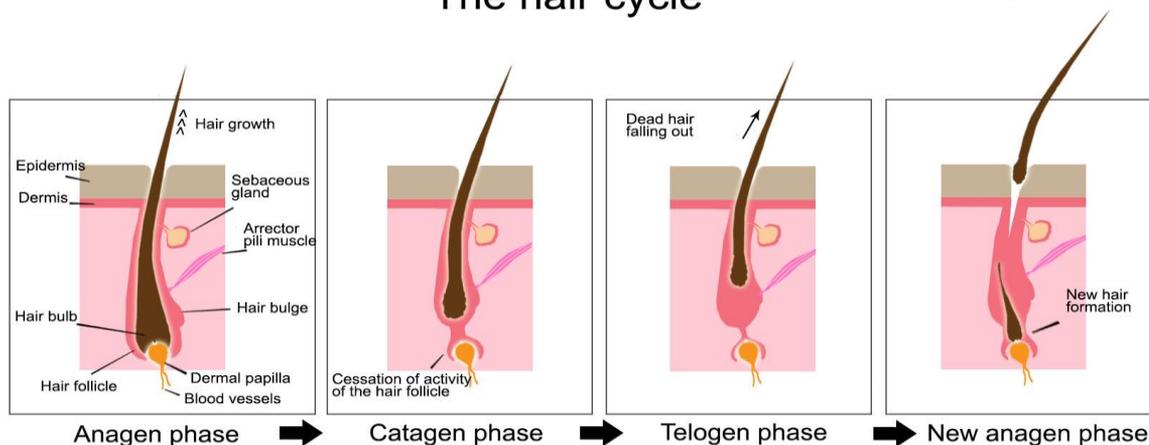


Figure 7 : Cycle des cheveux avec la physiologie des différentes phases ²⁹

La limite d'échantillonnage se porte principalement sur la disponibilité des cheveux (alopécie chimio-induite, calvitie, crâne rasé...), facteur limitant dans le contrôle de l'observance thérapeutique nécessitant d'envisager des méthodes alternatives ou complémentaires de contrôle. Les principaux inconvénients incluent la contamination externe (par exemple, le THC-A dans les cheveux provient exclusivement d'une contamination externe, principalement par transfert direct après manipulation de la plante, par les surfaces contaminées, ou par condensation de la fumée sur la tige du cheveu), la couleur naturelle des cheveux, les traitements capillaires, ainsi que des problèmes d'interprétation quantitative (qui seront détaillés ultérieurement).

b.2) Voies d'incorporation du cannabis dans le cheveu

D'après la littérature, il existe plusieurs mécanismes dans l'incorporation des cannabinoïdes dans la tige pileaire :

- diffusion sanguine → processus biologique actif
- exposition à la sueur → processus biologique actif
- exposition au sébum → processus biologique actif
- diffusion à partir de la peau → processus biologique actif
- exposition environnementale à la fumée de cannabis → contamination externe
- contact direct avec un objet ou une partie du corps contaminé → contamination externe

Les cannabinoïdes présents dans le sang peuvent s'incorporer aux cheveux en formation au niveau du bulbe pileux. Ces molécules ont tendance à être retrouvées dans les structures internes du cheveu, principalement le cortex et la médulla ^{4 17 30} : l'interprétation de l'analyse capillaire est basée sur ce modèle de diffusion. Aucun métabolisme supplémentaire ne se produit une fois que la substance et ses métabolites sont incorporés dans les cheveux en croissance ³¹, ils vont rester fixés dans le cheveu avec une excellente stabilité et en suivre la croissance ³². Ainsi, la durée de détection en mois de la substance dans le cheveu est en moyenne, équivalente à sa longueur en cm notamment au niveau du vertex postérieur (l'arrière du sommet du crâne) qui est la zone au niveau de laquelle la pousse des cheveux est la plus synchrone. Le THC est le composé le plus fréquemment détecté dans les analyses capillaires, suivi par le CBD, le CBN et le THC-COOH. Les concentrations de THC-COOH se situent généralement entre le femto et le picogramme par milligramme de cheveux, tandis que celles du THC et du CBD varient du microgramme au nanogramme. La présence des cannabinoïdes apparaîtrait à partir de 5 jours après une consommation ³³ et leur disparition peut s'observer en 3-4 mois (à l'exception du THC-COOH, pour lequel la disparition s'effectue en 7-8 mois) si le cheveu est soumis à des agressions. En effet, la durée des substances dans les cheveux normalement entretenus augmente en parallèle avec la polarité (les métabolites étant plus polaires). Le fait que le THC-COOH ne se trouve pas dans la fumée de cannabis signifie que sa présence dans les cheveux exclut la possibilité d'une exposition passive à l'environnement ³⁴. Aucune concentration de THC-COOH n'a été détectée dans les cheveux, le liquide buccal et le sébum chez les fumeurs passifs ³⁵. C'est pourquoi il est principalement recherché dans les analyses capillaires.

Cependant, il est important de noter que les mécanismes de contamination externe compliquent l'interprétation des résultats. En effet, les cannabinoïdes stockés dans le sébum capillaire se diffusent le long de la tige du cheveu ³⁶. Cette diffusion varie selon certaines caractéristiques : les cheveux longs, généralement plus âgés, sont souvent plus endommagés physiquement et chimiquement, ce qui les rend plus susceptibles d'absorber des contaminants externes. A l'inverse, les cheveux courts présentent généralement un niveau de contamination moindre : la cuticule externe est généralement moins poreuse, plus imperméable et leur lavage quotidien permet

une élimination plus efficace du sébum capillaire de la surface du cuir chevelu. En résumé, la longueur des cheveux, leur état de santé et leur exposition aux facteurs externes influencent directement leur niveau de contamination.

De plus, la concentration de drogues dans les cheveux est influencée par leur pigmentation qui est responsable de leur couleur : l'importance des concentrations capillaires est positivement corrélée à la concentration en mélanine ³⁷. Le THC, plus neutre et lipophile n'est pas fortement lié à la mélanine, ce qui entraîne des concentrations beaucoup plus faibles de THC dans les cheveux par rapport à d'autres stupéfiants comme la cocaïne et la méthamphétamine (drogues basiques) qui se concentrent dans les cheveux en raison de leur liaison ionique à la mélanine et de leur alcalinité. D'autant qu'il faut prendre en compte qu'initialement le taux d'incorporation capillaire est très faible, multiple et complexe.

Pour ces raisons, une méthode très sensible pour la détection précise des cannabinoïdes dans les cheveux et en particulier le THC-COOH est nécessaire afin d'obtenir des preuves de consommation et d'éliminer tout doute de contamination.

c. Pharmacodynamie

Sur le plan taxonomique, le terme cannabinoïde peut comprendre les phytocannabinoïdes et endocannabinoïdes qui se distinguent par leur origine, leur production et leurs effets. Les premiers proviennent de la plante et produisent des effets psychoactifs plus prononcés tandis que les seconds sont synthétisés par le corps à la suite de stimuli spécifiques et permettent de maintenir une homéostasie cellulaire.

Les systèmes cannabinoïdes endogènes du corps comprennent :

- les endocannabinoïdes, ligands physiologiques pour les récepteurs cannabinoïdes³⁸.

- l'amide hydrolase ou la monoacylglycéril lipase qui synthétisent et dégradent les endocannabinoïdes.

- les récepteurs cannabinoïdes spécifiques CB1 et CB2. Le récepteur CB1 a une action sur le système de la récompense via augmentation de la libération de dopamine par le noyau accumbens et le cortex préfrontal entraînant un effet

euphorisant, alors que les récepteurs CB2 n'ont pas d'activité psychique. Les phytocannabinoïdes interagissent essentiellement avec ces deux récepteurs.

Après inhalation, les effets psychotropes sont perceptibles en quelques secondes et pleinement apparents en quelques minutes, atteignant un maximum 15 à 30 minutes après la consommation. Au contraire, après ingestion, le début des effets est retardé mais leur durée est prolongée en raison d'une absorption lente et continue par l'intestin, avec un maximum atteint après 3 heures¹⁵. Il est particulièrement important de souligner qu'une exposition intense à la fumée de cannabis chez une personne non fumeuse peut provoquer des effets sensoriels, ainsi que des altérations du comportement, des capacités cognitives et des performances psychomotrices comparables à ceux ressentis par les fumeurs, surtout lorsque le cannabis est très puissant en raison de son effet dose-dépendant. Selon deux études, la relation entre la concentration de THC et ses effets n'est pas linéaire. Après inhalation, les niveaux de THC dans le sang baissent considérablement avant que les effets psychotropes les plus intenses ne se manifestent ³⁹ ; tandis qu'après administration orale les effets psychotropes s'installent plus tardivement : le « high » (effet psychotrope maximal) est généralement retardé de 1 à 3 heures par rapport à l'inhalation lorsque les concentrations plasmatiques ont déjà commencé à baisser ⁴⁰.

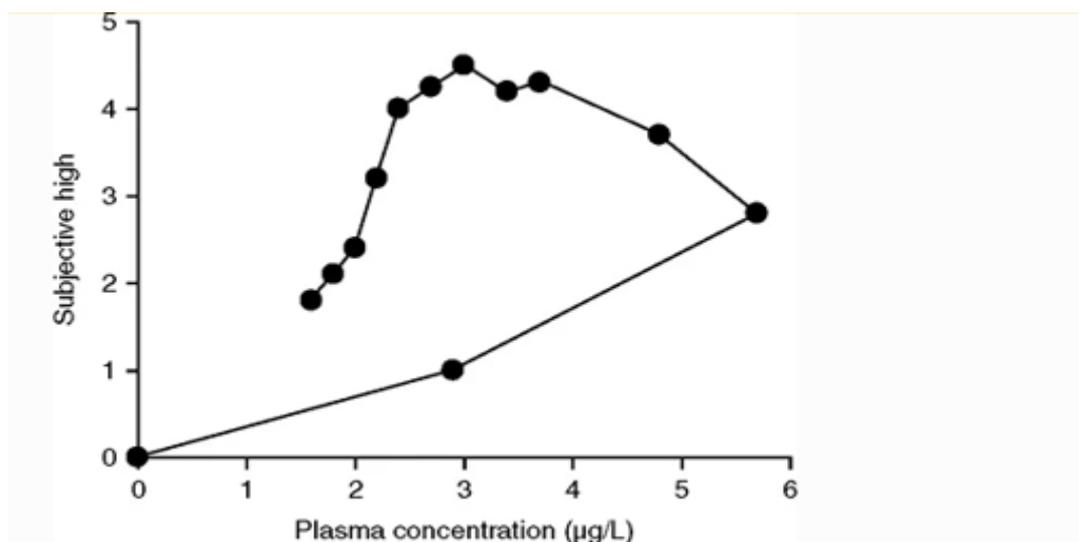


Figure 8 : Diagramme de phase du « high » par rapport à la concentration de THC de 0 à 360 minutes après l'ingestion orale de 15 mg de THC dans un biscuit au chocolat ⁴⁰.

Sur la Figure 8, chaque point représente 30 minutes. La concentration plasmatique maximale de THC à 5.7 ug/L a été atteinte après 60 minutes, tandis que la sensation maximale de « high » a été noté 2 à 4 heures après la prise du cannabinoïde. De ce fait, il n'y a pas de corrélation entre les concentrations sanguines et les effets qui persistent alors que les concentrations dans le sang sont devenues très basses voire nulles, et ce, par n'importe quelle voie d'administration. En raison de la séquestration dans les graisses avec lente rediffusion et la présence de métabolites actifs, il existe une très faible relation entre les concentrations urinaires et le degré d'intoxication. En ce qui concerne les métabolites, le 11-OH-THC possède un spectre d'action similaire à celui du THC en ce qui concerne les effets psychiques et joue un rôle significatif dans les effets centraux du THC, surtout lors d'une consommation orale ⁴¹ ⁴² ⁴³. En revanche, le THC-COOH est un métabolite non psychotrope qui présente des propriétés anti-inflammatoires et analgésiques. Selon certaines études, il pourrait contrer les effets du THC ⁴⁴ ⁴⁵ ⁴⁶. Des interactions peuvent survenir avec des médicaments qui se lient également aux protéines et qui sont métabolisés par les enzymes du complexe CYP, notamment le CYP2C9. Il a été observé que l'arrêt du tabac et du cannabis peuvent entraîner une augmentation des concentrations sanguines de la clozapine ou l'olanzapine. Cela s'explique par l'arrêt de l'induction de CYP1A2 par les hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans la fumée⁴⁷. Le CBD est un puissant inhibiteur des enzymes CYP3A4 et CYP2D6 ⁴⁸. Cette interaction peut augmenter la concentration plasmatique des médicaments et ainsi accroître le risque d'effets secondaires ou de toxicité.

d. Effets sur l'Homme

L'exposition, qu'elle soit passive ou active, à la fumée de cannabis peut entraîner des effets sur le comportement et nuire aux compétences psychomotrices avec des répercussions sur le plan juridique, en santé publique.

Les consommateurs recherchent principalement une altération de la perception (dyschromatopsie, altération spatiale et temporelle...) mais on retrouve un panel d'effets plus ou moins fréquents avec une variabilité interindividuelle : anxiolytique, sédatif, analgésique, réactions dysphoriques chez les sujets naïfs et

décompensation psychotique... Des troubles cardiovasculaires (infarctus du myocarde voire décès), une altération de la cognition et des performances psychomotrices (temps de réaction retardé ; défaut de mémorisation) sont rencontrés et se chronicisent avec l'utilisation répétée de la substance. Sur le plan respiratoire, la fumée de cannabis contient les mêmes composants que celle du tabac, à l'exception de la nicotine. Elle inclut du monoxyde de carbone, des irritants bronchiques, ainsi que des substances mutagènes et cancérigènes. Cette consommation chronique de cannabis est associée à la BPCO et à l'emphysème ⁴⁹. De plus, il a été rapporté des effets immunosuppresseurs et endocriniens, des risques pour la reproduction, tant pour la mère pendant la grossesse et l'accouchement que pour le fœtus et le nouveau-né ⁵⁰.

Le syndrome de sevrage du cannabis présente des similitudes avec ceux de l'alcool et des opiacés, incluant des symptômes tels que l'agitation, l'insomnie et la perte d'appétit. Cependant, le risque de dépendance physique et psychique est relativement faible comparé à d'autres substances. La tolérance au cannabis est également comparable à celle observée avec les stupéfiants mentionnés, en raison d'une adaptation pharmacodynamique nécessitant des doses plus élevées pour obtenir les mêmes effets. Certains chercheurs suggèrent que les effets persistants du cannabis chez les gros consommateurs, même pendant les périodes d'abstinence pourraient être attribués aux résidus de THC et de 11-OH-THC qui demeurent dans le cerveau à la suite du relargage à partir du compartiment adipeux. Cela expliquerait la détection prolongée de THC-COOH dans l'urine et les éventuels flashbacks liés au cannabis ⁴. En ce qui concerne la toxicité aiguë, elle est extrêmement faible : aucun décès direct n'a été rapporté à la suite d'une consommation aiguë de cannabis ⁵¹.

Le CBD est un psychotrope non addictogène en l'état actuel des connaissances, il est utilisé pour ses effets sédatifs, antiépileptiques, anxiolytiques, anti-dystoniques, antiémétiques et anti-inflammatoires. L'administration simultanée de CBD et de THC entraînerait un blocage significatif de plusieurs effets du THC, parmi lesquels la tachycardie, l'anxiété et d'autres altérations subjectives probablement en raison de l'interaction antagoniste du CBD au niveau du récepteur CB1 ⁵².

e. Pédiatrie et matrice capillaire : un cas à part

Cette partie fait l'objet d'une attention particulière de la part des chercheurs, toxicologues et cliniciens ; l'interprétation des résultats semblerait différente par rapport à la population adulte : il est donc important de prendre plus de précautions par rapport à l'interprétation et d'analyser le dossier patient dans son entièreté. La difficulté se trouve dans la distinction entre une contamination externe, une consommation aiguë ou chronique de cannabis : l'analyse capillaire permet plus facilement d'identifier la présence d'une substance que d'en déterminer la quantité précise consommée dans ce contexte.

Physiologiquement, les nourrissons peuvent perdre leur lanugo dans les mois qui suivent la naissance, ce qui peut compliquer la rétro-analyse. Leurs cheveux sont plus fins et plus poreux (rendant la procédure de décontamination inefficace)^{53 54} avec un taux de croissance différent de la vitesse de 1 cm par mois habituelle observée chez l'adulte. Chez l'enfant, la croissance des cheveux est plus lente et variable, car les différentes phases du cycle capillaire sont très irrégulières, alternant entre des périodes de croissance rapide et des périodes moins actives. Les follicules pileux en phase télogène retiennent les toxiques plus longtemps que ceux en phase anagène : ces toxiques sont retenus dans les parties proximales des cheveux pendant une période prolongée de plusieurs semaines voire mois, nécessitant une interprétation prudente des résultats. On retrouve aussi une excrétion rapide du toxique dans la sueur et le sébum. Ces caractéristiques peuvent être responsables d'une contamination externe (le risque de contamination par la sueur et la fumée ambiante est plus élevé que chez les adultes) des cheveux, tout le long de la mèche. Cela rend l'analyse segmentaire d'une période chronologique impossible, compliquant la détermination d'une utilisation chronique d'un composé détecté dans le sang ou l'urine des jeunes enfants, ou encore la distinction entre une utilisation chronique et une administration aiguë ou ancienne (empoisonnement)⁵⁵. La diffusion axiale de la substance tout le long de la tige capillaire rendant impossible la datation est la conséquence de cette porosité^{56 57 58}. De ce fait, les seuils de positivité recommandés par la *Society of Hair Testing* pour identifier un usage chronique de stupéfiants chez l'adulte ne peuvent pas être utilisés pour différencier une exposition environnementale d'une administration chez l'enfant⁵⁹.

Néanmoins, la structure interne des cheveux est presque comme celle des adultes dès l'âge de 3 ans, avec un processus de maturation pouvant s'étendre jusqu'à la puberté à la suite de certains facteurs hormonaux, génétiques etc. Cela est suggéré par *Rey-Salmon et Pépin*⁶⁰ qui ont étudié le cas d'un enfant de 8 ans victime d'une soumission chimique pour une agression sexuelle. L'analyse des cheveux récoltés après 5 semaines a révélé la présence de diazépam uniquement dans le segment correspondant à la date des faits. Dans un autre cas, aucune diffusion des composés n'a eu lieu le long de la tige pileuse chez les enfants de plus de 34 mois environ alors que l'incorporation a été observée avant l'âge de 29 mois⁵⁵.

De plus, il a été montré que les cheveux positifs chez les nourrissons pouvaient être dus soit à une contribution in utero, soit à une exposition aiguë à des médicaments pendant l'accouchement. C'est le cas d'un nouveau-né de 1 jour, chez qui a été trouvé dans les cheveux deux composés, l'un provenant d'une exposition in utero (amisulpride, un neuroleptique administré à la mère au cours du premier trimestre et arrêté au cours du deuxième trimestre de la grossesse) et le second venant d'une exposition aiguë (lidocaïne administrée à la mère pendant l'accouchement)⁵⁵.

Malgré ses limites, l'analyse capillaire chez l'enfant reste un outil précieux au sein d'un ensemble d'indicateurs diagnostiques. Il s'agit d'un élément complémentaire renforçant ou corroborant les observations cliniques et autres résultats d'examens.

III-Matériel et méthodes :

1) Conditions analytiques

a. GC-MS/MS

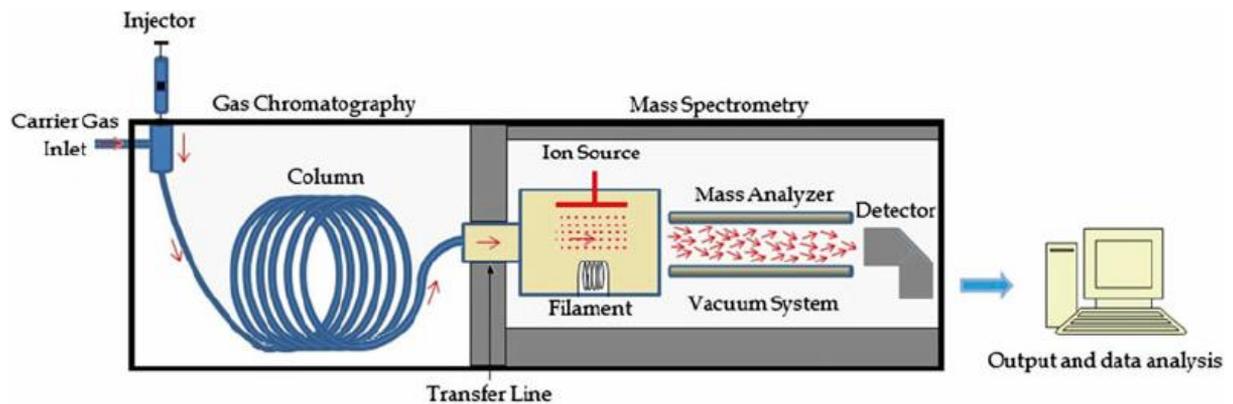


Figure 9 : Principe de la GC-MS/MS ⁶¹

Les travaux ont été réalisés sur un instrument de type chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS) (Figure 9). L'échantillon est vaporisé et injecté dans une colonne chromatographique où les différents composés sont séparés ; ces derniers entrent dans le spectromètre de masse où ils sont ionisés et fragmentés. Les ions produits sont détectés et les données sont traitées pour identification et quantification.

Une condition préalable à la réalisation de GC-MS/MS est que la substance soit suffisamment volatile et stable à haute température. Ces difficultés sont notamment observées pour les molécules contenant des groupes amino (NH₂), hydroxyle (OH) ou carboxyle (COOH) libres. Par conséquent, le cannabis doit généralement être dérivatisé avant analyse en GC-MS pour permettre une détection satisfaisante. L'étalon interne est ajouté à l'échantillon en concentration connue avant l'analyse. Il éprouve les mêmes sources de variation de signal au cours de l'analyse que l'analyte, ce qui permet de les corriger et d'améliorer la précision des résultats. Le

rapport entre le signal de l'analyte et celui de l'étalon interne est utilisé pour la quantification.

Trois méthodes d'analyses ont été réalisées (méthode 1, 2 et 3), elles sont détaillées par la suite.

a.1) GC

La chambre d'injection joue un rôle dans la vaporisation et l'introduction de l'échantillon dans la colonne : l'échantillon liquide est injecté à travers le septum à l'aide d'une micro seringue puis est immédiatement vaporisé dans la chambre qui est à haute température. Le gaz vecteur entraîne les analytes vaporisés vers la tête de colonne. Cette dernière, située dans le four thermique joue un rôle dans la séparation des substances : le four suit une programmation thermique qui permet de séparer en fonction de la température d'ébullition des composés. La température croissante permet l'élution successive des composés par ordre de température d'ébullition croissante. La longueur, le diamètre interne de la colonne et l'épaisseur de la phase stationnaire exercent également une influence sur cette séparation. Ensuite, une ligne de transfert est située entre la GC et la SM pour passer à l'identification.

a.2) MS/MS

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) permet une identification précise des composés grâce à l'utilisation du rapport masse/charge (m/z) comme critère d'analyse standardisé, faisant d'elle une méthode de détection universelle et sélective. La MS/MS offre aussi des limites de détection très basses.

Elle est composée d'une source d'ionisation permettant de générer des ions qui seront ensuite analysés selon leur rapport masse/charge. Pour les ions mono-chargés ($z=1$), qui sont généralement majoritaires à la suite de l'ionisation de petites molécules telles que les cannabinoïdes, la valeur m/z équivaut à la masse de l'ion.

Il existe plusieurs types de sources ioniques utilisables en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse. Celles utilisées dans le cadre de ces travaux sont :

- 1) L'impact électronique (EI) : principalement utilisé pour les composés pouvant passer à l'état gazeux avec une réaction de type $M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$, l'énergie très élevée du faisceau d'électron en fait un procédé très cassant ;
- 2) La NCI (negative chemical ionization ou ionisation chimique négative) utilisée pour le dosage capillaire emploie un gaz réactif intermédiaire (le méthane) qui, bombardé d'électrons, se charge, puis va ioniser les analytes (les électrons sont capturés par les atomes électroattracteurs). La NCI n'est applicable qu'à certaines substances.

Cette source d'ionisation est suivie d'un analyseur de masse à vide poussé de type triple quadripôle : association de deux analyseurs quadripolaires en série, séparés par une cellule de collision souvent constituée d'un quadripôle plus court. Le premier quadripôle (Q1) fonctionne de la même manière que le quadripôle unique dans le GC-MS traditionnel, en sélectionnant les ions selon leur rapport m/z qui seront transmis au deuxième quadripôle (Q2). Ce dernier sert de chambre de collision pour les ions qui ont été préalablement sélectionnés : ils entrent en collision avec un gaz inerte présent dans cet espace. Ces collisions provoquent la fragmentation des ions, générant ainsi de nouveaux fragments ioniques ; et le troisième quadripôle (Q3) est utilisé pour sélectionner et analyser ces nouveaux fragments (Figure 10).

Enfin les ions qui passent à travers l'analyseur de masse sont détectés par un multiplicateur d'électrons (qui amplifie le signal pour produire un courant proportionnel à leur nombre).

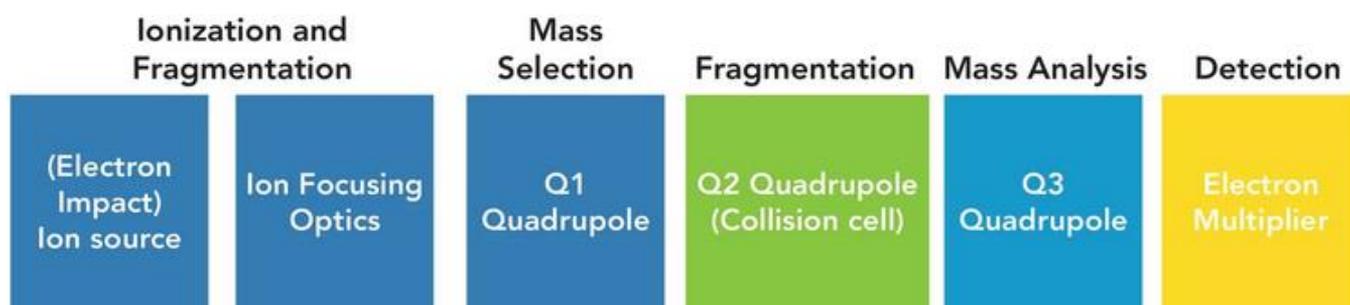


Figure 10 : Différentes étapes de la MS/MS ⁶²

a.3) Avantages et inconvénients

Les avantages de la GC-MS/MS incluent la capacité du GC capillaire à offrir une haute résolution, ce qui permet de bien séparer les pics correspondant à différentes molécules. De plus, elle offre une grande spécificité grâce aux spectres de masse obtenus par ionisation par impact électronique (EI) ou par ionisation chimique négative (NCI). Enfin, la méthode permet une analyse modérément rapide, ne nécessitant que quelques dizaines de minutes par échantillon. L'emploi de la spectrométrie de masse en tandem a l'avantage de pouvoir simultanément cribler et identifier un large éventail d'analytes en une seule analyse par rapport aux spectromètres de masses simples. Cet avantage est particulièrement important lorsqu'on travaille avec de petits volumes d'échantillons, comme c'est le cas ici.

En revanche, la GC-MS/MS est une méthode onéreuse qui demande plus de maintenance que les systèmes de GC classiques. En raison de sa sensibilité élevée et de sa faible limite de détection, la MS/MS exige une attention particulière aux conditions de laboratoire, telles que l'utilisation de gaz vecteurs propres et une préparation minutieuse des échantillons. Lorsque la sensibilité du détecteur est importante et que le bruit de fond instrumental est minimisé (par optimisation des paramètres instrumentaux), les imprécisions liées à la préparation des échantillons et les contaminations potentielles deviennent plus apparentes et peuvent avoir un impact plus significatif sur les résultats de l'analyse. Des composés présents dans l'échantillon peuvent perturber l'ionisation d'autres composés, influençant ainsi la précision des résultats. Ce phénomène est connu sous le nom d'effet matrice.

a.4) Modes d'acquisition

La flexibilité de l'analyseur en triple quadripôle permet de fonctionner selon différents modes d'acquisition. Un système GC-MS/MS peut être utilisé exactement comme un système quadripolaire unique. Les deuxièmes et troisièmes quadripôles peuvent être réglés pour laisser passer les ions sans autre séparation ou réaction : il s'agit souvent de la première étape de la mise au point d'une méthode car elle fournit un chromatogramme complet et les spectres de masse traditionnels des ions parents.

En mode Product Ion Scan (Figure 11), le premier quadripôle (Q1) sélectionne des ions, de manière similaire à la GC-MS traditionnelle. Ensuite, le deuxième quadripôle (Q2) provoque une fragmentation par collision de l'ion sélectionné. Cette fragmentation supplémentaire est analysée en balayant le troisième quadripôle (Q3). Il s'agit d'un outil puissant pour l'analyse qualitative car les fragments plus importants d'un spectre de masse sélectionnés en Q1 peuvent être fragmentés, permettant ainsi d'éliminer certaines interférences. Cela aide à confirmer une structure moléculaire et à sélectionner les transitions lors du développement initial de la méthode.

En mode MRM (« multiple reaction monitoring ») (Figure 11) qui est la méthode la plus sensible ; Q1 et Q3 sont définis pour l'analyse d'ions uniques. Un ion sélectionné par Q1 subit une fragmentation supplémentaire dans Q2, puis un seul fragment est choisi par Q3 lors du balayage. La sélectivité est importante car elle réduit considérablement la probabilité que deux composés, même des isomères apparentés, présentent les mêmes transitions du fragment d'ion précurseur au fragment d'ion produit ainsi que le même temps de rétention dans la colonne. Le MRM fournit également des limites de détection très basses en réduisant considérablement le bruit de fond ⁶². Ce mode MRM est fortement utile lors d'une analyse ciblée, où l'identité de(s) l'analyte(s) est connue et où une sensibilité élevée ou une faible limite de détection est nécessaire, notamment lorsque la matrice de l'échantillon est très complexe, comme c'est le cas dans cette thèse.

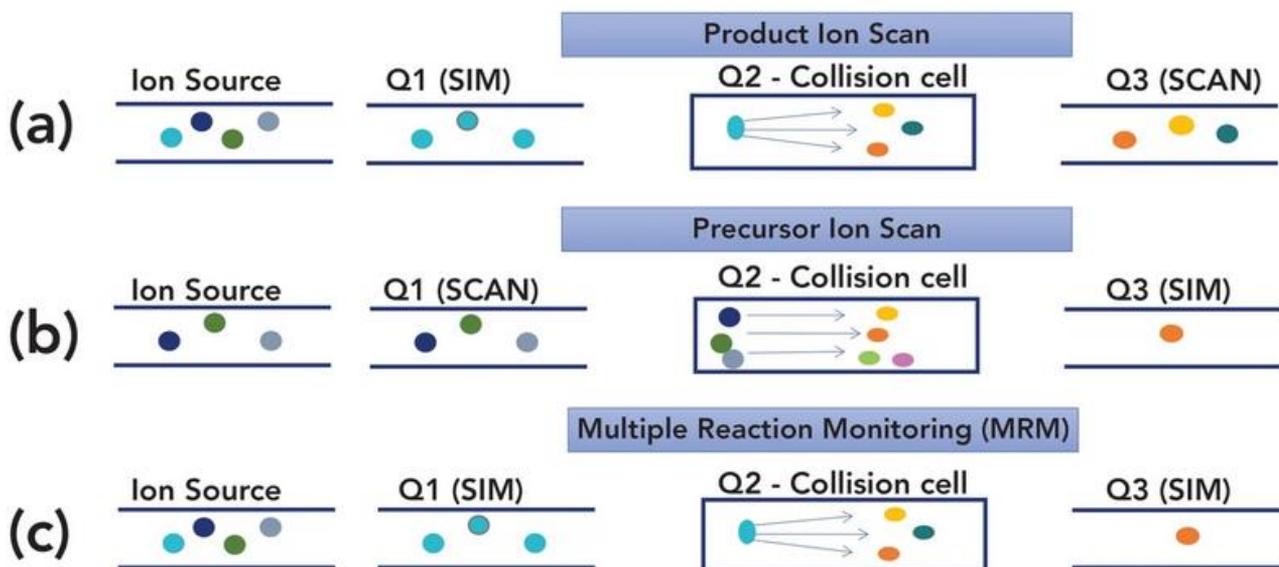


Figure 11 : Différents modes d'acquisitions en GC-MS/MS ⁶²

b. Réactifs

Au cours des différentes étapes de préparations (extraction, dérivation...), il a été utilisé du méthanol VWR INTERNATIONAL, de l'eau ultra-pure milliQ®, de l'acétate d'éthyle VWR INTERNATIONAL, de l'acétonitrile VWR INTERNATIONAL, des sels QuEChERS, du BSTFA SIGMA ; préparé une solution d'acide acétique à 20 % à partir de l'eau ultra-pure milliQ® et d'acide acétique glacial, un solvant d'extraction hexane/acétate d'éthyle (90 :10) afin de récupérer la phase organique.

L'ensemble des solutions mères (au nombre de 8) est fourni par LGC PROMOCHEM avec : THC (référence T-005), 11-OH-THC (référence H-027), THC-COOH (référence T-019), CBD (référence LGCAMP1088.02-01) à une concentration de 1 mg/mL, et leurs produits deutérés correspondants : THC-D3 (référence T-003), CBD-D3 (référence CAY-33075-1MG), 11-OH-THC-D3 (référence H-041) à une concentration de 0.1 mg/mL et THC-COOH-D3 (référence T-008) à une concentration de 1 mg/mL.

c. Paramètres instrumentaux

L'analyse des cannabinoïdes nécessite une méthodologie adaptée à leurs caractéristiques spécifiques. Pour l'analyse dans le sang (sérum, sang total), l'urine et la salive, un protocole est établi tenant compte des particularités de ces matrices liquides (méthode 1). L'analyse dans la matrice capillaire requiert une approche différente des autres matrices en distinguant d'une part, le dosage du THC et CBD (méthode 2) et d'autre part, le THC-COOH (méthode 3) en raison de ses propriétés chimiques différentes qui requièrent une analyse spécifique.

Les travaux ont été réalisés sur un GC-MS/MS de modèle 8040NXNC commercialisé par Shimadzu. La séparation chromatographique est assurée par une colonne HP 5MS (5% Phényl) Méthylpolysiloxane, 30 m x 0.25 mm (0.25 µm de diamètre interne) et de l'hélium comme gaz vecteur inerte à un débit de 1 mL/min.

L'injecteur de la GC est utilisé en mode « splitless » : la vanne de split est maintenue en position fermée pendant cette opération. Il n'y a pas de voie de sortie alternative pour l'échantillon. En conséquence, la totalité de l'échantillon injecté est dirigée vers la colonne capillaire. L'injection est de 2 µL. Ce type d'injection est idéal pour détecter des drogues à très faible concentration et est conçu pour maximiser la sensibilité en minimisant la perte d'échantillon. La pression appliquée à la chambre d'injection est pulsée, ce qui améliore l'efficacité de l'injection et évite la surcharge de l'injecteur par un volume trop important après volatilisation.

La méthode 1 utilise une température d'injecteur à 280° C et un gradient thermique dans le four (60°C pendant 1 minute, puis 30°C/minute jusqu'à 295°C et un palier de 5 minute à 295°C). Les conditions d'études pour la SM comprennent une source d'ionisation à 250°C, un mode d'ionisation via impact électronique. La durée du run est d'environ 14 minutes et la détection se fait en mode MRM (Figure 11).

La méthode 2 utilise un gradient thermique qui diffère de la première méthode (100°C pendant 1 minute, puis 20°C/minute jusqu'à 280°C et 40°C/minute jusqu'à 320°C). La température de l'injecteur, de la source d'ionisation, les conditions d'études pour la SM, la durée du run et la détection sont identiques à la méthode 1.

La méthode 3 utilise une température d'injecteur à 150° C, le même gradient thermique que la méthode 2. Les conditions de masse changent : source d'ionisation à 140°C et utilisation du méthane pour le mode d'ionisation (NCI). Il n'y a pas de

changement pour la durée du run et le mode de détection. Dans le but d'optimiser la quantification du THC-COOH, il a été effectué des infusions en utilisant deux températures distinctes pour la source d'ionisation : 230 °C et 140 °C. Il a été choisi de baisser la température de cette source à 140 °C afin d'améliorer la sélectivité de l'ion précurseur. Cette décision a été prise dans le but d'optimiser la spécificité de l'analyse.

Les transitions MRM pour les composés suivants ont été identifiées par acquisition en Product Ion Scan : THC, OH-THC, THC-COOH et CBD. Ci-dessous, il est retrouvé les différents composés identifiés par MRM lors du développement des méthodes (Tableau 1) (Tableau 2).

Analytes	Transition(s) de quantification	Transition(s) de confirmation	Temps de rétention (min)	Energie de collision (eV)
THC	386.2→371.3		9.67	11
		386.2→315.2		10
		371.3→289.2		10
THC-D3	389.2→374.3		9.67	11
		374.2→292.2		10
		389.2→315.2		10
11-OH-THC	371.2→305.3		10.7	10
		474.3→371.3		9
		305.1→215.2		10
11-OH-THC-D3	374.2→308.3		10.7	10
		477.3→374.3		9
		308.1→218.3		10
THC-COOH	473.3→355.4		11.4	20
		371.2→289.2		13
		371.2→265.2		10
THC-COOH-D3	476.2→358.2		11.4	20
		374.2→292.3		13
		374.2→268.3		10
CBD	337.2→73.1		9.2	23
		390.2→319.2		9
		390.2→229.2		22
CBD-D3	340.2→73.1		9.2	23
		393.2→319.1		9
		393.2→229.2		22

Tableau 1 : Identification des différents composés en mode MRM pour la méthode 1

Analytes	Transition(s) de quantification	Transition(s) de confirmation	Temps de rétention (min)	Energie de collision (eV)
THC	386.2→371.3		9.67	11
		386.2→315.2		10
		371.3→289.2		10
THC-D3	389.2→374.3			11
		374.2→292.2		10
		389.2→315.2		10
THC-COOH	620→492		9.07	12
		620→167		35
		620→383		6
THC-COOH-D3	623→495			12
		623→167		35
		623→386		6
CBD	337.2→73.1		9.2	23
		390.2→319.2		9
		390.2→229.2		22
CBD-D3	340.2→73.1			23
		393.2→319.1		9
		393.2→229.2		22

Tableau 2 : Identification des différents composés en mode MRM pour les méthodes 2 et 3

2) Protocoles de dosage

a. Méthode 1

La préparation de la gamme d'étalonnage a été effectuée à partir des solutions filles de gamme (concentrations allant de 5 à 1000 ng/mL). Elle contient un blanc/P0, 8 points de gamme avec des concentrations allant de 0.5 à 100 ng/mL et 3 CQ (bas, moyen et haut) à des concentrations de 2.5 ; 25 et 75 ng/mL respectivement.

Dans le cadre de cette thèse, il a été réalisé une comparaison de deux techniques d'extraction distinctes. L'objectif principal était de déterminer laquelle des deux méthodes s'avèrait la plus optimale et la plus adaptée à nos besoins :

- à partir d'un échantillon de 500 µL et 20 µL de solution fille d'étalon interne, une extraction liquide/liquide est effectuée à l'aide d'un mélange d'hexane/acétate d'éthyle (90 :10), permettant de récupérer 4 mL de phase organique qui sera ensuite évaporée sous un flux d'azote.

- à partir d'un échantillon de 400 µL et 20 µL de solution fille d'étalon interne, une extraction est réalisée en utilisant 800 µL d'acétonitrile et 80 mg de sels QuEChERS (poudre qui permet une préparation rapide et efficace à base de MgSO₄ et de NaCl), permettant de récupérer 700 µL de phase organique qui sera ensuite évaporée sous un flux d'azote.

Le résidu sec est repris par 30 µL d'acétate d'éthyle et dérivé par 20 µL de BSTFA en étant incubé 30 minutes à 70°C au bloc chauffant. Après refroidissement, la totalité du tube est transférée dans des godets à injection qui sont immédiatement bouchés.

b. Méthode 2 et 3

Du fait du risque d'incorporation externe de xénobiotiques, une étape préliminaire de décontamination du cheveu est nécessaire. Pour ce faire, la mèche de cheveux est trempée dans 5 ou 10 mL d'eau purifiée à température ambiante environ 2 minutes puis séchée entre 2 papiers absorbants. Ensuite la mèche est lavée dans 5 ou 10 mL de dichlorométhane (selon la taille de la mèche) pendant deux minutes, puis séchée entre 2 papiers absorbants ou à l'étuve : l'opération est à répéter deux fois. Le dernier volume de rinçage au dichlorométhane est conservé pour une analyse ultérieure et est examiné de la même manière que les échantillons de cheveux correspondants. Un rapport des concentrations de la substance dans le lavage par rapport aux cheveux peut être utilisé pour différencier une contamination passive d'une incorporation systémique.

Pour l'extraction, le dosage nécessite au minimum 50 mg de prélèvement capillaire (la sensibilité est compromise dès qu'on n'a pas cette quantité de cheveux, en dessous de 10 mg pour d'autres études ^{63 64}) ainsi que 20 µL de solution fille d'étalon interne. Les prélèvements capillaires préparés subissent une hydrolyse en milieu basique en utilisant 1 mL de NaOH 1N, chauffés au bain-marie pendant 15 minutes à ébullition.

Une extraction liquide-liquide à l'aide d'un mélange de 7 mL d'hexane/acétate d'éthyle (90 :10) est réalisée pour récupérer le THC et le CBD dans la phase organique. La phase organique est réservée pour la réalisation de la méthode 2, on l'évapore sous un flux d'azote. Le résidu sec est repris par 30 µL d'acétate d'éthyle et dérivé par 20 µL de BSTFA en étant incubé 30 minutes à 70°C au bloc chauffant. Après refroidissement, la totalité du tube est transférée dans des godets à injection qui sont immédiatement bouchés.

Pour la réalisation de la méthode 3, il est rajouté 1 mL d'acide acétique glacial à 20% à l'hydrolysats restant après récupération de la phase organique de la méthode 2 ; et ce dernier est vortexé pour doser les métabolites 11-OH-THC et THC-COOH. Cette étape est suivie d'une seconde extraction en milieu acide avec un mélange de 7 mL d'hexane et d'acétate d'éthyle (90 : 10), récupération de la phase organique, puis évaporation sous azote. L'utilisation du tampon acétate permet d'ouvrir les liaisons disulfures, facilitant l'extraction des analytes par la dispersion de la mélanine capillaire et la dissociation des complexes protéiques.

Le résidu sec est dérivé par 50 µL de PFPA et 35 µL de HFIP (Figure 12) en étant incubé 30 minutes à 70°C au bloc chauffant. Le PFPA et le HFIP sont idéaux pour l'ionisation en mode NCI du fait de la présence de groupements fluorés fortement électroattracteurs. Une nouvelle évaporation sous azote est effectuée suivie d'une distribution de 50 µL d'acétate d'éthyle après refroidissement des tubes. La totalité de chaque tube est transférée dans des godets à injection.

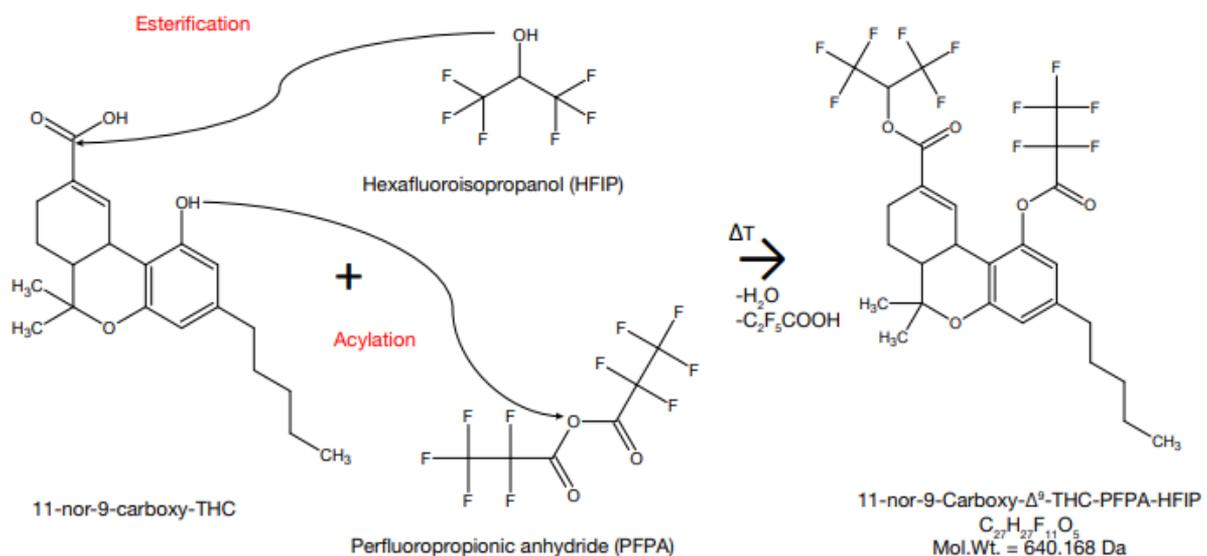


Figure 12 : Réaction chimique pour la dérivation du THC-COOH ⁶⁵

Pour la méthode 2, la gamme d'étalonnage est composée d'un blanc et de 7 points de gamme allant de 50 à 10000 pg/mg de cheveux : 50 mg de cheveux sans drogue sont utilisés pour chaque point accompagné d'un volume de surcharge allant d'une concentration de 0.05 à 5 mg/L. Trois niveaux de CQ ont été utilisés (composés de 50 mg de cheveux sans drogue) : CQ bas à une concentration de 200 pg/mg de THC et CBD, CQ moyen à 2000 pg/mg ; et CQ haut à 8000 pg/mg. La courbe d'étalonnage a été calculée en utilisant les données de chaque point de gamme.

Pour la méthode 3, la gamme d'étalonnage est composée d'un blanc et de 7 points de gamme allant de 0.2 à 40 pg/mg de cheveux : 50 mg de cheveux sans drogue sont utilisés pour chaque point accompagné d'un volume de surcharge allant d'une concentration de 0.0002 à 0.02 mg/L. Trois niveaux de CQ ont été utilisés (composés de 50 mg de cheveux sans drogue) : CQ bas à une concentration de 0.8 pg/mg de 11-OH-THC et THC-COOH ; CQ moyen à 8 pg/mg ; et CQ haut à 32 pg/mg. La courbe d'étalonnage a été calculée en utilisant les données de chaque point de gamme.

Le contrôle de la qualité pour l'analyse quantitative des cheveux est généralement plus difficile par rapport au sang et à l'urine. Cela est dû en grande partie à la nature solide et à la composition hétérogène du matériel d'échantillonnage. De plus, la quantité de matériau de référence authentique est généralement insuffisante.

3) Retraitement des données

Le logiciel de retraitement de données Insight® a été utilisé pour analyser les composés étudiés. Les analytes sont quantifiés en intégrant le pic correspondant à leur aire. La courbe d'étalonnage est modélisée par régression quadratique avec zéro non forcé, ce qui permet à la régression de déterminer librement la valeur de l'ordonnée à l'origine. Cela peut faciliter l'ajustement des données, ce qui est utile dans les cas où les mesures peuvent ne pas être nulles, même en l'absence d'analytes. De plus, un facteur de pondération $F = 1/C$ est appliqué afin de minimiser l'effet levier, c'est à dire éviter un effet trop important des points à concentration élevée sur la pente de la courbe par rapport aux points de faible concentration.

4) Critères pour la validation de méthode

Les critères et valeurs seuils pour la validation de méthode s'appuient essentiellement sur les recommandations de la FDA (Food and Drug Administration)⁶⁶, reconnue comme une autorité de référence à l'échelle mondiale. Ses recommandations jouent un rôle dans l'uniformisation des pratiques de validation de méthodes analytiques.

La validation de méthode complète n'a pu aboutir que pour le THC et CBD capillaires. Dans le cas des cannabinoïdes dans le sang total, l'urine et le sérum, seule la répétabilité, la spécificité et la dilution ont pu être réalisés. Une validation partielle, focalisée sur l'exactitude a été effectuée pour le THC-COOH capillaire par manque de temps.

Résumé des critères de validation réalisés pour chaque méthode

Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3
Répétabilité : sérum et urine Spécificité	<u>Validation de méthode complète</u> : répétabilité, reproductibilité, justesse, spécificité, effet mémoire, contribution isotopique, stabilité de l'injecteur	Exactitude

a. Répétabilité

La répétabilité se réfère à la capacité d'une analyse à produire le même résultat lorsqu'elle est répétée dans des conditions de mesure identiques sur une courte période. Elle est évaluée à l'aide de l'écart type ou du coefficient de variation (CV), ce dernier étant plus facile à interpréter. Un CV plus bas indique une méthode plus précise et il est adopté un CV maximal de 15 % pour les validations de méthode.

Méthode 1 : la répétabilité comprend la réalisation de la gamme d'étalonnage réalisée sur sérum. Pour chaque niveau de concentration (à 2,5, 25 et 75 ng/mL) et

chaque matrice, deux CQ ont été préparés. Cela résulte en un total de 18 contrôles qualité. Il a été préparé en plus le point 1 de la gamme (à 0.5 ng/mL) deux fois pour chaque matrice (soit 6 fois au total), nommé CAL1. Chaque CQ ainsi que le premier point de gamme ont été injecté 5 fois dans la GC-MS/MS, ce qui permet d'obtenir une répétabilité sur 10 injections pour les trois niveaux de chacune des trois matrices et pour le premier point de gamme.

Méthode 2 : le même procédé a été employé : il a été réalisé une répétabilité sur 10 points et calculé le CV des concentrations mesurées pour chaque niveau.

b. Reproductibilité

Méthode 2 : deux CQ sont extraits pour chaque niveau de concentration (soit un total de six), préparés en parallèle de la gamme d'étalonnage et des autres analyses (spécificité, contribution isotopique, etc.). Cette analyse résulte de la fidélité des résultats d'une expérimentation avec des moments, opérateurs et lieux différents. On calcule l'écart type, le CV (à partir de la dispersion des concentrations mesurées) comme pour la répétabilité avec un seuil à 15%. Elle a été réalisée sur 5 séries sur 5 jours (une préparation des CQ, points de gamme chaque fois).

c. Justesse

La justesse exprime l'écart entre la moyenne de résultats et une valeur conventionnellement vraie (dans ce cas, les valeurs des CQ/CAL1 de la gamme préparée). Celle-ci s'exprime par le biais (généralement en pourcentage pour une meilleure lisibilité), on accepte jusqu'à un seuil de 20 %.

Méthode 2 : les biais de justesse ont été calculés sur les résultats de reproductibilité décrits précédemment, en comparant les moyennes des valeurs mesurées aux concentrations théoriques des CQ.

d. Spécificité

La spécificité est la capacité de l'analyse à rendre un résultat négatif lorsque l'échantillon est vierge en cannabinoïdes. Ce critère de validation correspond à la division de la moyenne des signaux des échantillons blancs par le signal du point le moins concentré de la gamme pour chaque analyte. On tolère un seuil maximum de 10% de signal.

Méthode 1 : six échantillons de sérum ont été sélectionnés pour l'étude. Ces échantillons proviennent de patients dont les analyses par LC-MS/MS n'ont révélé aucune trace de cannabinoïdes. L'extraction des sérums a été effectuée en remplaçant la solution fille d'étalon interne par du méthanol.

Méthode 2 : faute de disposer d'une quantité suffisante de cheveux vierges de patients dans le laboratoire, un pool a été constitué à partir de cheveux de deux personnes non-consommatrices différentes. À partir de ce pool, six échantillons ont été soumis à la méthode 2 pour analyse.

e. Contribution isotopique

La contribution isotopique permet d'évaluer l'impact de l'étalon interne marqué isotopiquement sur l'analyte et inversement, en particulier sur les variations du signal.

Méthode 2 : en complément de la gamme d'étalonnage, deux échantillons supplémentaires sont préparés, ils correspondent aux concentrations la plus basse et la plus élevée de la gamme, mais sont extraits sans ajout d'étalon interne. On calcule un biais pour cette contribution isotopique. Cela s'applique à la contribution de l'étalon interne sur la molécule, où l'on divise le signal sur point 0 avec l'étalon interne par celui du point 1 sans étalon interne ; ainsi qu'à la contribution de la molécule sur l'étalon interne, où l'on divise le signal de l'étalon interne sur le point 7 sans étalon interne par celui du point 0 avec étalon interne. Ce rapport ne doit pas dépasser 10 %.

f. Dilution

Lorsque les concentrations en xénobiotiques mesurées sont supérieures à la limite supérieure de la gamme d'étalonnage, la justesse de la quantification ne peut être assurée. Dans ce cas, l'échantillon peut être dilué afin de ramener sa concentration dans la gamme, en particulier lorsque la substance est biologiquement active et sa concentration est corrélée à l'effet clinique. Cette dilution doit être validée au préalable. Ce critère n'a pas été évalué pour la matrice cheveu du fait de la faible probabilité de retrouver des concentrations capillaires chez les cas analysés au-delà de la limite de linéarité, et du faible apport diagnostique : l'intérêt étant de savoir si on retrouve des cannabinoïdes au-delà du seuil de positivité.

Méthode 1 : un contrôle qualité dilué (CQD) a été préparé à la concentration de 200 ng/mL (supérieur au point le plus concentré de la gamme :100 ng/L) afin de voir le potentiel impact d'une dilution sur les signaux. Ce CQD est dilué au 1/10 dans du sérum, ce qui donne une concentration de 20 ng/mL. Cette opération est répétée pour 6 échantillons de CQD. L'extraction des CQD suit la même procédure que celle d'un échantillon standard et l'injection dans l'appareil est réalisée après les trois niveaux de CQ de la gamme d'étalonnage. Le potentiel impact d'une dilution à partir du point le plus haut de la gamme est analysé à partir du CV (CV autorisé jusqu'à 15%) et de la justesse (biais autorisé jusqu'à 20%) calculée pour les 6 CQD.

g. Effet mémoire

L'effet mémoire se traduit par la présence de pics non souhaités lors de l'injection d'un blanc après le passage d'un échantillon très concentré. Cet effet mémoire est principalement causé par la seringue ou l'injecteur de la GC. Des connexions incorrectes sur la vanne d'injection peuvent entraîner des volumes morts où certains produits peuvent s'accumuler.

Méthode 2 : trois blancs (acétate d'éthyle) ont été injectés successivement après l'injection du point le plus concentré de la gamme d'étalonnage dans l'appareil, afin

de quantifier cet impact. On autorise un seuil de contamination à 1% qui est calculé en prenant la moyenne du signal du point haut de gamme ainsi que le signal moyen des trois blancs.

h. Stabilité sur l'injecteur

La stabilité des cannabinoïdes dans les matrices biologiques a déjà été éprouvée dans la littérature : plusieurs jours pour le sang et l'urine ^{67 68}, plusieurs dizaines d'heures pour la salive⁶⁹, et de durée quasi infinie pour le cheveu si les conditions de conservations sont correctes ⁶⁷. Il demeure néanmoins nécessaire de valider la stabilité de l'extrait, qui est spécifique de notre méthode de dosage sur l'injecteur à température ambiante pendant 24h, afin d'éliminer une éventuelle instabilité au cours d'une série d'analyse.

Méthode 2 : il est réinjecté vingt-quatre heures plus tard les extraits préalablement constitués (gamme d'étalonnage, CQ...) afin d'observer ou non un impact sur les aires, les temps de rétention. On calcule le CV (seuil à 15%) et la justesse (biais autorisé de 20%).

5) Modalités de prélèvement capillaire

Le prélèvement vise à confirmer une exposition chronique ou ancienne au cannabis sur une période, allant de plusieurs semaines à plusieurs mois en fonction de la longueur des cheveux recueillis. Le prélèvement est réalisé au sommet postérieur de la tête, nommé vertex car ce dernier présente une croissance capillaire plus constante comparée aux autres régions du cuir chevelu ainsi qu'une proportion réduite de cheveux en phase télogène. La quantité recueillie est équivalente à une épaisseur de crayon ⁷⁰, ou des mèches d'environ 100 cheveux selon la *Society of Hair Testing* (SoHT). La coupe se fait avec des ciseaux de façon nette, le plus près possible de la peau (ne pas arracher les cheveux). La SoHT recommande que le prélèvement soit effectué par une personne qualifiée portant des gants lors de la manipulation des cheveux, dans un environnement sécurisé sans risque de

contamination et avec des restrictions d'accès. Un kit de collecte de cheveux doit être fourni. Celui-ci inclut un formulaire pour assurer la traçabilité et l'intégrité d'un échantillon, une enveloppe de collecte et de transport, ainsi que des instructions pour le prélèvement d'un échantillon de cheveux. La personne doit être correctement identifiée et confirmée via signature écrite. La couleur, la longueur (pour les dreadlocks, il est recommandé d'appliquer un traitement plus intensif pendant la phase de digestion), le site de collecte, les traitements cosmétiques/capillaires, médicamenteux (avant/depuis les faits) doivent être enregistrés. L'échantillon de cheveux doit être aligné de manière que l'extrémité ou la racine soit clairement identifiée, en orientant la mèche de manière que les cheveux restent groupés, noués avec une cordelette à environ 1 cm de la racine. L'échantillon doit être séché avant d'être stocké et protégé de la lumière du soleil en étant enveloppé dans du papier aluminium. Il est conseillé de prélever deux mèches de cheveux afin de confirmer les résultats du premier en cas de contestation, même si les substances sont relativement stables dans les cheveux. Le prélèvement doit être effectué au moins 4 à 6 semaines après l'incident présumé ; un prélèvement au moment proche des faits est également souhaité pour comparaison. Pour l'analyse, la mèche peut être segmentée avec des longueurs progressivement croissantes, correspondant chacune à des périodes chronologiques (aux alentours d'un mois par centimètre de cheveu).

Le sujet ne doit pas se couper les cheveux entre les collectes de cheveux ou jusqu'à ce que les enquêtes soient terminées.

IV-Résultats :

1) Méthode 1

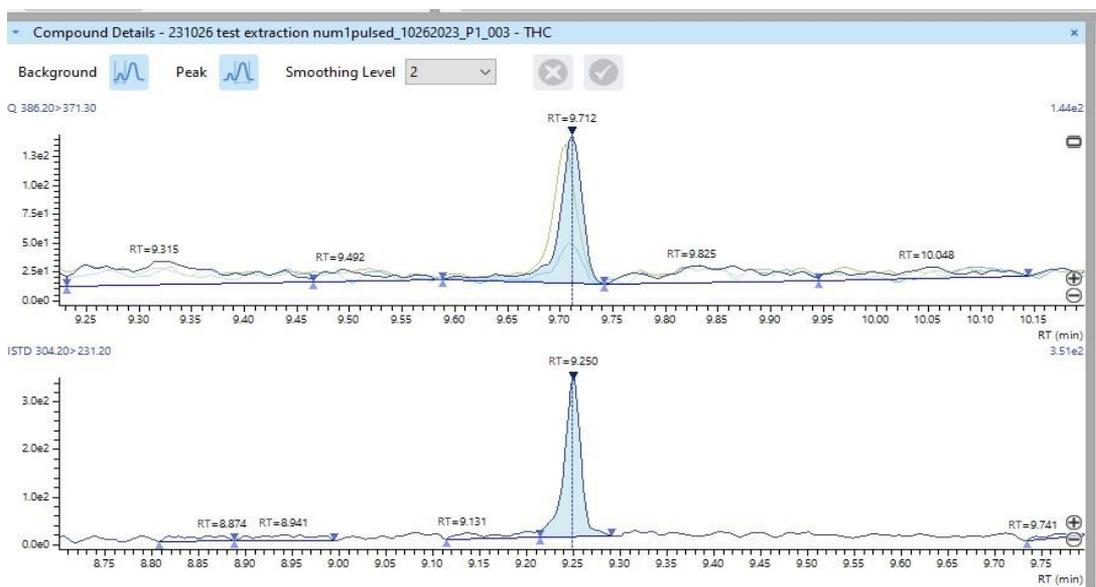
a. Sérum

Après extraction liquide/liquide, les quatre composés ont été facilement identifiés dès le premier point de gamme (à faible concentration), grâce à leur temps de rétention et aux pics de quantification et de confirmation. L'intégration des pics par leur aire a

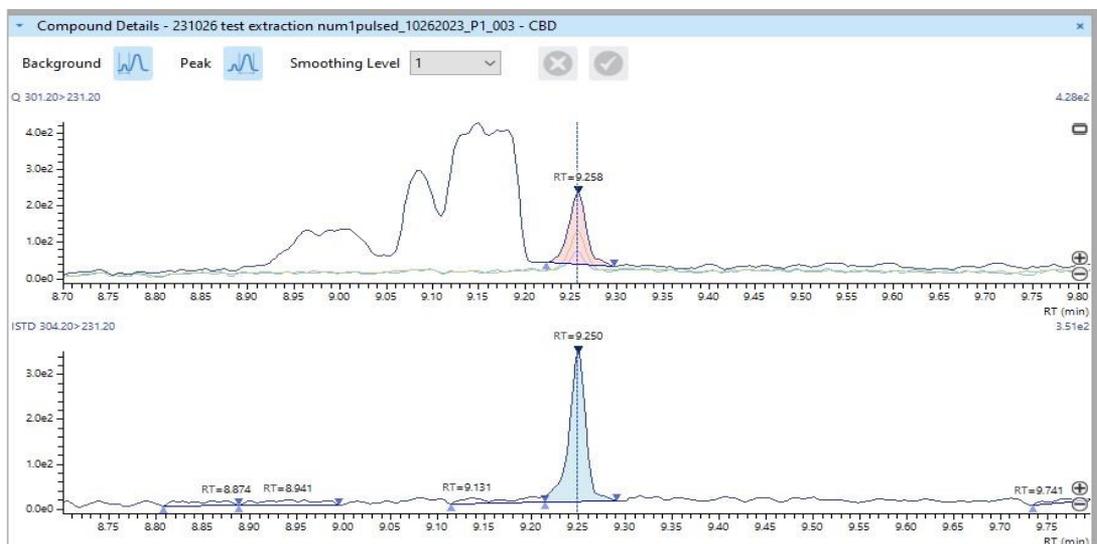
donné des résultats satisfaisants, avec des valeurs autour de 3×10^2 coups par seconde (cps) pour le premier point de gamme P1, comme illustré dans les images suivantes.

Signaux P1 des 4 cannabinoïdes (0.5 ng/mL) en extraction liquide/liquide : le tracé noir correspond à la transition de quantification, la barre en pointillé bleu indique le temps de rétention attendu sur les 4 images suivantes

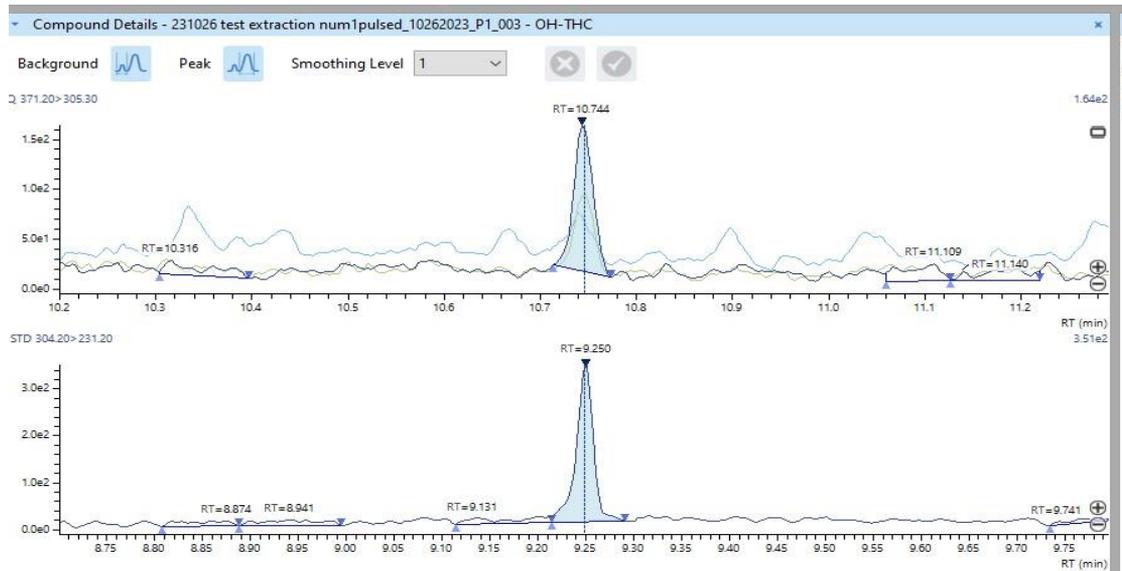
THC



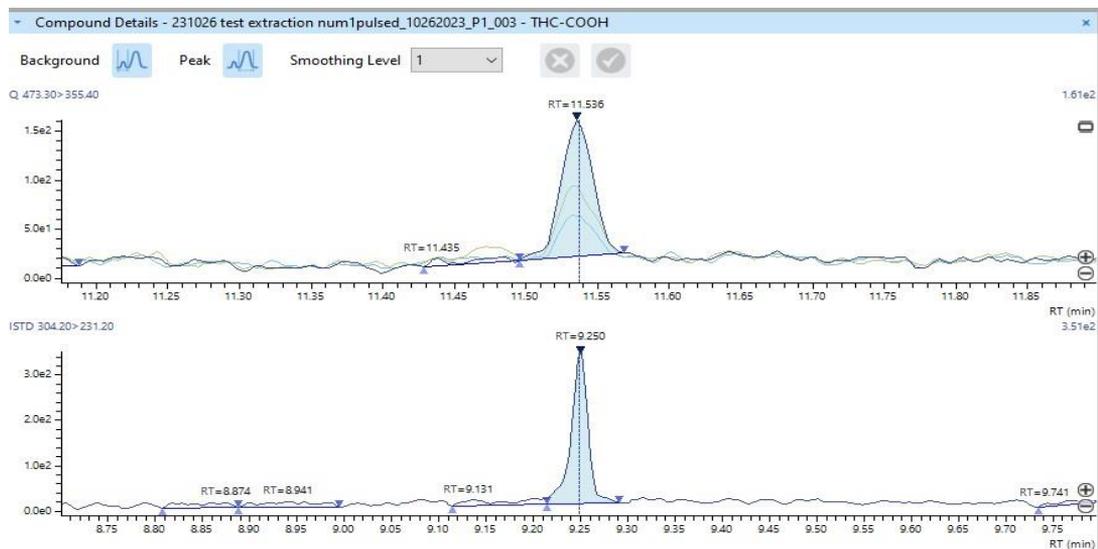
CBD



11-OH-THC



THC-COOH

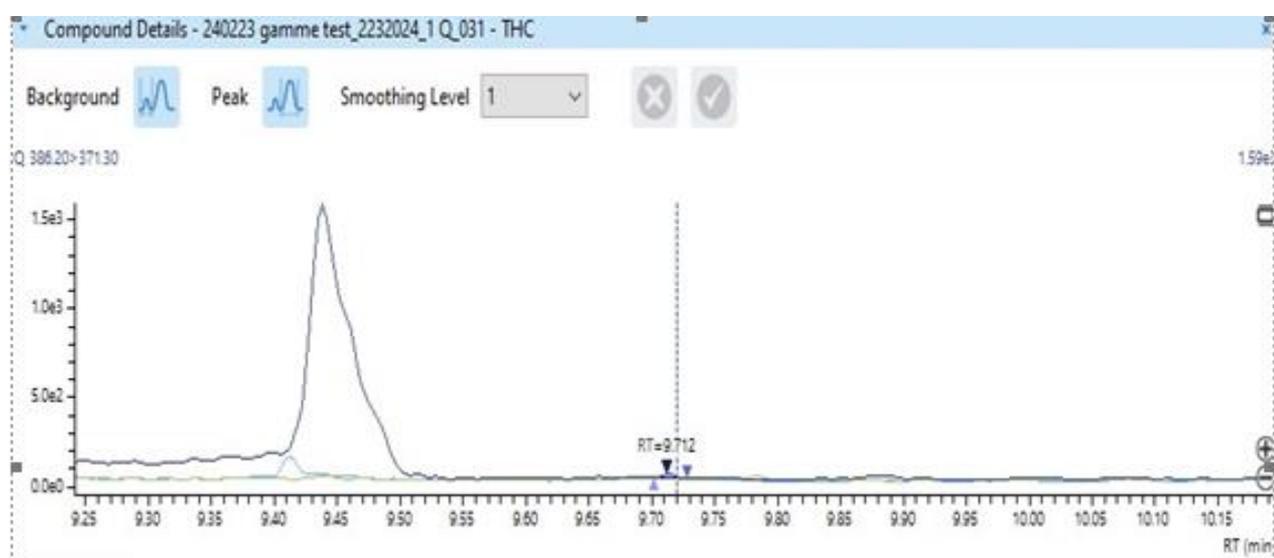


En revanche, en utilisant la méthode d'extraction avec les sels QuEChERS, il est difficile de distinguer les pics du bruit de fond. Par conséquent, l'intégration des pics pour le premier point de la gamme n'est pas réalisable notamment pour le THC et le CBD. Avec l'usage prolongé de l'appareil au cours du temps, la capacité de détection pourrait se dégrader ce qui augmenterait le risque de ne pas repérer correctement les points bas par diminution de sa sensibilité. De plus, des erreurs de validation technique peuvent arriver en raison de la faible aire des composés et d'une potentielle intégration d'autres composés en plus de la molécule ciblée. Ce manque

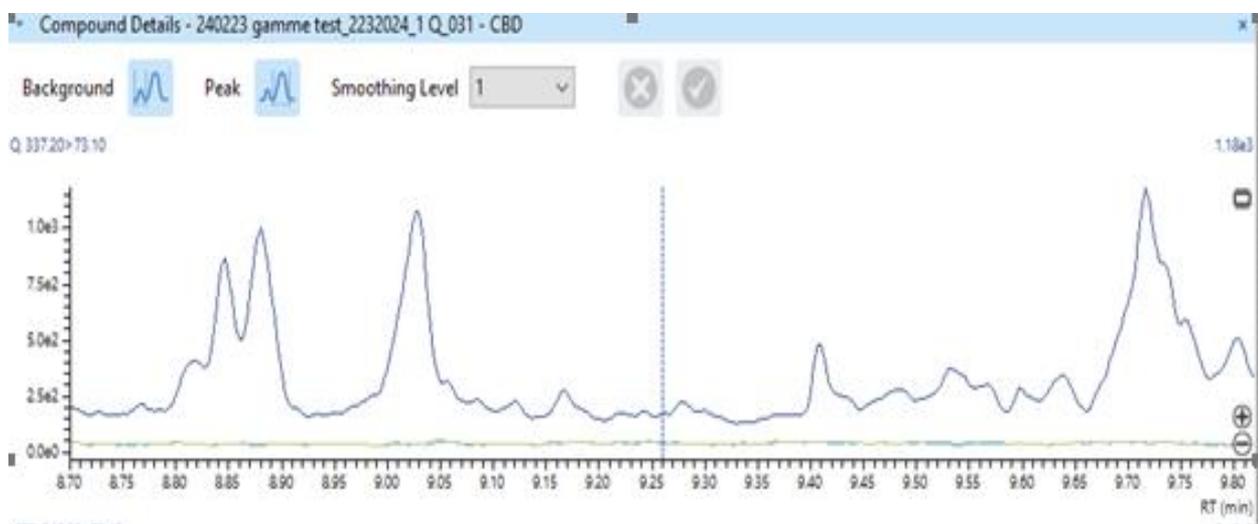
de sensibilité illustré dans les images suivantes s'explique par un facteur de dilution plus important avant évaporation qu'en extraction liquide/liquide. Il a donc été décidé de se concentrer sur l'extraction liquide/liquide de la méthode 1.

Signaux P1 des 4 cannabinoïdes par méthode utilisant les sels QuEChERS :
le tracé noir correspond à la transition de quantification, la barre en pointillé bleu indique le
temps de rétention attendu sur les 4 images suivantes

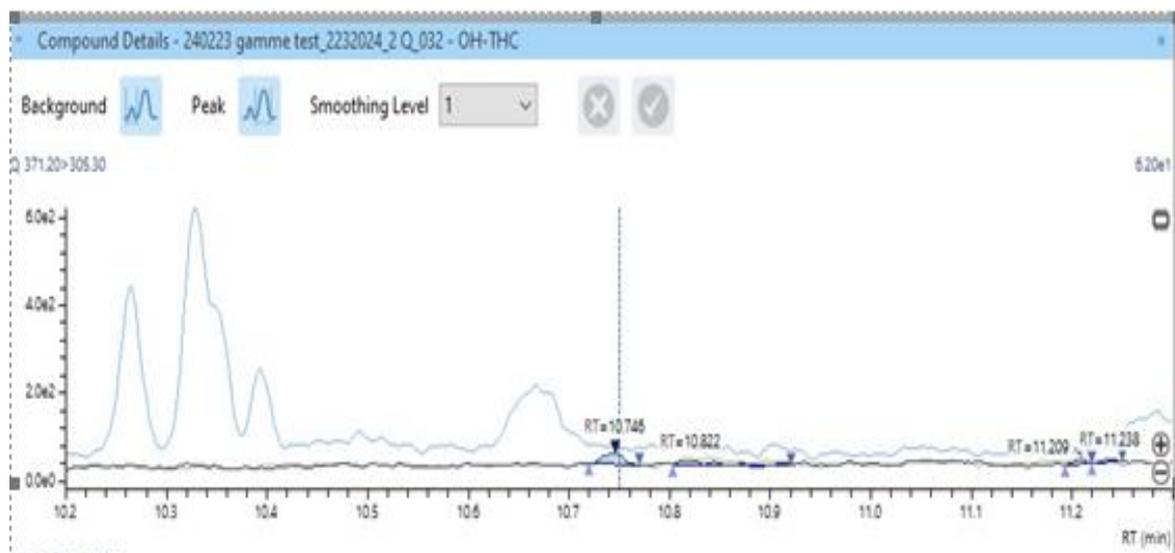
THC



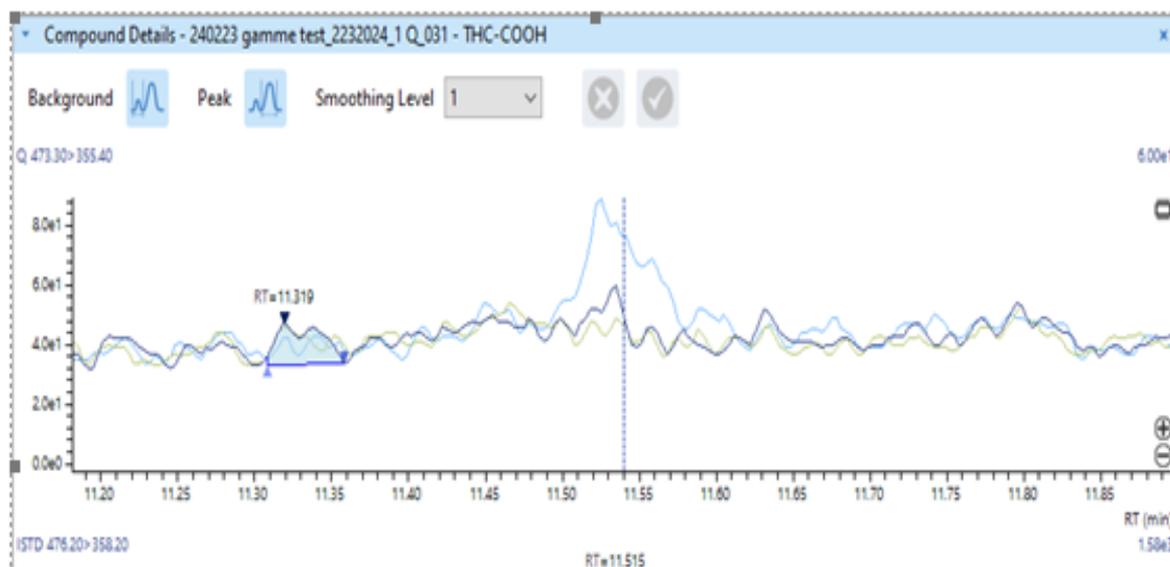
CBD



11-OH-THC



THC-COOH



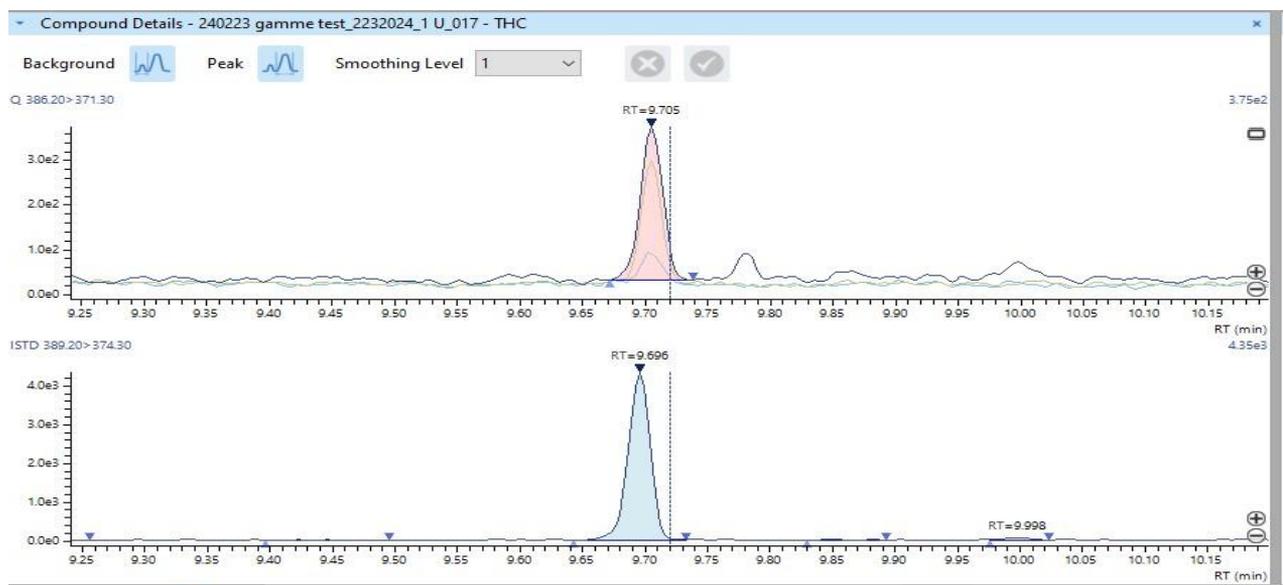
b. Urine

Concernant l'extraction liquide/liquide, comme pour le sérum, la sensibilité aux premiers points de gamme est satisfaisante. Les pics présentent une bonne

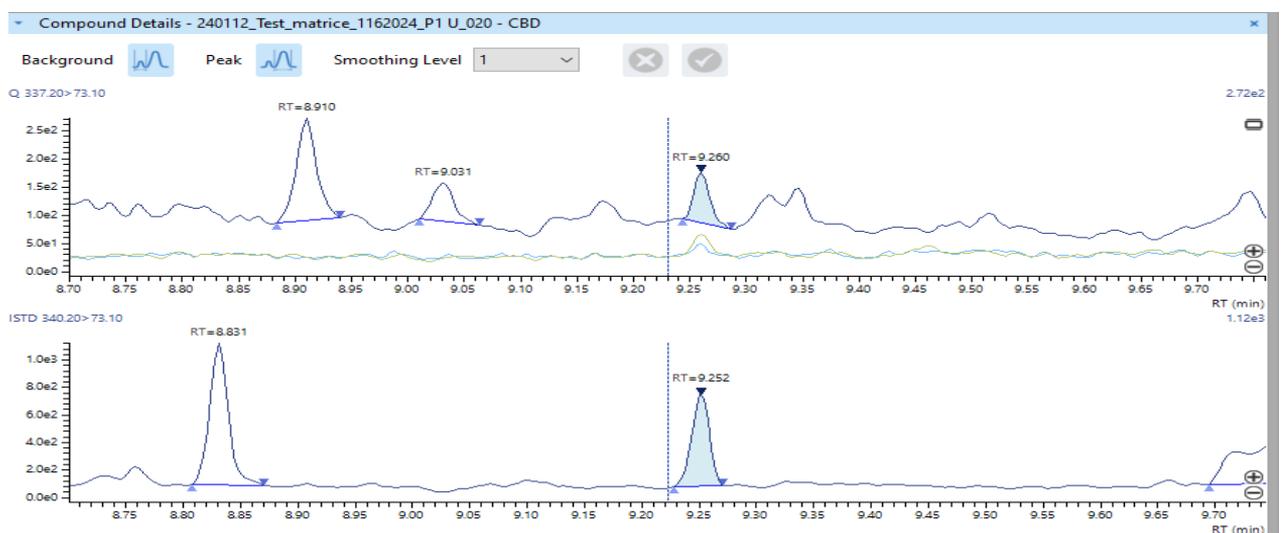
résolution, se distinguant aisément du bruit de fond avec une aire satisfaisante pour chaque composé (images ci-dessous).

Signaux P1 des 4 cannabinoïdes (0.5 ng/mL) en extraction liquide/liquide : le tracé noir correspond à la transition de quantification, la barre en pointillé bleu indique le temps de rétention attendu sur les 4 images suivantes

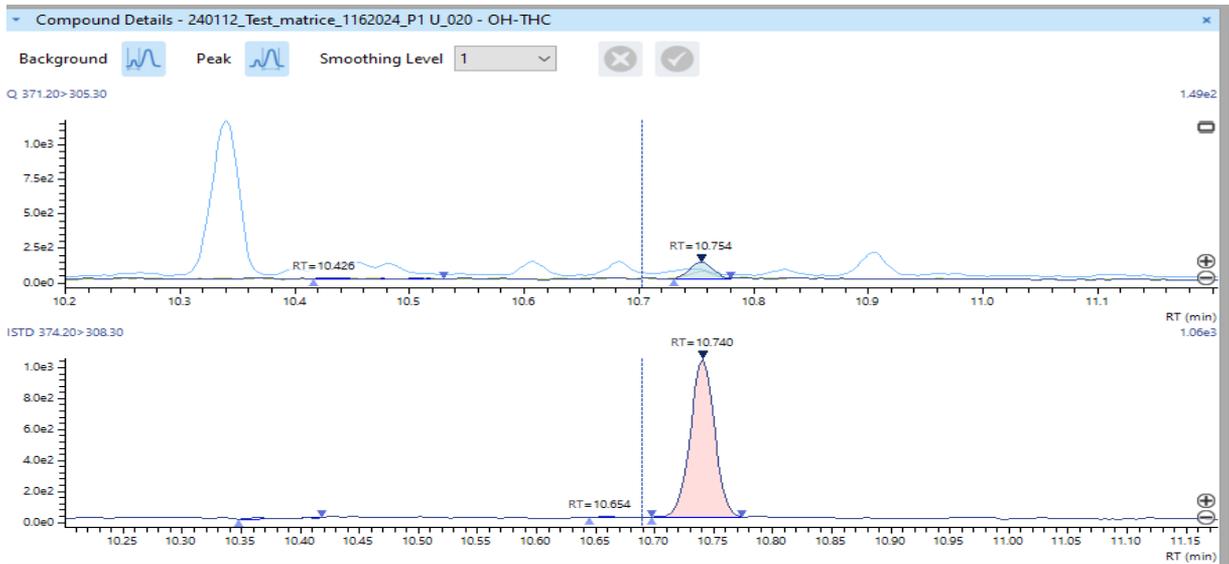
THC



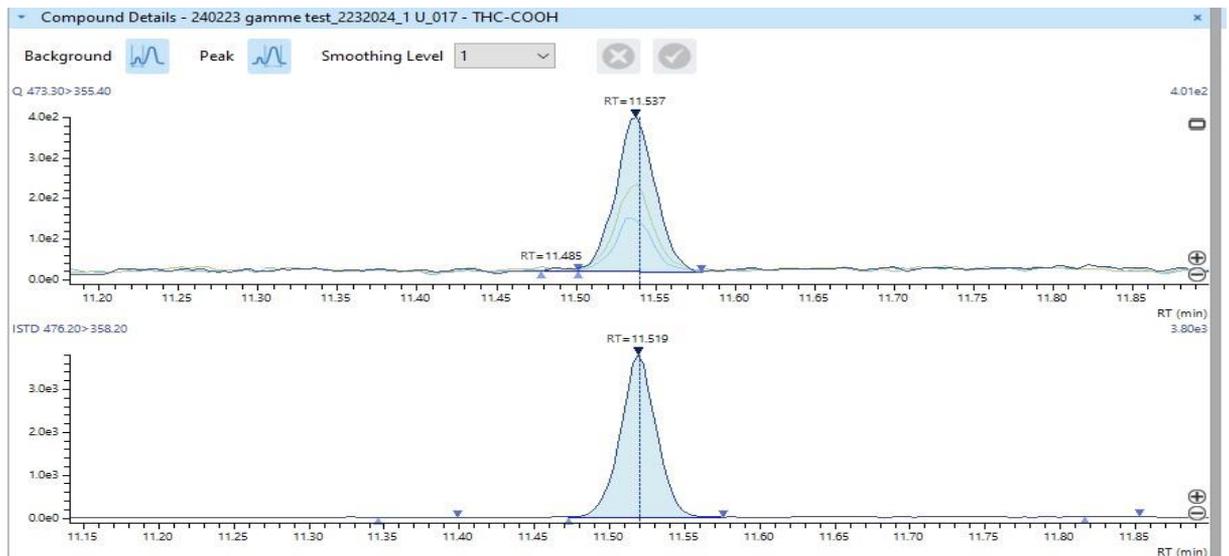
CBD



11-OH-THC



THC-COOH

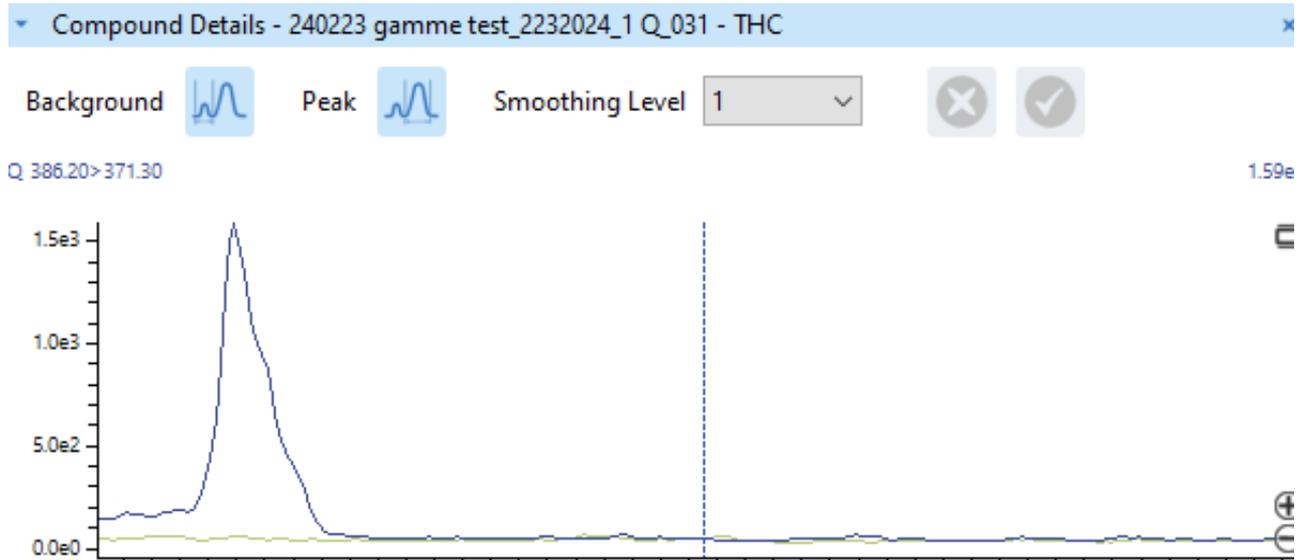


Nota Bene : des décalages des pics par rapport au temps de rétention attendu peuvent avoir lieu en fonction du vieillissement ou de l'encrassement de la colonne.

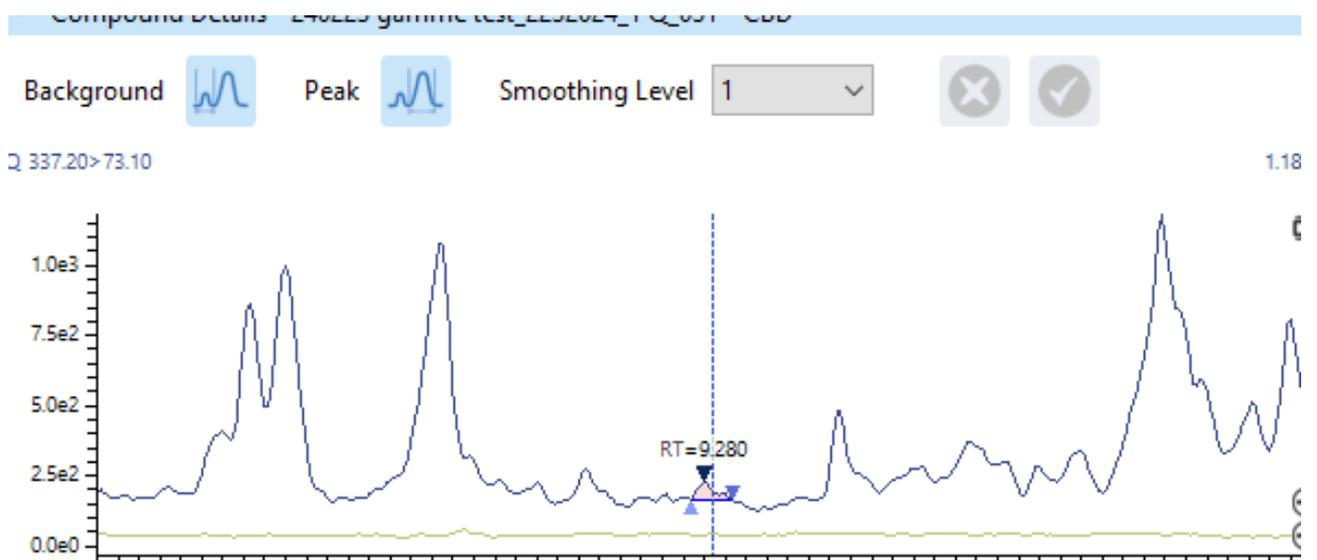
En utilisant les sels QuEChERS, on retrouve le même problème de sensibilité présent dans le sérum.

Signaux P1 des 4 cannabinoïdes par méthode utilisant les sels QuEChERS :
le tracé noir correspond à la transition de quantification, la barre en pointillé bleu indique le
temps de rétention attendu sur les 4 images suivantes

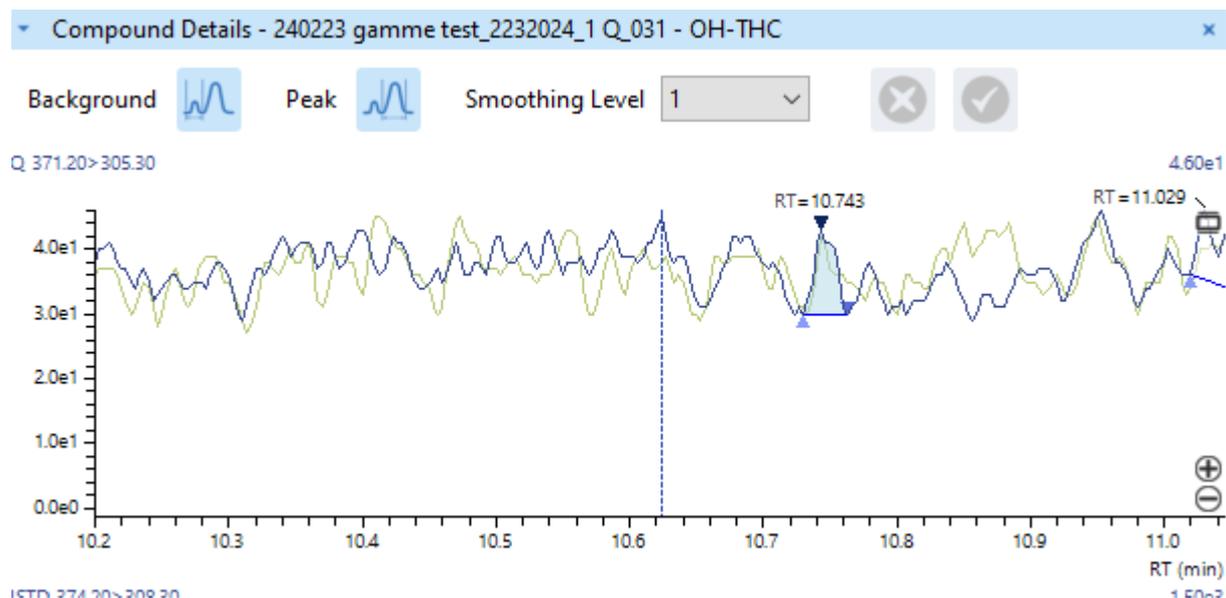
THC



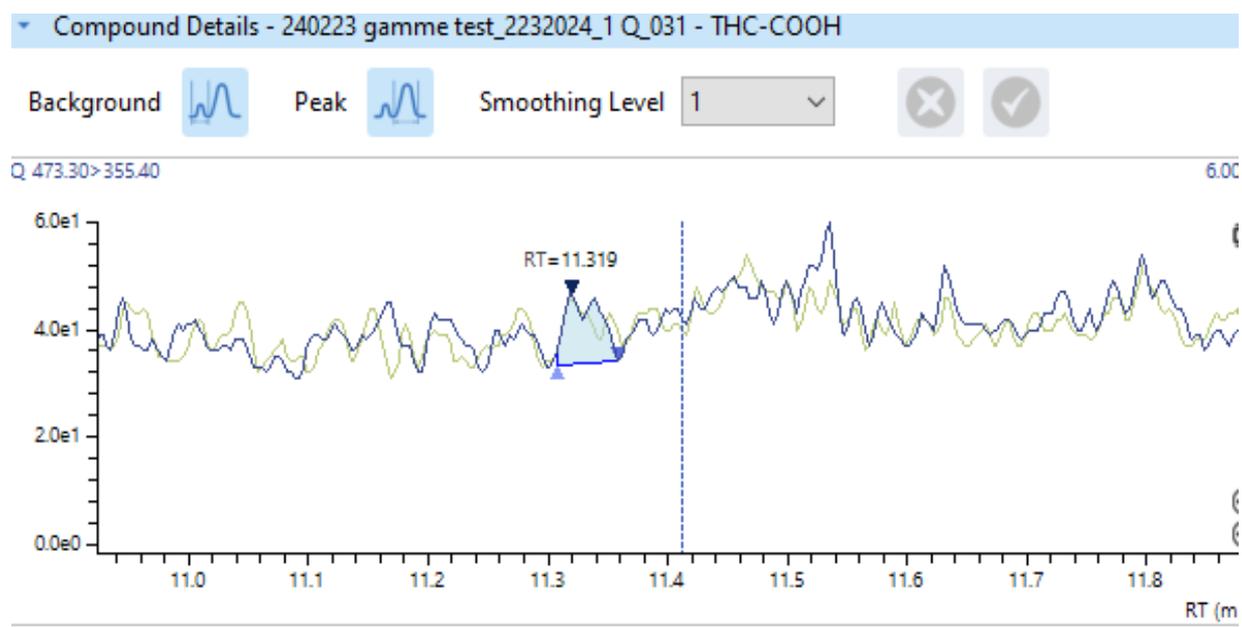
CBD



11-OH-THC



THC-COOH



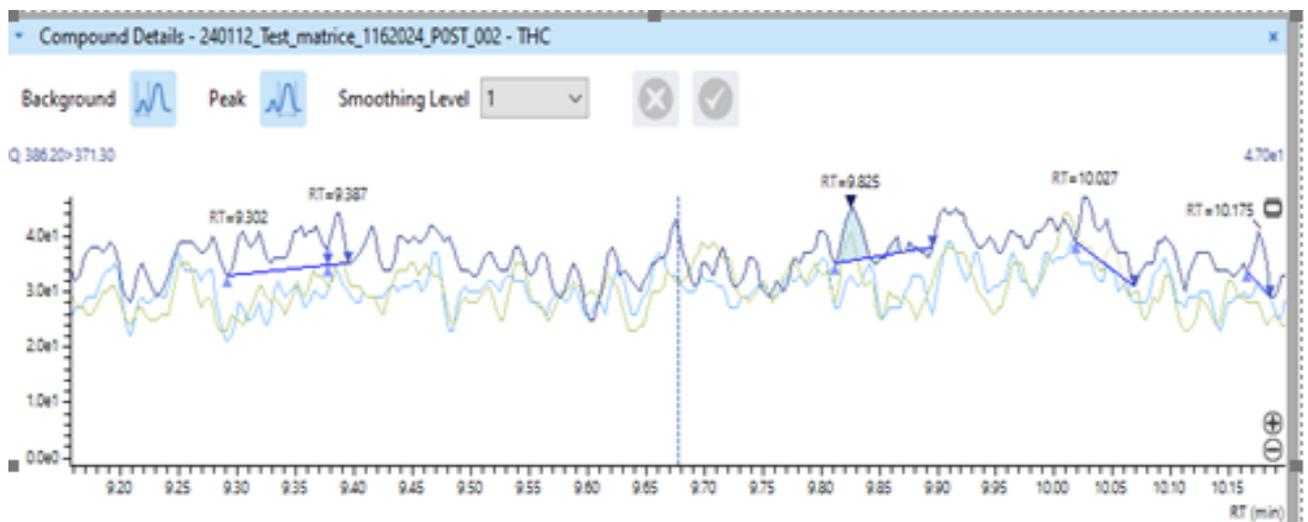
c. Sang total

Après extraction liquide/liquide, le THC-COOH est détecté à la limite inférieure de concentration de 0.5 µg/l. Cependant, la sensibilité souhaitée n'est pas atteinte pour

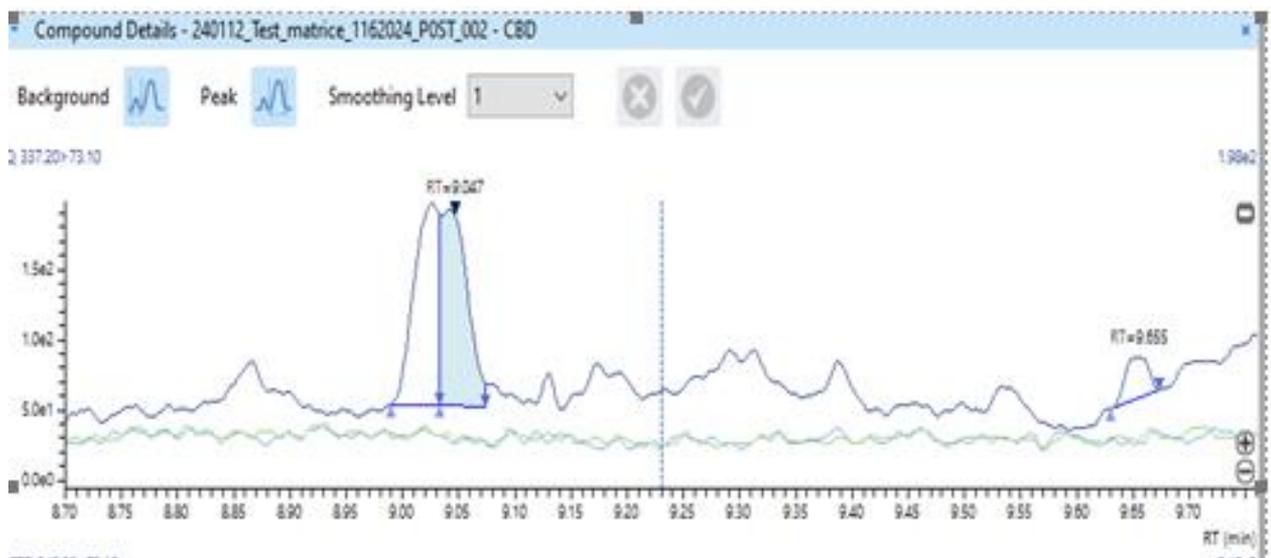
les trois autres cannabinoïdes, le bruit de fond affecte la détermination des faibles concentrations. Les causes de ce problème sont expliquées dans la partie «Discussion».

Signaux P1 des 4 cannabinoïdes en extraction liquide/liquide : le tracé noir correspond à la transition de quantification, la barre en pointillé bleu indique le temps de rétention attendu sur les 4 images suivantes

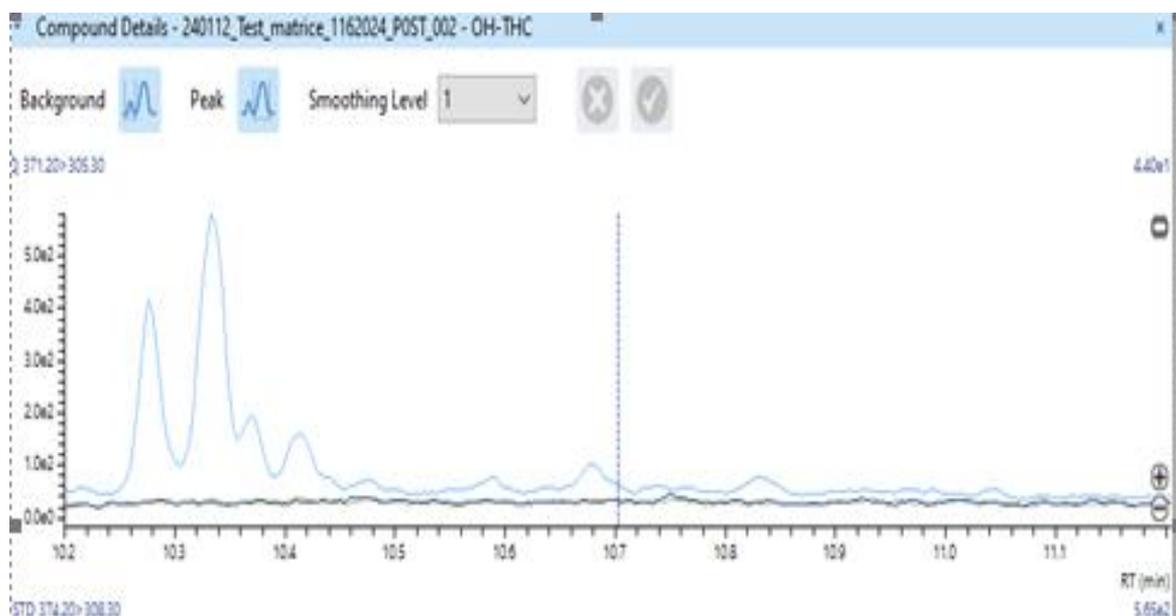
THC



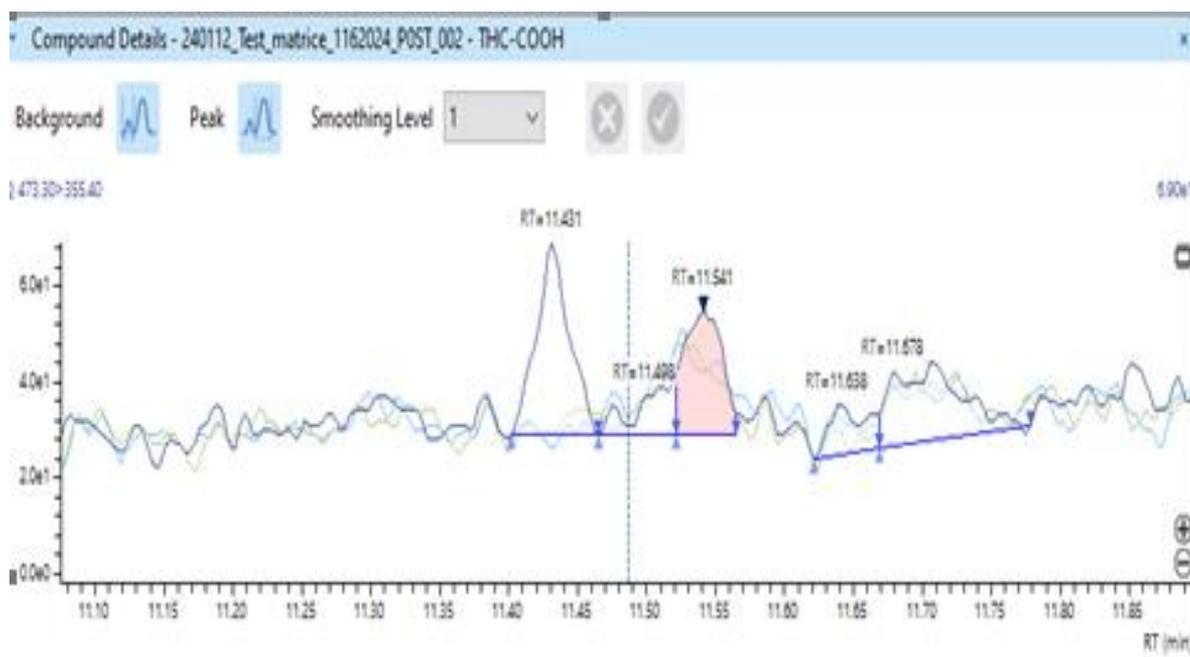
CBD



11-OH-THC



THC-COOH



d. Critères d'acceptation

Répétabilité : les CQ Bas pour chaque matrice ont été passés en premier, suivis des CQ Moyen et des CQ Haut au cours de la même série d'analyses. À partir des CQ

moyens effectués sur les échantillons d'urine et de sérum, les CV ont dépassé 20% pour chacun des dix points : l'aire du pic chromatographique s'est révélée supérieure à l'aire prévue. La colonne a été encrassée par des résidus de cannabinoïdes. L'explication est donnée dans la partie V-1.

Résultats de la spécificité des quatre cannabinoïdes sur sérum :

Substances	THC	CBD	11-OH-THC	THC-COOH
Spécificité	1.8 %	3.1 %	1%	8.3%
Conclusion	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme

La validation de la spécificité pour les matrices liquides a été effectuée en utilisant du sérum. Les résultats obtenus sont conformes aux attentes, ce qui est cohérent avec l'observation de pics clairement identifiables sur le sérum pour les concentrations les plus faibles de la gamme d'étalonnage des quatre cannabinoïdes étudiés.

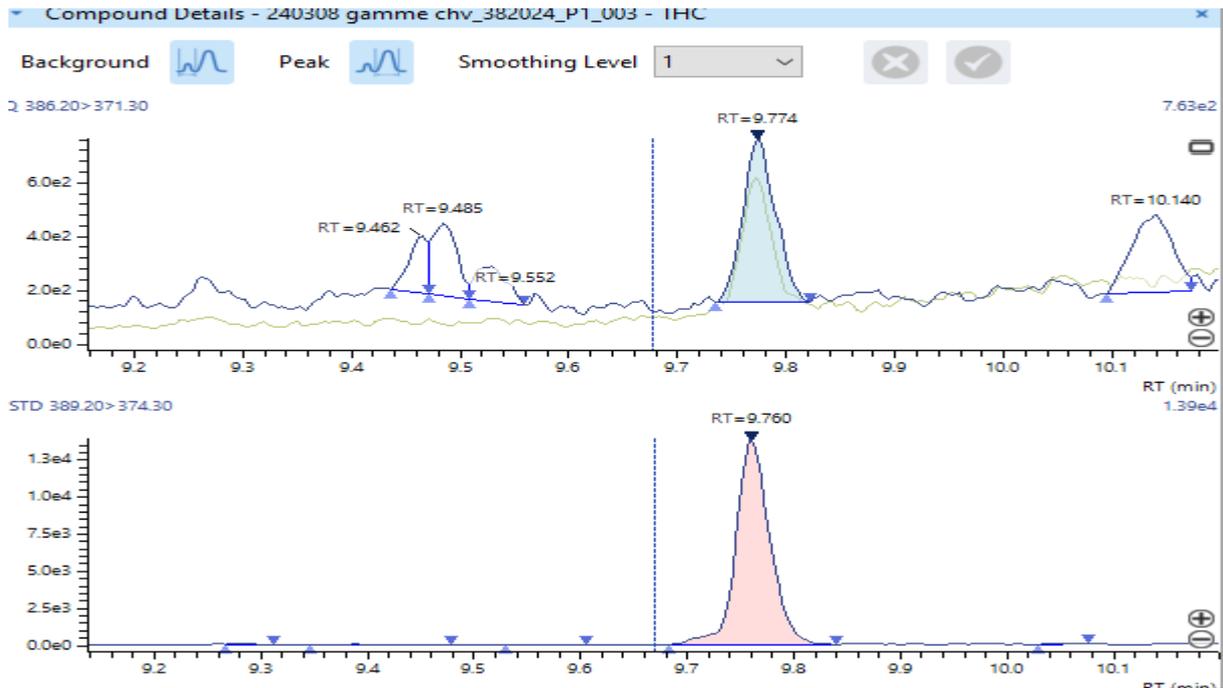
En raison des difficultés analytiques rencontrées, la décision prise a été d'interrompre le transfert vers la GC-MS/MS pour le dosage des cannabinoïdes dans le sang et l'urine. Par conséquent, il a été cessé d'évaluer les critères d'acceptation à la validation de méthode, bien que ce processus ait déjà été initié.

2) Méthode 2

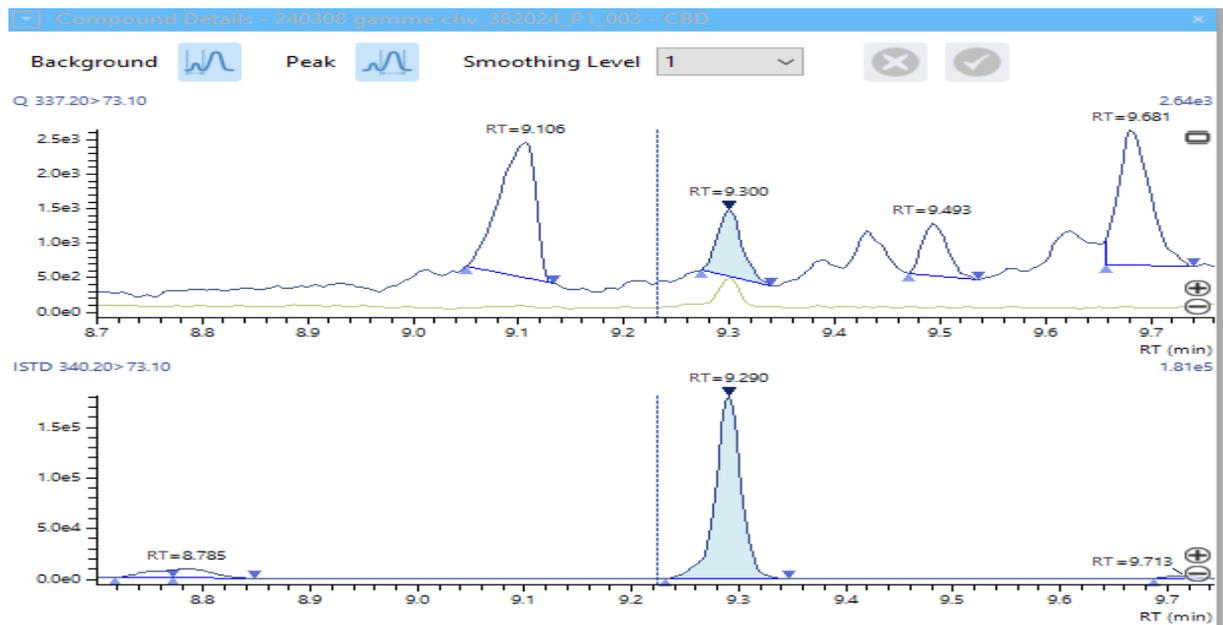
Il a été atteint la sensibilité requise pour le THC et CBD sur la matrice. L'ensemble des critères de validation effectués sont conformes.

Signaux P1 du THC et CBD (50 pg/mg) en extraction liquide/liquide : le tracé noir correspond à la transition de quantification, la barre en pointillé bleu indique le temps de rétention attendu sur les 4 images suivantes

THC



CBD



a. Répétabilité

Substances	THC	CBD
CV CQ Bas	6.6 %	7.9 %
CV CQ Moyen	7.4 %	10.4 %
CV CQ Haut	5.5 %	3.6 %
CV CAL1	2.7 %	5.8 %
Conclusion	Conforme	Conforme

Tableau 3 : Résultats de la répétabilité sur les concentrations des quatre cannabinoïdes mesurées par GC-MS/MS

b. Reproductibilité

Critères de validation	THC	CBD
CQ Bas		
CV	6 %	9 %
Conclusion	Conforme	Conforme
CQ Moyen		
CV	8 %	9 %
Conclusion	Conforme	Conforme
CQ Haut		
CV	10 %	11 %
Conclusion	Conforme	Conforme

Tableau 4 : Résultats de la reproductibilité sur les concentrations des quatre cannabinoïdes mesurées par GC-MS/MS

c. Justesse

Substances	THC	CBD
Justesse CQ Bas	-8 %	7 %
Justesse CQ Moyen	-7 %	-7 %
Justesse CQ Haut	2%	2%
Justesse CAL1	7.4%	13.4%
Conclusion	Conforme	Conforme

Tableau 5 : Résultats de la justesse sur les concentrations des quatre cannabinoïdes mesurées par GC-MS/MS

d. Spécificité

Substances	THC	CBD
Spécificité	2.1 %	4.6 %
Conclusion	Conforme	Conforme

Tableau 6 : Résultats de la spécificité sur les concentrations des quatre cannabinoïdes mesurées par GC-MS/MS

e. Contribution isotopique

Substances	THC	CBD
Contribution EI sur molécule	1.61%	9.45%
Contribution molécule sur EI	6.60 %	1.11%
Conclusion	Conforme	Conforme

Tableau 7 : Résultats de la contribution isotopique sur les concentrations des quatre cannabinoïdes mesurées par GC-MS/MS

f. Effet mémoire

Substances	THC	CBD
Contamination	0.00 %	0.05 %
Conclusion	Conforme	Conforme

Tableau 8 : Résultats de l'effet mémoire sur les concentrations des quatre cannabinoïdes mesurées par GC-MS/MS

g. Stabilité sur l'injecteur

Substances	THC	CBD
CV CQ Bas	6.8 %	5.5 %
Justesse CQ Bas	-8.7 %	-13.2%
Conclusion	Conforme	Conforme
CV CQ Moyen	1.4 %	0.4 %
Justesse CQ Moyen	-2.3 %	-0.2 %
Conclusion	Conforme	Conforme
CV CQ Haut	11.1 %	6.8 %
Justesse CQ Haut	-1.8 %	1.2 %
Conclusion	Conforme	Conforme

Tableau 9 : Résultats de la stabilité de l'injecteur sur les concentrations des quatre cannabinoïdes mesurées par GC-MS/MS

h. Exactitude

EEQ/Passage de patient	DH144	DH244	DH145	DH245	Y1	Y2
Masse d'échantillonnage (mg)	45.8	49.4	51.2	54.3	23	20
Concentration THC (pg/mg)	0	0	0	0	43	884
Concentration CBD (pg/mg)	0	0	0	0	0*	221

Tableau 10 : Résultats de l'exactitude sur les concentrations du THC et CBD mesurées par GC-MS/MS à l'aide de deux patients et quatre EEQ

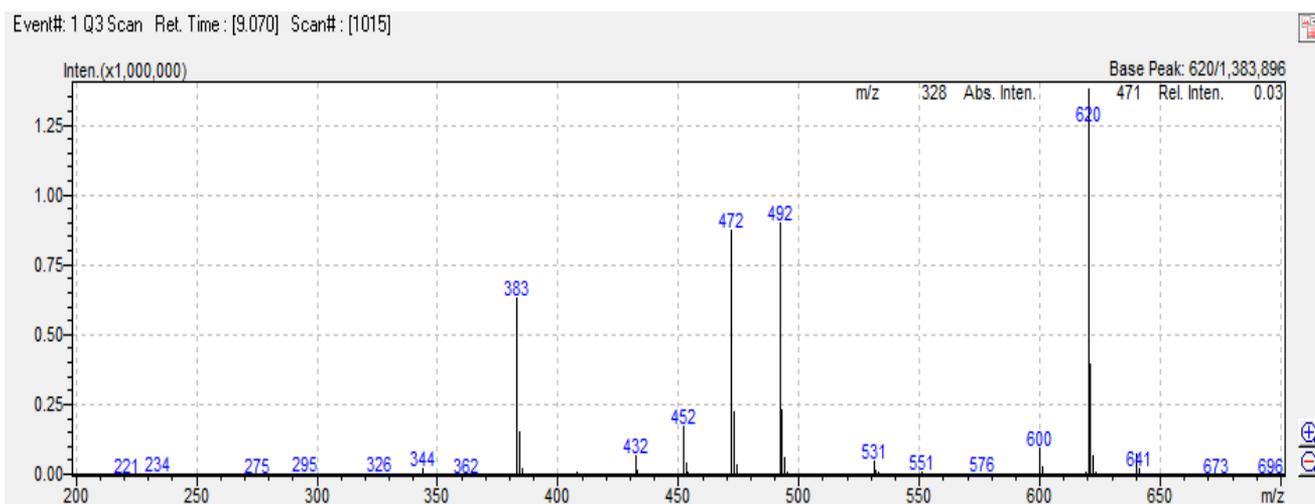
* : la concentration en CBD est présente à l'état de trace, avec un pic discernable par rapport au bruit de fond, mais la quantité reste inférieure à la limite de quantification.

3) Méthode 3

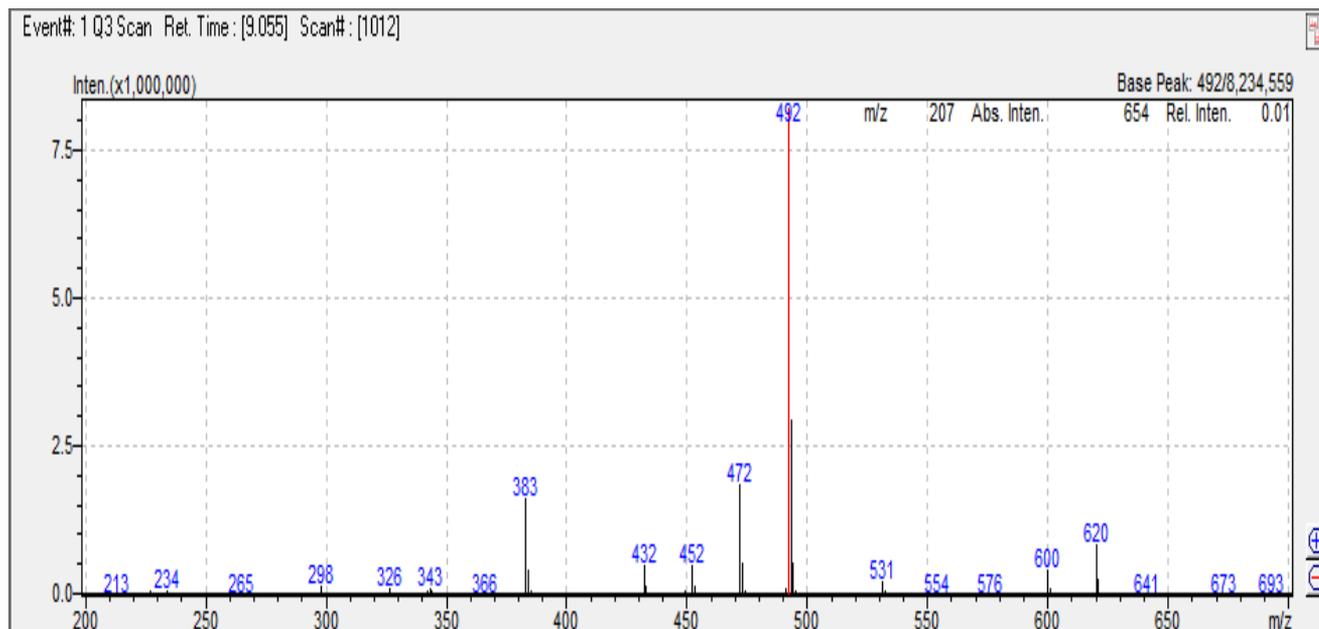
La validation de la méthode pour le 11-OH-THC a été abandonnée en raison de l'incapacité à détecter de façon fiable cette substance aux niveaux de concentration désirés avec notre méthode de dérivation.

Dans le cas du THC-COOH, la température de la source d'ionisation influence la masse prédominante de l'ion parent : à 140°C, l'ion parent majoritaire a une masse de 620 et à 230°C, l'ion parent majoritaire a une masse de 492 (voir graphique des spectres de masse). L'ion parent sélectionné à 140°C présente un signal moins intense (1,2 millions de coups) comparé à celui à 230°C (7,5 millions de coups). Cependant, malgré cette intensité plus faible l'ion à 140°C offre une meilleure spécificité en raison d'un bruit de fond réduit, comme le montrent les signaux P1.

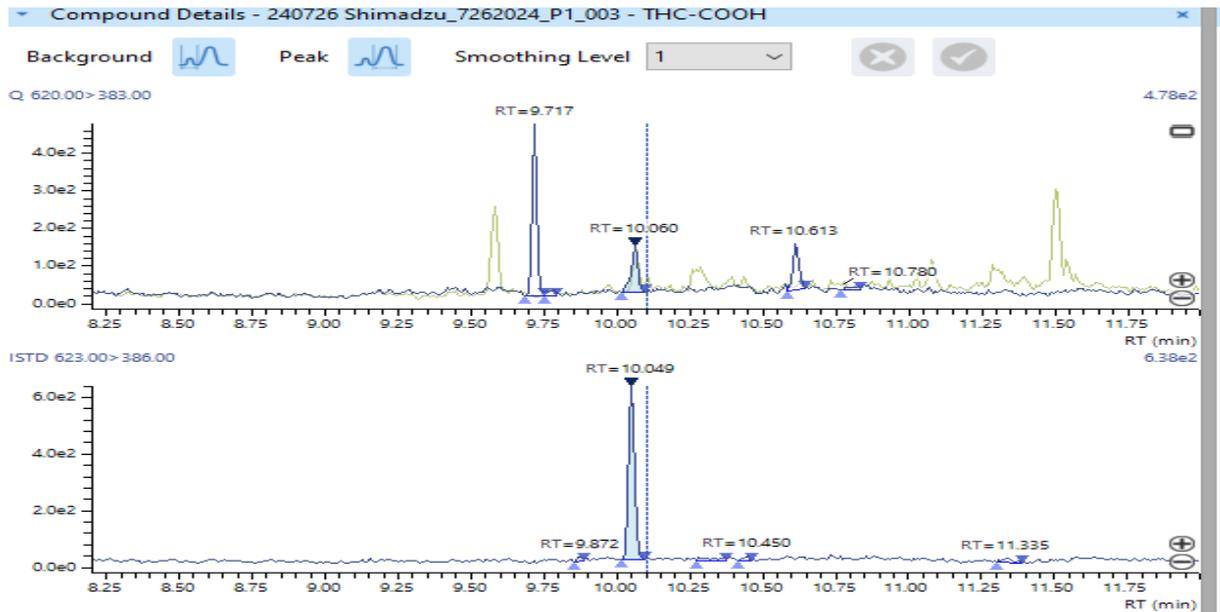
Graphique du spectre de masse avec la méthode à 140 °C montrant le pic moléculaire et les pics de fragmentation, avec en abscisse le rapport m/z et en ordonnée l'abondance des ions



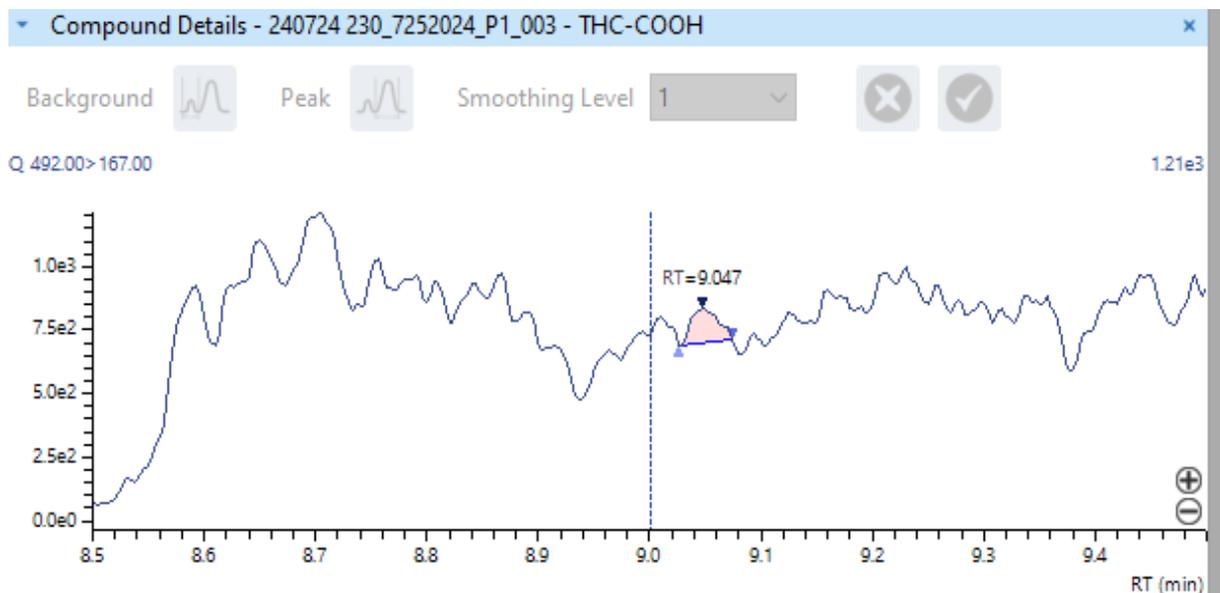
Graphique du spectre de masse avec la méthode à 230 °C montrant le pic moléculaire et les pics de fragmentation, avec en abscisse le rapport m/z et en ordonnée l'abondance des ions



Signal P1 du THC-COOH (0.2 pg/mg) en utilisant la méthode 3 avec une température de 140 °C pour la source d'ionisation : le tracé noir correspond à la transition de quantification, la barre en pointillé bleu indique le temps de rétention attendu sur les 4 images suivantes



Signal P1 du THC-COOH (0.2 pg/mg) en utilisant la méthode 3 avec une température de 230 °C pour la source d'ionisation : le tracé noir correspond à la transition de quantification, la barre en pointillé bleu indique le temps de rétention attendu sur les 4 images suivantes :



Le chromatogramme obtenu avec la méthode 3 à 140 °C démontre qu'une sensibilité correcte peut être atteinte. Cependant, cette sensibilité reste limitée : d'autres séries d'analyses ont montré que les premiers points de la gamme d'étalonnage peuvent facilement être perdus, compromettant ainsi la fiabilité des mesures à faibles concentrations.

Dans le cadre de la méthode 3, il a été effectué l'analyse de quatre EEQ ainsi que de deux échantillons provenant de patients dont la consommation a été confirmée. Cette démarche a été entreprise dans le but d'obtenir des premières données exploitables pour notre recherche (tableau 11), les concentrations des analytes dosés en parallèle sont retrouvées dans le tableau 10.

Validation sur des échantillons de consommateurs inconnus et EEQ

EEQ/Passage de patient	DH144	DH244	DH145	DH245	Y1	Y2
Masse d'échantillonnage (mg)	45.8	49.4	51.2	54.3	23	20
Concentration THC-COOH (pg/mg)	0	0	0	0	0.3	0.7

Tableau 11 : Résultats de l'exactitude sur les concentrations du THC-COOH mesurées par GC-MS/MS à l'aide de deux patients et quatre EEQ

En raison de contraintes temporelles, la validation complète de la méthode pour le THC-COOH n'a pas pu être achevée. Il est nécessaire de poursuivre les travaux de validation déjà entrepris afin de garantir la fiabilité des résultats sur cette matrice.

V-Discussion :

1) Validation analytique sur les matrices sanguines et urinaires

À la suite d'une comparaison approfondie des méthodes d'extraction, il a été constaté que l'extraction liquide-liquide présente une efficacité supérieure aux QuEChERS bien qu'elle nécessite une mise en œuvre plus complexe et engendre une consommation plus élevée de solvants. En conséquence, la décision a été de se focaliser sur l'extraction liquide-liquide et d'abandonner la méthode QuEChERS. Néanmoins, la validation de méthode sur ces matrices n'a pas pu aboutir. On retrouve un manque de sensibilité pour les premiers points de gamme sur sang total notamment pour le THC, CBD et 11-OH-THC. Tandis que pour le sérum et l'urine la sensibilité est correcte : les pics de la gamme d'étalonnage et contrôles qualité sont distinguables du bruit de fond avec une aire satisfaisante. Les raisons de ce manque de sensibilité sont probablement liées à la présence d'un effet matrice dans le sang total, malgré le fait qu'il fut utilisé un pool de sang d'individus exempt de drogues. Cela est fortement problématique pour le versant médico-légal (notamment en toxicologie post-mortem) car il s'agit la plupart du temps de la seule matrice sanguine utilisable (en raison de l'hémolyse rapide et de la conservation au congélateur), de composition « sale » et hétérogène au vu du profil des cas étudiés : coagulation, putréfaction...

L'incapacité à détecter les molécules dans le sang total est démontrée dans le tableau 12. Ce dernier présente une comparaison des signaux de l'étalon interne du THC dans différentes conditions. On y observe le signal pour le point de concentration le plus élevé (P8), à 100 ng/mL et ce pour les trois matrices étudiées. En parallèle, le tableau montre le signal du CQB spécifique à la matrice sérum dont la concentration est à 2,5 ng/mL.

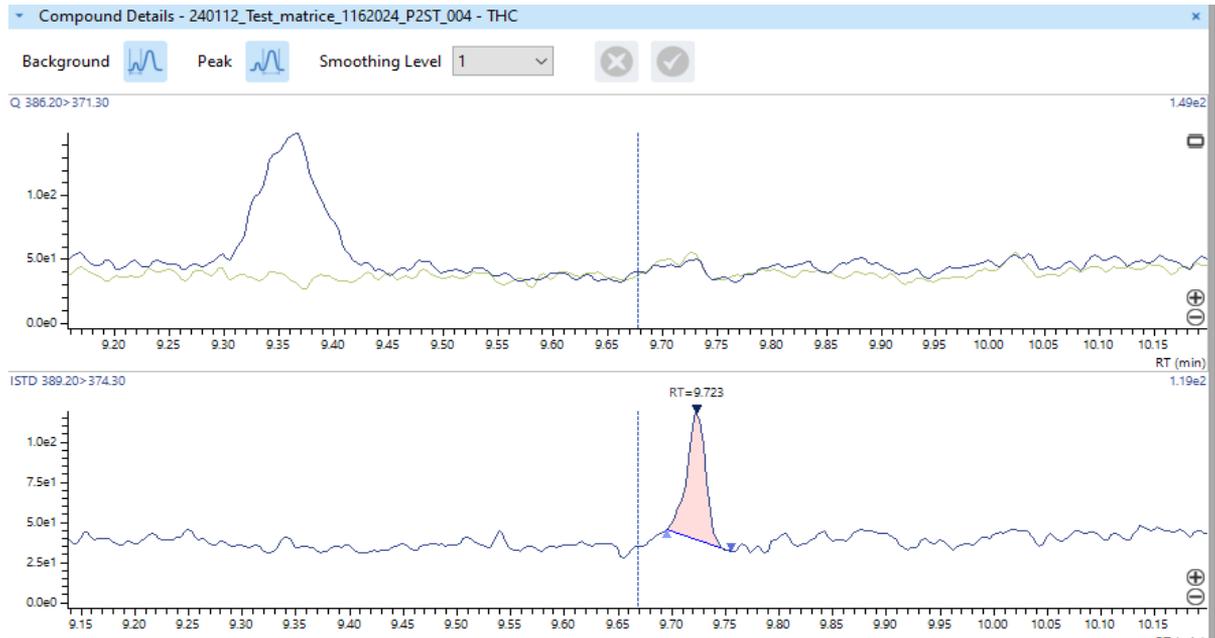
	P8 Sérum	P8 Sang total	P8 Urine	CQB Sérum
Moyenne	1720	184	219	317
CV en %	2.5	64	29	3.9

Tableau 12 : Résultats de la répétabilité sur les signaux des étalons internes du THC dans les différentes matrices

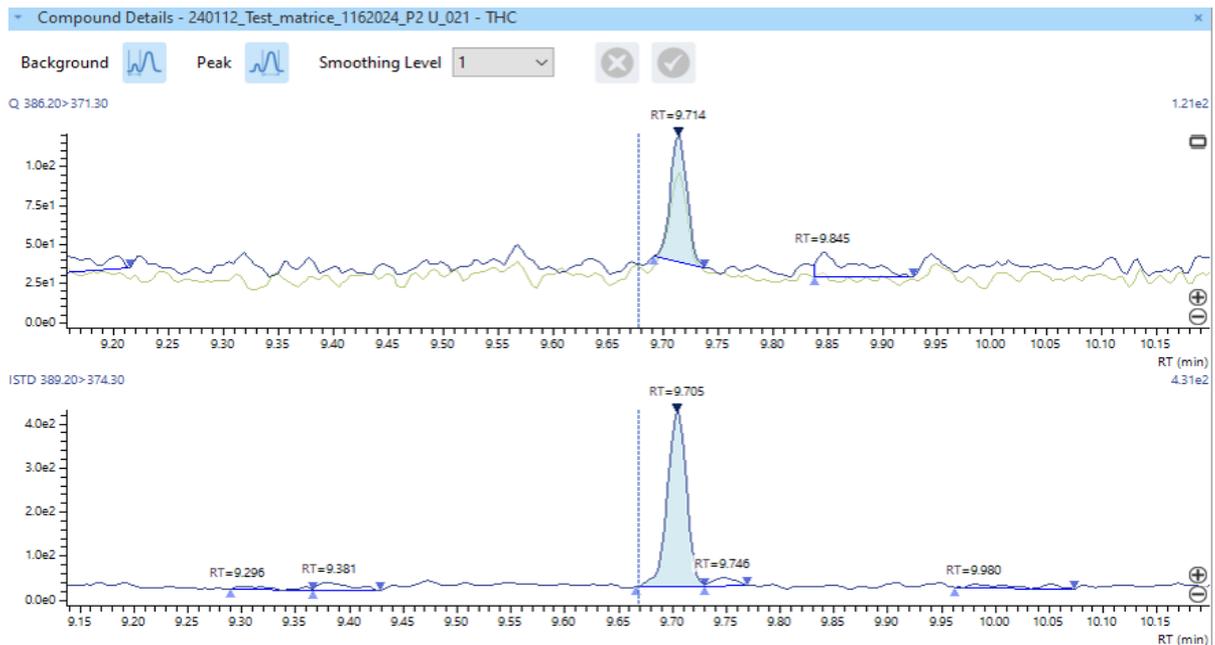
On constate une diminution du signal lors de l'analyse successive de différentes matrices biologiques, notamment du sérum au sang total, du sang total à l'urine et enfin de l'urine au CQB du sérum. Ce phénomène se produit particulièrement lorsque les échantillons de ces différentes matrices sont injectés consécutivement dans une même série d'analyses, avec les échantillons de sang total précédant ceux d'urine. La perte de signal est attribuée à l'encrassage de l'appareil d'analyse par le sang total. Cette observation souligne la nécessité de valider la méthode séparément sur chaque matrice utilisée. Les images fournies illustrent clairement ce phénomène : absence de signal détectable à 1 ng/mL dans l'échantillon de sang total sur la première image ; signal aisément détectable à 1 ng/mL dans les échantillons d'urine et de sérum sur les deux dernières images. Ces résultats proviennent de séries d'analyses distinctes, démontrant que les analyses d'urine et de sérum sont correctement effectuées lorsqu'elles ne sont pas précédées par l'injection d'échantillons de sang total. Cela met en évidence l'importance de la méthodologie dans l'analyse des différentes matrices biologiques et les conséquences potentielles d'un protocole inadapté sur la qualité des résultats obtenus (comme mélanger les matrices au sein d'une même série d'analyse).

L'exactitude a été analysée à l'aide de contrôles qualités externalisés datant de 2022 et 2023, au nombre de neuf et provenant de sérum et sang total (il n'y avait pas de CQ externalisé urinaire) basée sur la méthode 1. Ce critère de validation n'a pas été poursuivi en raison des difficultés spécifiques liées à l'utilisation du sang total comme matrice.

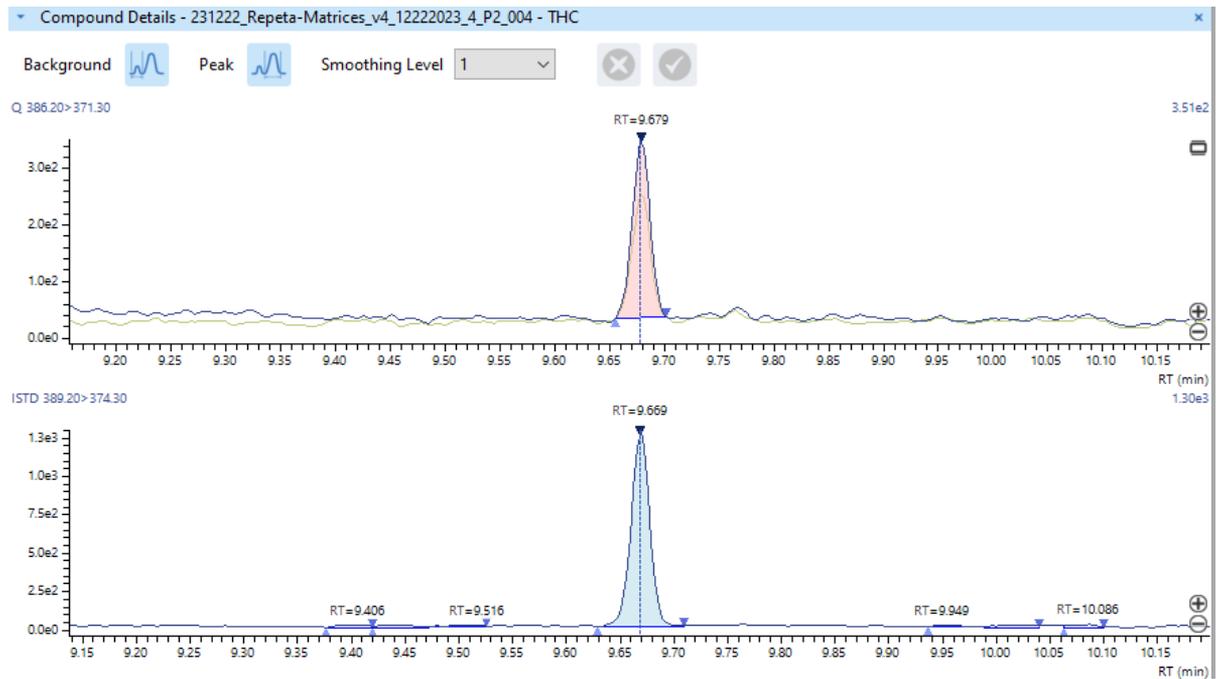
Signal P2 (1ng/mL) du THC sur sang total :



Signal P2 (1ng/mL) du THC sur urine :



Signal P2 (1ng/mL) du THC sur sérum :



D'après la littérature, plus le degré de liaison aux protéines plasmatiques est élevé, plus il est difficile d'atteindre un degré de récupération à 100 % lors de la préparation des échantillons. *Dybowski*⁷¹ a montré que le degré de récupération des cannabinoïdes par extraction liquide/liquide (LLE) est similaire mais très faible entre GC-MS et LC-MS (Figure 13). Toutefois, si cet élément était réellement la source du problème de sensibilité des analyses sur sang total, il devrait être également constaté le même phénomène lors des analyses sur sérum. Or, ce n'est pas ce qui est observé.

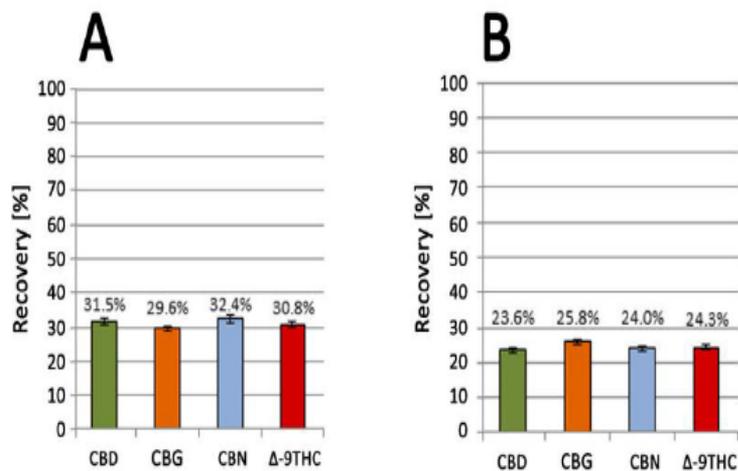


Figure 13 : Degré de récupération du CBD (en vert), du CBG (en orange), du CBN (en bleu) et du Δ9-THC (en rouge) calculé à partir de l'analyse GC-MS (A) et LC-MS (B) en LLE à partir de surnageant d'échantillons de plasma contenant 0,1 µg/mL (pour GC-MS) ou 0,2 µg/mL (pour LC-MS) de chaque cannabinoïde

La Figure 14 ⁷¹ montre qu'un effet matrice est fortement présent en GC-MS en comparaison à la LC-MS lors de l'extraction de cannabinoïdes par précipitation de protéines. Cet effet matrice s'estompe avec l'augmentation de la concentration sanguine en cannabinoïde (Figure 15), ce qui explique les difficultés à détecter des faibles concentrations en toxique (comme le 11-OH-THC). Une cartouche SPE est une alternative efficace pour limiter les effets de matrice car elle permet de purifier l'échantillon, concentrer les analytes d'intérêt ; et son automatisation ⁷² minimise les variabilités liées à la préparation ce qui permet d'améliorer la répétabilité. Néanmoins, l'extraction en phase solide s'avère onéreuse et s'accompagne d'un alourdissement du protocole expérimental sans gain par rapport à la LC-MS.

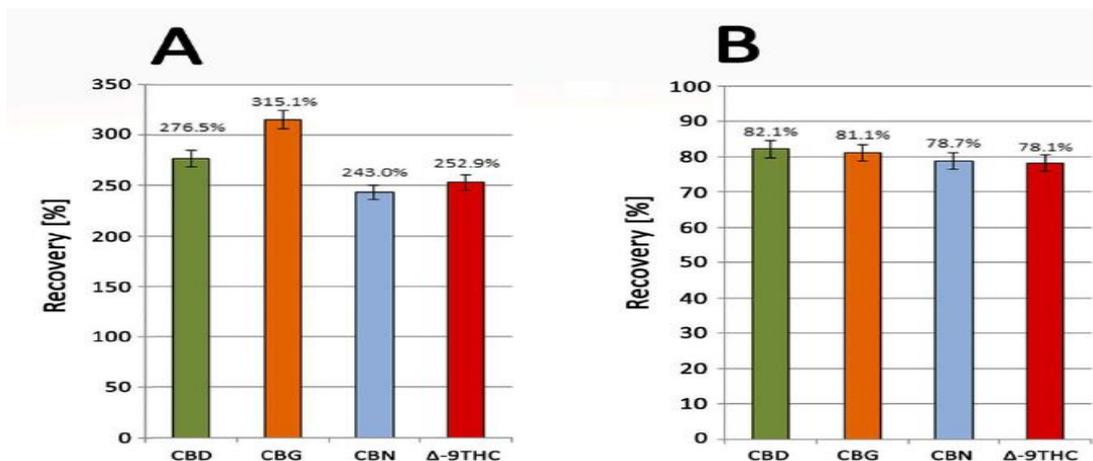


Figure 14 : Degré de récupération du CBD (en vert), du CBG (en orange), du CBN (en bleu) et du Δ9- THC (en rouge) calculé à partir de l'analyse GC-MS (A) et LC-MS (B) par précipitation des protéines sur des surnageants à partir d'échantillons de plasma humain contenant 0,1 µg/mL (pour GC-MS) ou 0,2 µg/mL (pour LC-MS) de chaque cannabinoïde

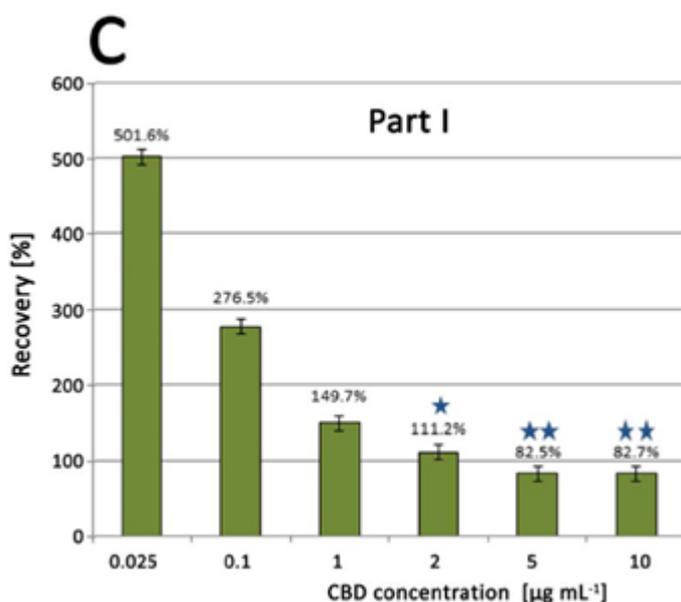


Figure 15 : Degré de récupération du CBD calculé en GC-MS sur des surnageants à partir d'échantillons de plasma avec différentes concentrations de cannabinoïdes

L'objectif du laboratoire était de transférer le dosage des cannabinoïdes sur cette nouvelle machine afin d'optimiser l'activité technique et biologique. Étant donné que

la validation de la méthode s'est révélée plus complexe que prévu, sans apporter d'amélioration et même en montrant une diminution des performances analytiques par rapport à l'instrument déjà en place. De plus, la GC-MS/MS nécessite une dérivation, ce qui prolonge le temps de préparation par rapport à la LC-MS. Il a donc été jugé judicieux de ne pas poursuivre les analyses sur ces matrices. Par conséquent, les analyses continueront d'être effectuées sur la LC-MS.

2) Validation analytique sur la matrice capillaire

a. Stratégie de validation

La validation analytique sur la matrice capillaire s'est réalisée en deux temps, d'abord pour le THC et CBD en utilisant la méthode 2 ; puis la méthode 3 pour le THC-COOH. Cette stratégie en deux phases assure une validation analytique adaptée à chaque composé notamment pour la sensibilité : la limite de quantification (LOQ) souhaitée pour le THC-COOH est significativement inférieure à celles requises pour le THC et le CBD. Il s'avère nécessaire d'utiliser une technique d'ionisation spécifique et une dérivation adaptée pour ce métabolite.

Notre méthode qui implique la surcharge d'analytes (sous forme liquide) dans un concentré capillaire exempte de drogues est la plus fréquemment utilisée pour valider la méthode. Cependant, ce modèle ne reproduit pas l'incorporation des substances dans les cellules ciliées capillaires de la même manière que lorsqu'elles sont intégrées dans les cheveux après ingestion ou inhalation. L'alternative consiste à tremper des cheveux vierges dans une solution surchargée à concentration connue pour que la matrice s'imprègne. Contrairement à notre méthode, le contrôle qualité final est un matériau solide. Néanmoins, il est difficile d'évaluer la concentration exacte en raison de la variation de l'incorporation des substances dans les cheveux (27 à 70 % reste dans le cheveu ³¹) ; il existe aussi le même problème de reproduction d'incorporation à partir du sang.

b. Choix des analytes

Les analytes sélectionnés pour le dosage capillaire sont les mêmes que ceux recherchés dans le sang, l'urine et la salive : THC- CBD et THC-COOH. La seule exception est le 11-OH-THC, dont le dosage capillaire n'a pu être développé.

La recherche capillaire de THC et de CBD permet de détecter avec une bonne sensibilité, une exposition capillaire au cannabis mais elle ne permet pas d'exclure une éventuelle contamination externe. La présence de THC-COOH dans les cheveux indique une consommation active de cannabis plutôt qu'une exposition passive à l'environnement, car il n'est pas présent dans la fumée de cannabis. Ce dernier persiste plus longtemps que le THC lui-même et sa détection dans les cheveux suggère que le cannabis a été métabolisé par l'organisme. Cependant, l'absence de THC-COOH ne signifie pas nécessairement qu'il n'y a pas eu de consommation de cannabis : sa concentration dans les cheveux est généralement bien inférieure à celles du THC (souvent inférieures à 10 pg/mg). Cette faible incorporation s'explique par sa nature acide car le gradient de pH entre le sang et la matrice capillaire qui est plus acide, entrave une incorporation efficace ⁷⁴. Il est important de noter que ce métabolite se trouve également dans le sébum et la sueur. Par conséquent, il est possible qu'il soit transféré sur les cheveux d'autres individus (jeunes enfants, partenaires de consommateurs de cannabis) mais à des concentrations très faibles, éliminées par lavage⁷⁵ (à l'exception du cas particulier qu'est le jeune enfant). Le THC-COOH est donc un analyte majeur pour l'interprétation des résultats des tests, justifiant ainsi la nécessité de développer des analyses supplémentaires. Il est à comparer au THC et CBD pour obtenir une compréhension plus complète de la consommation de cannabis. Ce panel d'analyses dosé en parallèle peut aider à établir une chronologie de l'utilisation et à fournir des informations complémentaires sur les habitudes de consommation, permettant ainsi une interprétation plus précise et nuancée des résultats toxicologiques.

Concernant le 11-OH-THC, le dosage capillaire n'a pas pu être mis en place. En effet, la limite inférieure de quantification nécessaire pour ce composé serait, comme pour le THC-COOH de 0.2 pg/mg de cheveux et son dosage nécessiterait donc une sensibilité très importante. Or, des tests préliminaires avaient montré :

-un défaut de sensibilité sur les matrices testées avec la méthode 1 pour ce composé jusqu'au quatrième point de la gamme.

- une absence de détection avec la méthode 3. La NCI offrant une sensibilité supérieure (d'un facteur 100 à 1 000) à l'EI n'a pas réussi à pallier ce problème. Il est probable que l'efficacité de la dérivation soit inférieure pour le 11-OH-THC comparé au THC-COOH en raison des différences structurelles entre ces molécules notamment par l'absence d'un groupement carboxyle sur le 11-OH-THC, limitant la possibilité d'estérification avec le HFIP. La NCI présente un manque de flexibilité par rapport à l'ionisation électronique. Passer de l'EI à la NCI nécessite un temps de mise en place qui, peut entraîner une incompatibilité avec la routine de travail au laboratoire. De plus, l'entretien, comme le nettoyage des sources d'ions, est plus fréquent. Les processus de dérivation, tels que la perfluoracylation ou l'estérification avec des alcools fluorés sont également plus complexes que la silylation.

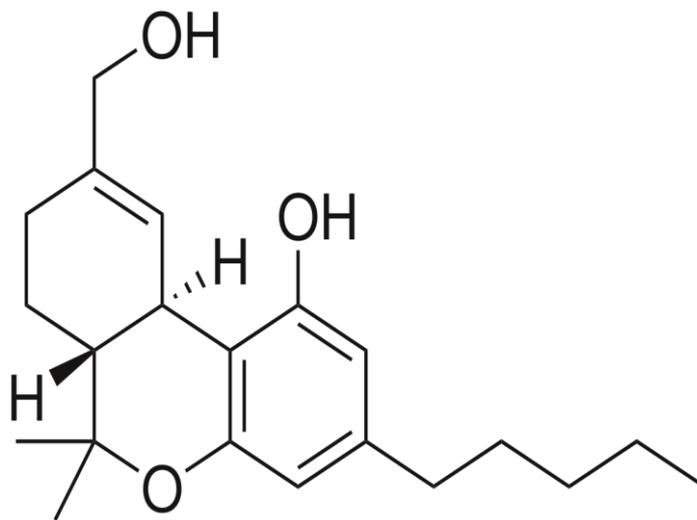


Figure 2 : 11-hydroxy-delta 9-tétrahydrocannabinol (11-OH-THC)

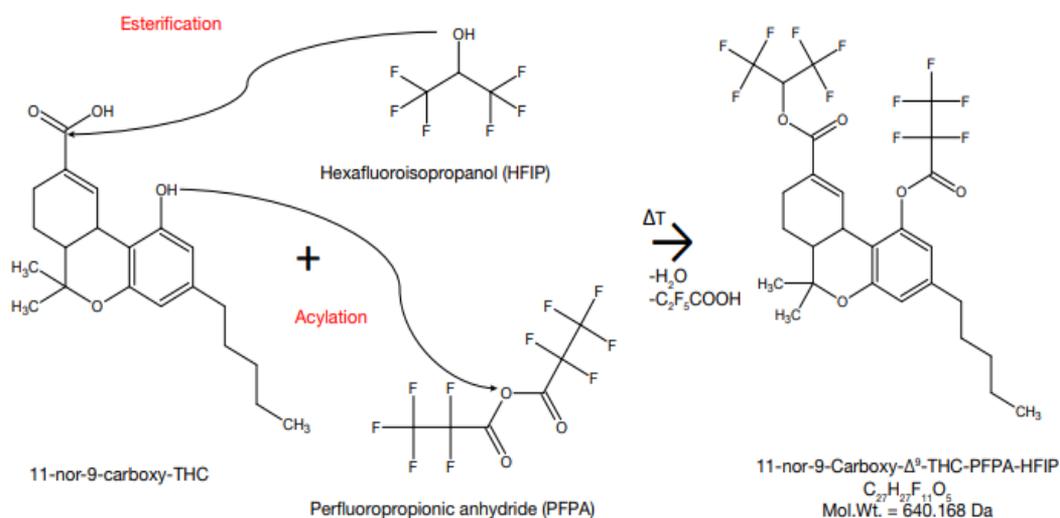


Figure 12 : Réaction chimique pour la dérivation du THC-COOH ⁶⁵

Sa structure moléculaire le rend particulièrement sensible à la dégradation thermique. Exposé aux températures élevées de la GC, il peut se décomposer avant d'atteindre le détecteur. Dans ces conditions, le 11-OH-THC peut subir diverses réactions chimiques, telles que l'élimination de groupes fonctionnels ou des réarrangements moléculaires conduisant à la formation de produits de dégradation qui ne sont pas détectés. De plus, le 11-OH-THC est généralement détecté à des concentrations inférieures à celles du THC et du THC-COOH dans le sang lors de l'inhalation de cannabis. Par conséquent, cette tendance se reflète également dans les concentrations observées dans les cheveux. Cette différence de concentration est due au métabolisme spécifique du THC lorsqu'il est inhalé, où la conversion en 11-OH-THC est moins importante que lors de l'ingestion orale. Sa concentration décroît rapidement après la consommation, ce qui complique sa détection, en particulier lorsque la limite de détection de la méthode analytique n'est pas suffisamment basse, comme c'est le cas dans cette thèse. Cependant, l'absence de résultats pour le 11-OH-THC est moins problématique dans le cadre d'une analyse toxicologique, car il n'apporte pas d'autres informations supplémentaires par rapport au THC-COOH.

c. Méthode 2

Les résultats des tests de validation de la méthode ont rempli l'ensemble des critères d'acceptation prédéfinis. La méthode 2 pour le dosage du CBD et THC dans la matrice capillaire peut être mise en production.

Pour obtenir une analyse complète des cannabinoïdes et une interprétation globale des résultats, il faut procéder à une approche combinant les méthodologies 2 et 3. L'utilisation exclusive de la méthode 2 s'avère insuffisante pour affirmer une consommation.

d. Méthode 3

Nos résultats ont démontré qu'une température à 140°C pour la source d'ionisation offrait de meilleurs résultats pour la détection du THC-COOH. En effet, il est important que cette température soit plus basse, en comparaison avec la température d'interface entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse qui est plus élevée. Cette réduction de température est bénéfique car elle minimise la fragmentation de l'ion parent : un ion parent de masse élevée est privilégié (620 à 140 °C contre 492 à 230 °C), car il confère une plus grande spécificité au composé et améliore sa limite de détection. En revanche, une température élevée de la source entraîne une fragmentation accrue, générant de nombreux ions fils. Cela peut augmenter la sensibilité, mais risque de compliquer l'interprétation en raison du bruit de fond. Il est donc essentiel de trouver un équilibre entre la température d'ionisation et la résolution des pics.

Malgré la meilleure détection apportée par l'ion à 140 °C, nos résultats mettent en évidence une sensibilité insuffisante. En effet, malgré l'utilisation des paramètres instrumentaux proposés par le fournisseur, nous n'avons pas encore atteint de manière constante le niveau de sensibilité requis pour le THC-COOH. Bien que nous parvenions parfois à obtenir des résultats corrects, le signal reste très faible, ce qui entraîne des variations importantes dans les résultats. Ce manque de sensibilité paraît fréquent : dans une étude ⁷⁰ utilisant le même instrument, les pourcentages de

tests positifs pour le THC-COOH étaient de 54 % chez les gros consommateurs, contre seulement 11 % chez les consommateurs légers.

Pour améliorer davantage la méthode, il sera nécessaire de contacter le fabricant de l'instrument⁷⁸ (Shimadzu) pour obtenir des informations complémentaires, optimiser de manière plus poussée les paramètres instrumentaux et avoir une aide dans la mise en place de cette méthode qu'ils annoncent réalisable sur cet instrument.

Plusieurs pistes sont à explorer pour améliorer la détection du THC-COOH. Augmenter le nombre d'extraction liquide/liquide (trois par exemple) pourrait améliorer le degré de récupération des cannabinoïdes. Le THC-COOH, étant une molécule polaire, est plus efficacement extrait par des solvants polaires. Les solvants non polaires comme l'hexane sont moins efficaces pour extraire quantitativement le THC-COOH du fait d'une moindre affinité. Un mélange méthanol/chloroforme pourrait être essayé pour les méthodes 1 et 3, facilitant l'extraction des cannabinoïdes neutres et acides. Une préconcentration de l'échantillon en utilisant une technique d'extraction en phase solide pourrait être aussi une solution. L'automatisation peut soulager dans certains cas l'extraction liquide/liquide classique qui implique une charge de travail manuelle importante et est sujette aux erreurs. Mais sa mise en œuvre au sein d'un Centre Hospitalier Universitaire (CHU) présente un défi trop important en termes de logistique, d'organisation et de coût. Les limitations financières et matérielles imposent des choix dans la distribution des ressources, ces dernières sont principalement consacrées vers les analyses les plus courantes et prioritaires. L'exploration d'autres sites de prélèvement pourrait constituer une alternative intéressante pour améliorer la détection des quatre cannabinoïdes. Des concentrations plus élevées ont été trouvées pour un certain nombre de médicaments dont les cannabinoïdes dans les poils pubiens, axillaires par rapport aux cheveux⁷⁷. Les différences de concentration peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs comme une incorporation accrue de sueur ou de sébum dans les poils corporels pendant le stade télogène (plus long pour ces poils), un cycle de croissance et une pigmentation différente ainsi qu'une exposition moindre à la lumière. En revanche, il est généralement considéré que le poil ne permet pas de réaliser une datation précise, et sa disponibilité peut être limité dans certaines populations, notamment les enfants.

e. Application des méthodes 2 et 3 sur des échantillons

Quatre échantillons d'évaluation externe de la qualité : DH144, DH244, DH145, DH245 ont été analysés sur la matrice capillaire en utilisant les méthodes 2 et 3. Les résultats de ces EEQ se sont révélés négatifs chez DH144, DH244, DH145, DH245, pour la présence de cannabinoïdes, ce qui correspondait aux attentes.

Il a été analysé deux échantillons capillaires (Y1 et Y2) de consommateurs se déclarant soit consommateur régulier (Y1) ou quotidien (Y2 plusieurs fois par jour). Dans le cas de Y2, on observe des concentrations élevées à la fois en THC et en CBD avec des niveaux de THC dépassant le quatrième point de la gamme d'étalonnage. Les concentrations en THC sont particulièrement importantes, ce qui suggère une consommation de cannabis généralement plus riche en THC. Cette prédominance du THC par rapport au CBD est caractéristique du cannabis non réglementé, contrairement aux produits thérapeutiques qui ont des concentrations plus élevées en CBD. Pour Y1, l'analyse révèle une concentration en THC inférieure à la limite de détection (< 50 pg/mg) mais tout de même distinguable du bruit de fond. On ne détecte que des traces de CBD. Cette différence de profil par rapport à Y2 suggère que la préparation, composition ou variété du cannabis consommé par Y1 pourrait être différente de celle utilisée par l'autre consommateur, la qualité du cheveu peut également en être l'origine (couleur, traitements...). Ou alors comme mentionné précédemment, la différence pourrait résulter de la fréquence de consommation distincte entre les deux individus : Y1 a une fréquence de consommation moins élevée que Y2, ce qui expliquerait les concentrations plus faibles détectées. Du fait du résultat satisfaisant de la validation analytique pour ces deux molécules, il n'y a pas de doute sur la fiabilité des résultats obtenus et leur interprétation.

Pour Y2, on observe une quantité significative de THC-COOH, ce qui suggère une consommation chronique de cannabis. Pour Y1, des concentrations de THC-COOH sont aussi détectées mais moins importantes. Cette différence de résultats entre Y2 et Y1 est toujours due à la différence de consommation. On peut supposer que si la faible prise d'essai pour Y2 (environ 20 mg) avait été équivalente à celle indiquée dans la méthode 3, la quantité de THC-COOH détectée aurait été encore plus importante, renforçant l'idée d'une consommation chronique de cannabis chez Y2.

Récemment, une étude ⁶⁴ utilisant le même instrument a montré que la valeur prédictive négative (VPN) était de 47% pour le THC-COOH : si un échantillon de cheveux est négatif pour les cannabinoïdes, il est probable que le sujet n'est pas un gros consommateur de cannabis. Cependant, cela ne permettrait pas de conclure avec certitude que la personne s'est réellement abstenue de consommer, d'où l'importance de toujours croiser ces résultats avec d'autres matrices. Cela ouvre la voie à des améliorations potentielles de la fiabilité des analyses pour ce type de consommation.

Bien que le développement de la méthode ne soit pas entièrement finalisé, nous avons réalisé des progrès significatifs (en optimisant les paramètres instrumentaux), et dans certains cas, la méthode actuelle permet déjà d'obtenir des résultats prometteurs comme avec les consommateurs analysés (notamment Y2).

VI-Conclusion

L'analyse des cannabinoïdes dans le cheveu s'inscrit dans une démarche globale et multidisciplinaire, en tenant compte des analyses effectuées sur le sang, l'urine et la salive afin d'améliorer l'interprétation des résultats. Dans ce contexte, il semblait important d'harmoniser toutes les procédures analytiques en les réalisant sur un même instrument. Cette démarche avait pour objectif de faciliter la comparaison et l'intégration des résultats obtenus à partir de différentes matrices, offrant ainsi une vision plus complète et fiable de l'analyse toxicologique.

Les résultats se sont avérés concluants pour les échantillons de sérum et d'urine. Cependant, lors de l'application de la méthode au sang total, un manque de sensibilité a été constaté, cette limitation a rendu impossible le transfert de la méthode vers la technique de GC/MSMS. En effet, le sang total est la seule matrice qui peut être appliquée dans la plupart des contextes. En conséquence, il n'a pas pu être effectué la validation de méthode pour la détection et la quantification des quatre cannabinoïdes sur les matrices étudiées (sérum, urine et sang total).

Une validation analytique complète a pu être appliquée pour le THC et CBD capillaire avec des résultats satisfaisants. Quant au THC-COOH capillaire, il a été seulement accompli un passage d'EEQ et d'échantillons de consommateurs par manque du temps. Les ressources disponibles se sont avérées insuffisantes pour identifier et résoudre le problème de sensibilité observé aux concentrations les plus basses de la gamme d'étalonnage. Ce défaut a ralenti la capacité à développer la méthode pour détecter et quantifier cet analyte à faible concentration. Ce facteur limitant est majeur pour assurer la performance de la méthode, car l'augmentation de la limite de détection peut entraîner des répercussions significatives d'un point de vue clinique ou médico-légal quant à l'interprétation des résultats.

Des investigations sont actuellement déployées pour identifier des facteurs visant à améliorer la détection du métabolite THC-COOH dans le cadre de la méthode 3. L'optimisation et la maîtrise de ces paramètres critiques (instrumentaux, protocolaires) s'avèrent déterminantes pour la validation intégrale de la méthode de dosage des cannabinoïdes sur matrice capillaire ; et ainsi d'ajouter cette analyse au panel des examens proposés au sein de notre laboratoire.

Références bibliographiques

1. R.C. Clarke, J.M. McPartland et D.P. Watson. *Les Maladies et Nuisances Du Chanvre - Descriptif Du Chanvre Cultivé*.
2. Hemp, Enc. Britannica 1856 about hemp.
<https://botanical.com/botanical/mgmh/h/hemp22a.html>.
3. Exhibition - Marijuana.
<https://www.nlm.nih.gov/exhibition/pickyourpoison/exhibition-marijuana.html>.
4. Huestis, M. A. Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chem Biodivers* **4**, 1770–1804 (2007).
5. ElSohly, M. A. *et al.* Potency trends of delta9-THC and other cannabinoids in confiscated marijuana from 1980-1997. *J Forensic Sci* **45**, 24–30 (2000).
6. efxio2b4.pdf.
7. Usages du cannabis en France : premiers résultats du Baromètre santé de Santé publique France 2020. <https://www.santepubliquefrance.fr/presse/2021/usages-du-cannabis-en-france-premiers-resultats-du-barometre-sante-de-sante-publique-france-2020>.
8. Les usages de cannabis en population adulte en 2021.
<https://www.santepubliquefrance.fr/presse/2022/les-usages-de-cannabis-en-population-adulte-en-2021>.
9. Les drogues à 17 ans. Analyse de l'enquête ESCAPAD 2022 | OFDT.
<https://www.ofdt.fr/publication/2023/les-drogues-17-ans-analyse-de-l-enquete-escapad-2022-562> (2023).

10. Bremond, P. Rapport mondial sur les drogues 2022. *Dianova*
<https://www.dianova.org/fr/nouvelles/rapport-mondial-sur-les-drogues-2022/>
(2022).
11. Huestis, M. A., Henningfield, J. E. & Cone, E. J. Blood cannabinoids. I. Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THCCOOH during and after smoking marijuana. *J Anal Toxicol* **16**, 276–282 (1992).
12. Ashton, C. H. Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. *Br J Psychiatry* **178**, 101–106 (2001).
13. Hunt, C. A. & Jones, R. T. Tolerance and disposition of tetrahydrocannabinol in man. *J Pharmacol Exp Ther* **215**, 35–44 (1980).
14. Widman, M., Agurell, S., Ehrnebo, M. & Jones, G. Binding of (+)- and (minus)-delta-1-tetrahydrocannabinols and (minus)-7-hydroxy-delta-1-tetrahydrocannabinol to blood cells and plasma proteins in man. *J Pharm Pharmacol* **26**, 914–916 (1974).
15. Grotenhermen, F. Pharmakologie und Pharmakokinetik. in *Cannabis, Straßenverkehr und Arbeitswelt: Recht — Medizin — Politik* (eds. Grotenhermen, F. & Karus, M.) 297–313 (Springer, Berlin, Heidelberg, 2002). doi:10.1007/978-3-642-56070-5_14.
16. Maykut, M. O. Health consequences of acute and chronic marijuana use. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **9**, 209–238 (1985).
17. Musshoff, F. & Madea, B. Review of biologic matrices (urine, blood, hair) as indicators of recent or ongoing cannabis use. *Ther Drug Monit* **28**, 155–163 (2006).
18. Goullé, J.-P., Sausseureau, E. & Lacroix, C. [Delta-9-tetrahydrocannabinol pharmacokinetics]. *Ann Pharm Fr* **66**, 232–244 (2008).

19. Moffat, A. C. Monitoring urine for inhaled cannabinoids. *Arch Toxicol Suppl* **9**, 103–110 (1986).
20. Passive Inhalation of Marijuana Smoke | JAMA | JAMA Network.
<https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/387710>.
21. Cone, E. J. & Johnson, R. E. Contact highs and urinary cannabinoid excretion after passive exposure to marijuana smoke. *Clin Pharmacol Ther* **40**, 247–256 (1986).
22. Giroud, C. *et al.* E-Cigarettes: A Review of New Trends in Cannabis Use. *Int J Environ Res Public Health* **12**, 9988–10008 (2015).
23. Ellis, G. M., Mann, M. A., Judson, B. A., Schramm, N. T. & Tashchian, A. Excretion patterns of cannabinoid metabolites after last use in a group of chronic users. *Clin Pharmacol Ther* **38**, 572–578 (1985).
24. Manno, J. E. *et al.* Temporal indication of marijuana use can be estimated from plasma and urine concentrations of delta9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-delta9-tetrahydrocannabinol, and 11-nor-delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid. *J Anal Toxicol* **25**, 538–549 (2001).
25. Ohlsson, A. *et al.* Single-dose kinetics of deuterium-labelled cannabidiol in man after smoking and intravenous administration. *Biomed Environ Mass Spectrom* **13**, 77–83 (1986).
26. Hložek, T. *et al.* Pharmacokinetic and behavioural profile of THC, CBD, and THC+CBD combination after pulmonary, oral, and subcutaneous administration in rats and confirmation of conversion in vivo of CBD to THC. *Eur Neuropsychopharmacol* **27**, 1223–1237 (2017).
27. Skopp, G., Pötsch, L. & Moeller, M. R. On cosmetically treated hair--aspects and pitfalls of interpretation. *Forensic Sci Int* **84**, 43–52 (1997).

28. Pragst, F. & Balikova, M. A. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta* **370**, 17–49 (2006).
29. Le cycle de croissance du cheveu. <https://nutrinia.fr/fr/blog/30-le-cycle-de-croissance-du-cheveu>.
30. Goullé, J.-P. & Lacroix, C. [Which biological matrix for cannabis testing?]. *Ann Pharm Fr* **64**, 181–191 (2006).
31. Nielsen, M. K. K. & Johansen, S. S. Internal quality control samples for hair testing. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **188**, 113459 (2020).
32. Kintz, P. Hair analysis in forensic toxicology. *WIREs Forensic Science* **1**, e1196 (2019).
33. Kintz, P. Cannabis et cannabinoïdes de synthèse. À propos de leur détection biologique. *Bull Acad Natl Med* **204**, 577–582 (2020).
34. Moore, C. Response to 'Is THCCOOH a useful determinant for passive inhalation in oral fluid THC testing?' *J Anal Toxicol* **36**, 358 (2012).
35. Berthet, A. *et al.* A systematic review of passive exposure to cannabis. *Forensic Science International* **269**, 97–112 (2016).
36. Moosmann, B., Roth, N. & Auwärter, V. Hair analysis for THCA-A, THC and CBN after passive in vivo exposure to marijuana smoke. *Drug Test Anal* **6**, 119–125 (2014).
37. Kronstrand, R., Förstberg-Peterson, S., Kågedal, B., Ahlner, J. & Larson, G. Codeine concentration in hair after oral administration is dependent on melanin content. *Clin Chem* **45**, 1485–1494 (1999).
38. Pertwee, R. G. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *Int J Obes (Lond)* **30 Suppl 1**, S13-18 (2006).

39. Ohlsson, A. *et al.* Plasma delta-9 tetrahydrocannabinol concentrations and clinical effects after oral and intravenous administration and smoking. *Clin Pharmacol Ther* **28**, 409–416 (1980).
40. Hollister, L. E. *et al.* Do plasma concentrations of delta 9-tetrahydrocannabinol reflect the degree of intoxication? *J Clin Pharmacol* **21**, 171S-177S (1981).
41. Chiang, C. N. & Rapaka, R. S. Pharmacokinetics and disposition of cannabinoids. *NIDA Res Monogr* **79**, 173–188 (1987).
42. Perez-Reyes, M. *et al.* Rate of Penetration of Δ 9-Tetrahydrocannabinol and 11-Hydroxy- Δ 9-Tetrahydrocannabinol to the Brain of Mice. in 179–185 (1976). doi:10.1007/978-3-642-51624-5_15.
43. Rate of Penetration of Δ 9-Tetrahydrocannabinol and 11-Hydroxy- Δ 9-Tetrahydrocannabinol to the Brain of Mice | SpringerLink. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-51624-5_15.
44. Burstein, S. H. *et al.* Antagonism to the actions of platelet activating factor by a nonpsychoactive cannabinoid. *J Pharmacol Exp Ther* **251**, 531–535 (1989).
45. Burstein, S. H. The cannabinoid acids: nonpsychoactive derivatives with therapeutic potential. *Pharmacol Ther* **82**, 87–96 (1999).
46. Doyle, S. A., Burstein, S. H., Dewey, W. L. & Welch, S. P. Further studies on the antinociceptive effects of delta 6-THC-7-oic acid. *Agents Actions* **31**, 157–163 (1990).
47. Zullino, D. F., Delessert, D., Eap, C. B., Preisig, M. & Baumann, P. Tobacco and cannabis smoking cessation can lead to intoxication with clozapine or olanzapine. *Int Clin Psychopharmacol* **17**, 141–143 (2002).
48. Beers, J. L., Fu, D. & Jackson, K. D. Cytochrome P450-Catalyzed Metabolism of Cannabidiol to the Active Metabolite 7-Hydroxy-Cannabidiol. *Drug Metab Dispos* **49**, 882–891 (2021).

49. Benson, M. K. & Bentley, A. M. Lung disease induced by drug addiction. *Thorax* **50**, 1125–1127 (1995).
50. Badowski, S. & Smith, G. Usage de cannabis durant la grossesse et le post-partum. *Can Fam Physician* **66**, e44–e50 (2020).
51. Rock, K. L., Englund, A., Morley, S., Rice, K. & Copeland, C. S. Can cannabis kill? Characteristics of deaths following cannabis use in England (1998-2020). *J Psychopharmacol* **36**, 1362–1370 (2022).
52. Petitet, F., Jeantaud, B., Reibaud, M., Imperato, A. & Dubroeuq, M. C. Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial agonist activity of delta9-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. *Life Sci* **63**, PL1-6 (1998).
53. Yang, F.-C., Zhang, Y. & Rheinstädter, M. C. The structure of people's hair. *PeerJ* **2**, e619 (2014).
54. Sinclair, R. D. Healthy hair: what is it? *J Investig Dermatol Symp Proc* **12**, 2–5 (2007).
55. Alvarez, J. C. *et al.* Hair analysis does not allow to discriminate between acute and chronic administrations of a drug in young children. *Int J Legal Med* **132**, 165–172 (2018).
56. Kintz, P., Ameline, A. & Raul, J.-S. Disappearance of Tramadol and THC-COOH in Hair After Discontinuation of Abuse. Two Different Profiles. *J Anal Toxicol* **44**, 65–68 (2020).
57. Felli, M., Martello, S., Marsili, R. & Chiarotti, M. Disappearance of cocaine from human hair after abstinence. *Forensic Sci Int* **154**, 96–98 (2005).
58. Kintz, P. Issues about axial diffusion during segmental hair analysis. *Ther Drug Monit* **35**, 408–410 (2013).

59. Wang, X. & Drummer, O. H. Review: Interpretation of drug presence in the hair of children. *Forensic Sci Int* **257**, 458–472 (2015).
60. Rey-Salmon, C. & Pépin, G. [Drug-facilitated crime and sexual abuse: a pediatric observation]. *Arch Pediatr* **14**, 1318–1320 (2007).
61. Fig. 1 Schematic plot of the main components of GC–MS instruments.
ResearchGate https://www.researchgate.net/figure/Schematic-plot-of-the-main-components-of-GC-MS-instruments_fig1_273955959.
62. Snow, N. Flying High with Sensitivity and Selectivity: GC–MS to GC–MS/MS. **39**, 61–67 (2021).
63. Hair Laboratory Drug & Alcohol Testing. <https://www.toxicology.abbott/gb/en/lab-services/drug-and-alcohol-hair-testing.html>.
64. Taylor, M. *et al.* Comparison of cannabinoids in hair with self-reported cannabis consumption in heavy, light and non-cannabis users. *Drug Alcohol Rev* **36**, 220–226 (2017).
65. Negative Ion Chemical Ionization (NCI) studies using the Thermo Scientific ISQ 7000 single quadrupole GC-MS system U.S. EPA Method 8270D - FR.
<https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/global/forms/industrial/nci-studies-using-isq-7000-single-quadrupole-gc-ms.html>.
66. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. (2018).
67. Fabritius, M., Staub, C. & Giroud, C. Analyse des cannabinoïdes par spectrométrie de masse en mode tandem. *Ann Toxicol Anal* **23**, 21–35 (2011).
68. *Méthodes recommandées pour l'identification et l'analyse du cannabis et des produits du cannabis (texte révisé et mis à jour): manuel destiné aux laboratoires nationaux d'analyse des drogues.* (Nations Unies, New York, 2010).

69. Romeuf, L. *et al.* Étude de la stabilité du Δ -9-tetrahydrocannabinol et du cannabidiol dans le fluide oral sur écouvillon FLOQSwabs®. *Toxicologie Analytique et Clinique* **35**, 124–132 (2023).
70. Cooper, G. A. A., Kronstrand, R., Kintz, P., & Society of Hair Testing. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Sci Int* **218**, 20–24 (2012).
71. Dybowski, M. P., Dawidowicz, A. L., Rombel, M. & Typek, R. GC vs. HPLC in quantitation of CBD, CBG, Δ 9-THC and CBN in plasma using different sample preparation methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **234**, 115563 (2023).
72. Kieliba, T., Lerch, O., Andresen-Streichert, H., Rothschild, M. A. & Beike, J. Simultaneous quantification of THC-COOH, OH-THC, and further cannabinoids in human hair by gas chromatography-tandem mass spectrometry with electron ionization applying automated sample preparation. *Drug Test Anal* **11**, 267–278 (2019).
73. Wamba, A. G. A. Cannabis sativa : intérêts thérapeutiques du cannabidiol dans la prise en charge des crises d'épilepsie. *75* (2019).
74. Auwärter, V., Wohlfarth, A., Traber, J., Thieme, D. & Weinmann, W. Hair Analysis for Δ 9-Tetrahydrocannabinolic Acid A – New Insights into the Mechanism of Drug Incorporation of Cannabinoids into Hair. *Forensic science international* **196**, 10–3 (2010).
75. Hill, V. A., Schaffer, M. I. & Stowe, G. N. Carboxy-THC in Washed Hair: Still the Reliable Indicator of Marijuana Ingestion. *J Anal Toxicol* **40**, 345–349 (2016).
76. Scollo, G., Potyka, U., Schulte, H. & Moreau, S. High sensitivity analysis of THC-COOH in hair by using UFMS GCMS TQ in Negative Chemical Ionization mode.

77. Cirimele, V., Kintz, P. & Mangin, P. Testing human hair for cannabis. *Forensic Sci Int* **70**, 175–182 (1995).

Abstract

The development and validation method of cannabinoids assay in GC-MS/MS allows to improve analytical performance (sensitivity, specificity), especially on the hair matrix where low concentrations of toxic are found. The integration of this matrix into a complete analysis panel (blood, urine) deepens interpretation of a result and contributes to more accurate and comprehensive assessment of cannabinoid exposure. The transfer of the method to GC/MSMS technique for liquid samples (currently dosed in LC-MS) failed due to a matrix effect on whole blood, causing a lack of sensitivity. The method validation for the CBD and THC assay in hair matrix was a success, these analytes can now be measured in the laboratory. Whereas for THC-COOH, major metabolite for analysis of results, validation was limited to accuracy due to time constraints and the complexity of instrumental parameters impacting sensitivity at low concentrations.

AUTEUR : LABARTHE GUILLAUME

TITRE : Développement et validation de méthode du dosage de cannabinoïdes en GC-MS/MS au laboratoire sur différentes matrices : focus sur la matrice capillaire

Development and validation of GC-MS/MS cannabinoid assay methods in the laboratory on various matrices: focus on the hair matrix

DIRECTEUR DE THESE : Thomas LANOT

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE

Salle 7 CHU Purpan, 18 octobre 2024

RESUME en français

Le développement et la validation de méthodes du dosage des cannabinoïdes en GC-MS/MS permet d'améliorer les performances analytiques (sensibilité, spécificité), en particulier sur la matrice capillaire où l'on retrouve de faibles concentrations en toxiques. L'intégration de cette matrice à un panel d'analyse complet (sang, urine) permet d'étoffer l'interprétation d'un résultat, et contribue à une évaluation plus précise et complète de l'exposition aux cannabinoïdes. Le transfert de la méthode vers la technique de GC/MSMS pour les échantillons liquides (actuellement dosés en LC-MS) n'a pas réussi à aboutir en raison d'un effet matrice sur sang total, provoquant un défaut de sensibilité. La validation de méthode pour le dosage du CBD et THC dans la matrice capillaire a été concluante, ces analytes peuvent dès maintenant être dosés au laboratoire. Tandis que pour le THC-COOH, métabolite majeur pour l'analyse des résultats, la validation s'est limitée à l'exactitude en raison de contraintes temporelles et de la complexité des paramètres instrumentaux impactant la sensibilité aux faibles concentrations.

Titre et résumé en Anglais : voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE administrative : Biologie médicale

MOTS-CLES : cannabinoïdes, cheveux, chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie de masse en tandem

KEYWORDS : cannabinoids, hair, gas chromatography, tandem mass spectrometry

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Laboratoire de pharmacocinétique et toxicologie
Institut fédératif de biologie (IFB)
330, avenue de Grande-Bretagne – TSA 40031 – 31059 Toulouse cedex 9

Directeur de thèse : Thomas LANOT