

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE D'ANALYSE NON CIBLÉE DES NOUVELLES SUBSTANCES
PSYCHOACTIVES AXÉE SUR LE MÉTABOLISME *IN VITRO*

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA

MAÎTRISE EN CHIMIE EXTENSIONNÉE DE
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PAR
GABRIELLE MATTEAU

NOVEMBRE 2025

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES
PROGRAMME CONJOINT MAÎTRISE EN CHIMIE UQAM-UQTR
(M. SC. MAÎTRISE ÈS SCIENCES)

Direction de recherche :

Cyril Muehlethaler directeur de recherche

Nicolas Caron codirecteur de recherche

Jury d'évaluation

Cyril Muehlethaler directeur de recherche

Nicolas Caron codirecteur de recherche

Lekha Sleno évaluatrice interne

Simon Ricard évaluateur externe

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon codirecteur de recherche, Nicolas Caron, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet de recherche particulièrement stimulant. Merci pour ton soutien constant, tes encouragements et ta validation de mes efforts et de mon travail. Tu t'es montré, tout au long de mon parcours, extrêmement généreux sur tous les aspects : dans le partage de tes connaissances scientifiques, avec tes conseils plus personnels qui ont contribué à mon développement en tant que chercheuse et surtout avec ton temps. Malgré ton horaire chargé, tu m'as toujours fait sentir que tu étais disponible pour moi et je t'en suis très reconnaissante. Merci pour la liberté que tu m'as laissée pour l'exploration de ce projet et d'être toujours resté présent en cas de besoin. Ton accompagnement m'a permis de prendre confiance en mes compétences et de me développer en tant que scientifique.

Un grand merci également à mon directeur de recherche, Cyril Muehlethaler, de m'avoir permis de poursuivre mes études à la maîtrise sous sa supervision. Je te remercie pour tes nombreux conseils et pour ta générosité, tant dans le temps que tu m'as consacré que dans l'aide que tu m'as apportée. Ta disponibilité face à toutes les interrogations que j'ai pu avoir au long de mon parcours a été grandement appréciée. Merci également pour ton soutien, notamment dans la recherche de ressources et d'outils pour surmonter certains défis que j'ai rencontrés en cours de route.

Je tiens aussi à remercier Normand Fleury, pour m'avoir permis de rejoindre l'équipe du Centre de toxicologie du Québec et pour le financement qui m'a été généreusement accordé, qui m'a permis de me consacrer pleinement au développement de ce projet et à l'enrichissement de mes connaissances. Merci pour tes précieux conseils tout au long de mon parcours et pour ton soutien.

Je souhaite également remercier tous mes collègues du Centre de toxicologie du Québec, que j'ai eu la chance de côtoyer au cours de ma maîtrise. Je ne pourrais pas nommer tous les membres de cette formidable équipe qui m'ont généreusement aidée, de près ou de loin, dans la réalisation de ce projet. Je me dois cependant de souligner l'aide particulièrement précieuse de Pascal Dubé, qui a contribué avec son temps et son expertise à la réussite de certains objectifs visés pour ce projet, notamment pour le traitement de données qui a été réalisé.

J'aimerais finalement remercier ma famille et mes amis, pour leur écoute, leurs encouragements et leur support au cours de ce cheminement. Un merci tout spécial à mes parents, qui m'ont soutenue et aidée de toutes les manières possibles tout au long de ce parcours. Merci d'être les parents aimants que vous êtes, de croire en moi et de m'encourager jour après jour à persévérer et à atteindre mes buts.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	x
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xi
RÉSUMÉ.....	xii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 VOLET THÉORIQUE	6
1.1 Métabolisme <i>in vitro</i>	6
1.1.1 Principe du métabolisme des substances psychoactives	6
1.1.2 Principaux modèles pour le métabolisme <i>in vitro</i>	8
1.1.2.1 Hépatocytes humains	8
1.1.2.2 Fraction S9	10
1.1.2.3 Cytosol	10
1.1.2.4 Microsomes	11
1.1.2.5 Lignées cellulaires	11
1.1.2.6 Autres modèles.....	12
1.1.3 Choix du modèle de métabolisme <i>in vitro</i> pour le projet.....	13
1.2 Outils analytiques utilisés	14
1.2.1 Principes de la chromatographie liquide à haute performance	14
1.2.2 Spectrométrie de masse avec analyseur quadripôle/temps de vol (QToF).....	16
1.3 Analyse des données de masse à haute résolution	23
CHAPITRE 2 MÉTHODOLOGIE.....	31
2.1 Protocole de génération de métabolites à l'aide de microsomes de foie humain.....	31
2.2 Paramètres instrumentaux	34
2.2.1 Chromatographie liquide à ultra haute performance	34
2.2.2 Spectrométrie de masse	35
2.3 Adaptation de la chromatographie.....	36
2.4 Processus général pour le tri de données.....	37
CHAPITRE 3 RÉSULTATS ET DISCUSSION	41
3.1 Métabolisme <i>in vitro</i> : Optimisation du protocole dans différents modèles.....	41
3.1.1 Midazolam	42

3.1.2 Fentanyl	54
3.2 Adaptation de la chromatographie	68
3.3 Tri des données	75
3.3.1 Solution pure.....	76
3.3.2 Échantillons avec métabolisme	80
3.4 Discussion Générale	89
CONCLUSION	92
ANNEXE A Paramètres finaux de la méthode de tri des données avec le logiciel MZmine v.4.1.0	95
BIBLIOGRAPHIE.....	96

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Préparation de fractions subcellulaires de foie. (19)	9
Figure 1.2 Schéma d'un quadripôle (29)	18
Figure 1.3 Schéma d'un analyseur quadripôle/temps de vol (30)	19
Figure 1.4 Représentation schématique du mode MS ^E . L'ion précurseur est identifié en rouge et ses fragments sont indiqués en bleu. (36).....	22
Figure 1.5 Représentation schématique du flux de travail proposé par MZmine pour la génération d'une liste de <i>features</i> à partir de données brutes obtenues par analyse LC-MS et LC-MS/MS. (38)	24
Figure 3.1 Métabolisme de phase I du midazolam, selon la littérature (46)	43
Figure 3.2 Superposition de chromatogrammes associés à un [M + H] ⁺ de 342,0809, présentant un contrôle négatif (bas), un échantillon avec métabolisme (centre) et un contrôle utilisé au laboratoire contenant le 1'-hydroxymidazolam (haut)	46
Figure 3.3 Superposition de chromatogrammes associés à un [M + H] ⁺ de 358,0758, présentant un contrôle négatif (bas), un échantillon avec métabolisme (centre) et un étalon combiné utilisé au laboratoire (haut)	48
Figure 3.4 Pourcentage relatif du midazolam restant selon le temps d'incubation pour les trois concentrations testées	50
Figure 3.5 Variation du pourcentage relatif selon le temps pour les trois concentrations testées pour A) le 1'-hydroxymidazolam, B) le 4-hydroxymidazolam et C) le 1',4-dihydroxymidazolam.....	52
Figure 3.6 Métabolisme du fentanyl, selon la littérature. (51)	55
Figure 3.7 Structures des métabolites les plus courants du fentanyl	56
Figure 3.8 Superposition de chromatogrammes associés à un [M + H] ⁺ de 233,1654, présentant un contrôle négatif (bas), un échantillon avec métabolisme (centre) et un étalon combiné utilisé au laboratoire (haut)	59
Figure 3.9 Superposition de chromatogrammes associés à un [M + H] ⁺ de 353,2229, présentant un contrôle négatif (bas), un échantillon avec métabolisme (centre) et un étalon combiné utilisé au laboratoire (haut)	60
Figure 3.10 Fragments principaux du fentanyl (F), selon la littérature (53)	61
Figure 3.11 Séparation entre les composés sélectionnés avant l'allongement de la chromatographie	69
Figure 3.12 Gradients testés pour l'allongement de la chromatographie	70

Figure 3.13 Résolution entre les composés sélectionnés selon les quatre chromatographies testées.....	71
Figure 3.14 Chromatogrammes superposés des composés A à D, avec la chromatographie initiale (haut) et la chromatographie de quinze minutes (bas).....	72
Figure 3.15 Variation de la hauteur maximale (% relatif) des 10 composés, pour les quatre chromatographies testées.....	73
Figure 3.16 Candidats inconnus (CI) et composés cibles (CC) détectés par MZmine pour les conditions A à I testées en solution pure.....	78
Figure 3.17 Candidats inconnus (CI) et composés cibles (CC) restants après la soustraction du blanc pour les conditions A à C.....	79
Figure 3.18 Candidats inconnus (CI) et composés cibles (CC) détectés par MZmine pour les conditions A à C testées avec les échantillons post métabolisme <i>in vitro</i> du midazolam.....	83
Figure 3.19 Candidats inconnus (CI) et composés cibles (CC) restants après la soustraction du contrôle négatif pour les conditions A à C.....	84
Figure 3.20 Candidats inconnus (CI) et composés cibles (CC) restants après la soustraction du contrôle négatif combinée à l'application du filtre de temps de rétention pour les conditions A à C.....	85

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Principales réactions métaboliques de phase I et II et leurs enzymes associées (12,14,15)	7
Tableau 1.2 Niveaux de confiance proposés par Schymanski et al. pour l'analyse en spectrométrie de masse à haute résolution (44)	29
Tableau 2.1 Gradient utilisé pour la chromatographie liquide à ultra haute performance (UPLC).....	34
Tableau 2.2 Paramètres instrumentaux utilisés pour le spectromètre de masse quadripôle/temps de vol (QToF)	35
Tableau 3.1 Informations expérimentales et théoriques sur le midazolam et les trois métabolites présumés. (48–50).....	45
Tableau 3.2 Informations expérimentales et théoriques sur le fentanyl et les cinq métabolites présumés. (52,53).....	57
Tableau 3.3 Valeurs théoriques des $[M + H]^+$ des trois différents fragments, avant et après une hydroxylation.....	62
Tableau 3.4 Fragments trouvés pour les différents métabolites présumés	62
Tableau 3.5 Classification qualitative de la détection de quatre métabolites créés lors de l'expérience de métabolisme du fentanyl.....	65
Tableau 3.6 Classification qualitative de la détection des fragments caractéristiques de quatre métabolites créés lors de l'expérience de métabolisme du fentanyl.....	66
Tableau 3.7 Assignation des composés sélectionnés pour l'allongement de la chromatographie	68
Tableau 3.9 Résolution entre les composés sélectionnés selon les quatre chromatographies testées.....	70
Tableau 3.9 Composés ajoutés en solution pure pour les tests de tri des données.....	76
Tableau 3.10 Combinaisons de paramètres testées en solution pure pour le tri des données.....	77
Tableau 3.12 Pourcentages de diminution des candidats inconnus (CI) après la soustraction du blanc pour les conditions A à C.....	80
Tableau 3.13 Métabolites attendus dans les tests de tri des données réalisés avec des échantillons post-métabolisme <i>in vitro</i> du midazolam	81
Tableau 3.14 Conditions testées avec les échantillons résultant de l'expérience de métabolisme <i>in vitro</i> du midazolam	81
Tableau 3.15 Pourcentages de diminution des candidats inconnus pour les conditions A à C, après la soustraction du blanc seule et la soustraction du blanc combinée au filtre de temps de rétention.	86

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

CC	Composé cible
CI	Candidat inconnu
CTQ	Centre de toxicologie du Québec
CYP450	Cytochrome P450
DDA	<i>Data-dependant acquisition</i>
DIA	<i>Data-independent acquisition</i>
EIC	<i>Extracted ion chromatogram</i>
ESI	Nébulisation électrostatique
FMO	Flavine monooxygénase
G6P	Glucose-6-phosphate
G6P-DH (G6P-D)	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GST	Gluthathion S-transférase
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
NADP+	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAT	<i>N</i> -acétyltransférase
NSP	Nouvelle substance psychoactive
ONU DC	Office des Nations Unies contre la drogue et le crime
QQQ	Analyseur triple quadripôle
QToF	Analyseur à quadripôle/temps de vol
RRF	<i>Relative response factor</i>
SAD	Service d'analyse des drogues (Santé Canada)
SULT	Sulfotransférase
UGT	UDP-glucuronosyltransférase
UPLC	Chromatographie liquide à ultra haute performance

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

°C	Degré Celcius
h	Heure
kV	Kilovolt
LD	Limite de détection
L/h	Litre par heure
M	Mole par litre
mg/mL	Milligramme par millilitre
[M + H] ⁺	Ion moléculaire protoné
min	Minute
mL/min	Millilitre par minute
mm	Millimètre
mM	Millimole par litre
m/z	Rapport masse sur charge
ng/mL	Nanogramme par millilitre
t _R	Temps de rétention
U/mL	Unité enzymatique par millilitre
V	Volt
x g	Force centrifuge
% v/v	Pourcentage volumique
µg/mL	Microgramme par millilitre
µL	Microlitre
µm	Micromètre

RÉSUMÉ

Depuis plusieurs décennies, les nouvelles substances psychoactives (NSP) connaissent une expansion rapide et un renouvellement constant. Ce phénomène pose de nombreux défis pour les laboratoires de toxicologie clinique ayant le mandat de détecter ces composés dans des spécimens biologiques issus de cas d'intoxication. Malgré que ces laboratoires s'appuient principalement sur la détection des drogues mères, leurs métabolites représentent également des biomarqueurs d'une grande importance pour leur identification. L'approche utilisée repose généralement sur des méthodes d'analyse dites ciblées, qui nécessitent de se procurer un composé et de l'ajouter à une base de données pour pouvoir procéder à son identification future. Le renouvellement rapide des NSP limite souvent les connaissances sur leurs métabolites et l'accès à des étalons, ce qui complique grandement leur identification. Ce projet réalisé avec le Centre de toxicologie du Québec (CTQ) visait, dans son ensemble, à explorer le potentiel de l'analyse non ciblée et du métabolisme *in vitro* pour la détection des nouvelles substances psychoactives. L'essai d'un protocole de génération de métabolites à l'aide de microsomes de foie humain a été réalisé sur deux modèles au métabolisme bien documenté dans la littérature, soit le midazolam et le fentanyl. Les expériences ont permis de produire plusieurs métabolites pour chacun des modèles, certains confirmés à l'aide d'étalons, d'autres présumés dû à l'absence d'étalons disponibles. La concentration initiale du substrat et la durée de l'incubation se sont révélés être des paramètres importants pour obtenir une perspective élargie sur le métabolisme d'une substance. Une méthode de chromatographie liquide couramment employée au laboratoire pour le dépistage des drogues et médicaments a été modifiée afin d'optimiser la séparation des métabolites. Différents gradients d'élution ont été testés et ont démontré une efficacité pour la séparation de composés plus hydrophiles, mais l'augmentation du temps d'analyse a engendré l'élargissement des pics et une perte de signal. Une méthode de quinze minutes s'est avérée être le meilleur compromis à ce niveau. Une méthode de tri des données issues de l'analyse non ciblée a été développée à l'aide du logiciel MZmine v.4.1.0, afin de permettre l'émergence des métabolites créés *in vitro*. Le processus, lorsqu'il a été appliqué avec les paramètres et les étapes jugés les plus efficaces pour cette série de tests, a permis de réduire le nombre de pics inconnus à investiguer de 783 à 40. Les connaissances acquises et les résultats générés dans le cadre de ce projet permettent de contribuer de manière importante à l'avancement d'une méthode permettant de faciliter l'identification de nouvelles substances psychoactives dans des spécimens biologiques.

Mots clés : Nouvelles substances psychoactives (NSP), spectrométrie de masse non ciblée, métabolisme *in vitro*, chromatographie en phase liquide, toxicologie clinique.

INTRODUCTION

Depuis plusieurs décennies, la santé et la sécurité publiques font face à un problème alarmant concernant la consommation par la population de composés psychoactifs peu connus. Les nouvelles substances psychoactives (NSP) sont définies par l'Office des Nations Unies contre la drogue et le crime (ONUDC) comme « des substances dont il est fait abus, consommées pures ou sous la forme de préparations, qui ne sont contrôlées ni par la Convention unique sur les stupéfiants de 1961 ni par la Convention sur les substances psychotropes de 1971 mais qui peuvent toutefois représenter une menace de santé publique ». Elles sont également connues sous les noms de drogues de synthèse ou d'euphorisants légaux. (1)

Les molécules conçues sont souvent des analogues de drogues contrôlées et de médicaments déjà existants, donc avec une structure chimique très semblable à ces derniers. Elles peuvent également être de tout nouveaux composés dont la structure n'est pas apparentée à des substances existantes, mais qui sont délibérément créés pour imiter les effets psychoactifs de médicaments ou de drogues dont l'usage est réglementé. Les NSP forment un groupe hétérogène de molécules, appartenant à diverses familles et classes pharmacologiques, et présentent une grande variabilité tant au niveau de leur structure chimique que de leurs effets. (2) Elles peuvent être proposées telles quelles, utilisées pour couper une autre drogue, ou encore être vendues à l'insu du consommateur, qui pensait acheter une autre substance. Le coupage d'une drogue peut impliquer divers types d'agents : des adultérants (substances psychoactives ajoutées pour modifier ou renforcer les effets), des diluants (substances non psychoactives ajoutées pour augmenter le volume), ou encore des contaminants (substances présentes de manière non intentionnelle, souvent issues du processus de fabrication, pouvant être psychoactives ou non). (3) Cette méconnaissance de la composition réelle des drogues accroît considérablement le risque d'intoxication. Pour les NSP, le terme « nouvelles » n'implique pas nécessairement que le composé a été récemment synthétisé. Il est plutôt utilisé pour parler d'une drogue nouvellement arrivée sur le marché. (4)

Dans le but de contourner les lois, de nouveaux composés sont constamment synthétisés. Les NSP représentent un phénomène mondial, avec à ce jour 151 pays et territoires en ayant rapporté au minimum une au Système d'alerte précoce de l'ONUDC sur les nouvelles substances psychoactives. Depuis 2013, environ 1350 substances distinctes ont été signalées à l'ONUDC. (5) L'implication de chaque pays dans le signalement de NSP dépend de divers facteurs, mais elle est directement influencée par ses ressources

scientifiques. Au Canada, très peu de laboratoires ont le mandat d'identifier de nouvelles substances psychoactives ou sont simplement en mesure de le faire. Les drogues saisies par les corps policiers à travers le pays sont généralement envoyées au Service d'analyse des drogues (SAD) de Santé Canada, qui en assure l'examen et l'identification. Il s'agit du seul organisme qui recense les NSP identifiées à chaque année au Canada. Depuis 2021, il a signalé annuellement entre 11 et 28 NSP identifiées pour la première fois, à partir des échantillons qui lui ont été soumis. (6)

Les valeurs recensées représentent uniquement les substances qui ont été découvertes, elles ne sont pas représentatives du nombre total de NSP circulant dans la population. Le SAD, pour sa part, ne reçoit que des spécimens de drogues saisies par les autorités policières ou des spécimens de drogues d'intérêt soumis par des organismes de santé publique provinciaux à des fins d'enquêtes épidémiologiques. Il n'a pas nécessairement la capacité d'identifier des NSP présentes dans des spécimens biologiques de consommateurs, comme il est le cas pour de nombreux laboratoires.

Les laboratoires qui ont pour mandat d'identifier des substances psychoactives dans des spécimens biologiques, comme il est le cas au CTQ, le font habituellement à l'aide de méthodes d'analyse dites ciblées. Celles-ci se basent sur des données de référence obtenues expérimentalement à partir d'étalons analytiques. Pour pouvoir être identifié dans le futur, un composé doit donc préalablement être obtenu d'un fournisseur certifié. Cette façon de procéder présente plusieurs limites dans le contexte de l'identification de nouvelles substances psychoactives puisqu'en raison de leur prolifération rapide, il devient difficile, voire impossible, de se procurer des étalons pour pouvoir les identifier. (7) Une raison expliquant cela est que les NSP disparaissent généralement aussi rapidement qu'elles sont créées, souvent dans un délai de quelques mois seulement. (8) Après qu'une NSP soit arrivée sur le marché, un certain temps se déroule généralement avant qu'elle ne soit découverte par les forces de l'ordre ou la santé publique. La production d'un étalon certifié qui s'ensuit peut prendre de 6 à 24 mois et est ensuite suivie de délais supplémentaires pour son acquisition par les laboratoires, notamment en raison des réglementations entourant ces substances, surtout lorsqu'elles sont commercialisées à l'étranger. (4) Ces délais cumulés empêchent souvent une identification au moment opportun. Lorsqu'une NSP est finalement acquise par un laboratoire, elle a fréquemment disparu du marché ou a été remplacée, et a entre-temps pu causer des effets néfastes dans la population. (7)

L'identification de nouvelles substances psychoactives dans des spécimens biologiques soulève un défi supplémentaire. Des laboratoires de toxicologie clinique, dont le CTQ fait partie, reçoivent régulièrement des spécimens de matrice biologique de gens victimes d'intoxications. Ces spécimens ne contiennent souvent que très peu du composé initial, et vont plutôt contenir ses métabolites, vu le processus de biotransformation réalisé par le corps suite à la consommation d'une substance. Les métabolites sont par conséquent très importants pour identifier la substance consommée, et constituent parfois les seuls marqueurs permettant de le faire. Le problème ici est qu'avec le roulement rapide des NSP leur métabolisme est souvent inconnu et qu'il peut être complexe de connaître la nature des composés qui devraient être détectés dans le spécimen d'une personne ayant consommé une nouvelle substance. Tout comme pour leur molécule mère, l'identification des métabolites à l'aide d'une méthode d'analyse ciblée nécessite un étalon analytique. L'obtention d'étalons de métabolites s'avère encore plus complexe que pour leur molécule mère, notamment parce qu'ils sont méconnus et qu'ils ne sont souvent pas disponibles chez des fournisseurs certifiés. (9) Les limites actuelles des analyses non ciblées par rapport au renouvellement constant des nouvelles substances psychoactives entraînent un retard sur les connaissances de ces composés qui ne cesse de croître.

Une solution de plus en plus adoptée par les laboratoires pour contrer cette problématique consiste à recourir à des méthodes d'analyse dites non ciblées. Contrairement aux méthodes d'analyse ciblées qui ne détectent que des composés présélectionnés dont les étalons sont disponibles à l'interne, celles non ciblées permettent optimalement de détecter l'ensemble des composés présents dans un échantillon, sans nécessiter de connaissance préalable sur leur nature ou d'étalons analytiques. Cette capacité à identifier des composés inconnus sans nécessiter d'étalons confère aux analyses non ciblées un avantage significatif face aux défis posés par l'évolution constante des NSP. (10)

Ce projet de maîtrise vise, dans son ensemble, à explorer le potentiel de l'analyse non ciblée pour la détection des nouvelles substances psychoactives avec une approche axée sur l'identification des métabolites de ces drogues. Comme le CTQ reçoit des spécimens de matrice biologique et non des drogues sous leur forme pure, la connaissance des métabolites des nouvelles substances psychoactives est primordiale. Malheureusement, non seulement ils demeurent souvent méconnus, mais les étalons des métabolites sont bien plus souvent indisponibles que ceux des molécules mères correspondantes. Pour contourner ces obstacles, ce projet propose de générer des métabolites à l'interne à partir de la molécule mère, dans le cas où un étalon est accessible pour celle-ci, en utilisant des incubations *in vitro*. Cette

stratégie vise à prédire leur biotransformation *in vivo* et à ainsi faciliter leur détection future par des analyses non ciblées, ce qui permettrait d'anticiper les métabolites potentiels d'une nouvelle drogue et de renforcer la capacité du laboratoire à répondre efficacement au rythme soutenu des changements observés dans le marché des NSP.

L'analyse non ciblée amène de nombreux avantages et a un potentiel clairement intéressant dans le contexte des nouvelles substances psychoactives, mais elle génère une importante quantité de données qui sont généralement complexes à interpréter. Il est donc nécessaire de trouver un moyen de les traiter efficacement afin d'en retirer des informations pertinentes dans un délai raisonnable.

Ce projet a été réalisé selon une approche exploratoire qui visait à amorcer le développement d'un protocole adapté aux besoins du CTQ concernant la détection des métabolites de NSP dans des spécimens biologiques. Un premier objectif, qui a constitué une partie importante de la démarche, était de procéder à une recherche théorique approfondie couvrant différents concepts reliés au projet. Cette dernière visait à mieux comprendre le processus de métabolisme *in vitro* ainsi que les différents modèles permettant sa mise en œuvre, pour arriver ultimement à choisir celui qui serait le mieux aligné avec les intentions de l'étude. Elle avait également pour but de se familiariser avec les étapes du traitement des données découlant de l'analyse non ciblée ainsi que les différents logiciels et outils informatiques permettant d'obtenir d'avantage d'informations à partir des données brutes résultant de ce type d'analyse. Suite à cette recherche, un second objectif du projet a été de tester une méthode *in vitro* de génération de métabolites avec le modèle sélectionné et de déterminer les conditions permettant de maximiser la performance du processus.

La mise en place d'une méthode analytique non ciblée est nécessaire pour permettre de détecter les métabolites créés *in vitro*. Le CTQ a présentement une méthode d'analyse ciblée permettant le dépistage de plus de 300 drogues et médicaments, qui inclut également quelques métabolites en proportion plus restreinte. Un troisième objectif de ce projet était donc d'adapter la chromatographie incluse dans cette méthode analytique pour qu'elle soit mieux alignée avec les besoins du projet, donc une chromatographie adaptée à l'analyse non ciblée, qui priorise par le fait même le dépistage de métabolites de drogues. Un dernier objectif spécifique de ce projet était de développer une méthode permettant de trier efficacement les données issues de l'analyse non ciblée, afin de faire ressortir les métabolites générés *in vitro* et de faciliter leur investigation subséquente.

Le processus expérimental a été séparé en trois volets distincts, qui seront présentés de façon indépendante : 1) le test d'un protocole de métabolisme *in vitro* dans deux modèles différents 2) l'adaptation de la chromatographie actuellement utilisée au laboratoire 3) le développement d'une méthode de tri des données non ciblées pour permettre l'émergence des métabolites.

Le premier chapitre de ce mémoire présentera les notions théoriques acquises au cours du projet et expliquera certains concepts essentiels à la compréhension des méthodes employées et des résultats obtenus. Le second chapitre décrira en détail la méthodologie employée pour chacun des trois volets expérimentaux. Le troisième chapitre présentera quant à lui les résultats obtenus au cours de ce projet, avec une discussion détaillée sur ces derniers. Enfin, une conclusion viendra clore ce travail en mettant en évidence les points marquants du projet et en proposant quelques perspectives futures à celui-ci.

CHAPITRE 1

VOLET THÉORIQUE

1.1 Métabolisme *in vitro*

1.1.1 Principe du métabolisme des substances psychoactives

Lorsqu'une substance toxique est introduite dans l'organisme, elle suit un cheminement qui peut être divisé en quatre processus distincts regroupés sous l'acronyme ADME (pour absorption, distribution, métabolisme et excrétion). La phase d'absorption correspond au passage de la substance du site d'administration à la circulation sanguine. Celle-ci peut ensuite être distribuée par le sang aux différents organes et tissus. La substance peut ensuite subir dans certains organes un processus de transformation métabolique, qui sera décrit de façon plus détaillée dans cette section, avant d'être excrétée de l'organisme. (11) La phase de métabolisme est d'une grande importance dans le cadre de ce projet, puisqu'elle détermine la nature des composés qui seront ultérieurement observés dans le spécimen d'une personne victime d'une intoxication.

Le métabolisme d'un médicament ou d'une drogue désigne l'ensemble des biotransformations que l'organisme va faire subir à la substance avant son excrétion. Le rôle de ce métabolisme est habituellement de rendre le composé plus hydrophile, ce qui aura dans la majorité des cas pour effet de diminuer son niveau de toxicité, parfois jusqu'à le rendre inactif pharmacologiquement, et facilitera son élimination de l'organisme principalement par l'urine, mais aussi via les selles, la sueur ou l'air expiré. (12) Plusieurs organes peuvent participer au métabolisme d'une drogue, comme les reins, les intestins et les poumons. Cependant, le foie est le site principal de biotransformation des xénobiotiques, c'est-à-dire des substances étrangères à un organisme vivant, en raison de sa position stratégique entre le système digestif et la circulation systémique et de son haut taux d'enzymes responsables des réactions métaboliques. Les cellules qui exercent les fonctions métaboliques du foie se nomment les hépatocytes. (12,13)

Le métabolisme des drogues et médicaments peut être divisé en deux phases, où la substance mère subira différentes réactions qui viseront à augmenter sa polarité. Les réactions de phase I (aussi appelées réactions de fonctionnalisation) rendront la molécule légèrement plus hydrophile grâce à une oxydation, une réduction ou une hydrolyse de celle-ci. Les réactions de phase II (ou réactions de conjugaison) assureront quant à elles le transfert d'un groupement provenant d'un substrat endogène vers le

xénobiotique, créant par le fait même un métabolite beaucoup plus hydrophile que sa substance mère. Ces deux phases peuvent se succéder : une réaction de fonctionnalisation peut créer un métabolite qui sera par la suite transformé par une réaction de conjugaison. (12)

Tableau 1.1 Principales réactions métaboliques de phase I et II et leurs enzymes associées (12,14,15)

	Réaction	Enzyme(s)
Phase I	Oxydation	Cytochromes P450 (CYP450), Flavine monooxygénases (FMO)
	Réduction	Réductases
	Hydrolyse	Estérases, Amidases
Phase II	Glucuronidation	UDP-glucuronosyltransférases (UGT)
	Sulfatation	Sulfotransférases (SULT)
	Acétylation	<i>N</i> -acétyltransférases (NAT)
	Conjugaison GSH	Glutathion S-transférases (GST)
	Méthylation	Méthyltransférases

Les cytochromes P450 (CYP450) sont une superfamille d'enzymes responsables du métabolisme de phase I de la majorité des xénobiotiques. Ce sont des hémoprotéines, donc des protéines contenant un groupe hème comme cofacteur, qui sont retrouvées majoritairement dans le foie, bien qu'elles soient également retrouvées en faibles quantités dans d'autres organes. Les enzymes du cytochrome P450 sont aussi qualifiées d'isoenzymes. Cette superfamille d'enzymes est divisée en plus grandes familles dont les membres ont approximativement 40 % de similitudes entre eux, et en sous-familles avec environ 55 % d'homologie entre les membres. La nomenclature des isoenzymes du cytochrome P450 est établie en fonction de leur classification. Elle débute par le symbole de base « CYP », suivi d'un nombre indiquant la famille, d'une lettre désignant la sous-famille, et d'un dernier nombre identifiant l'isoenzyme spécifique. Par exemple, CYP3A4 correspond à une enzyme appartenant à la famille 3, à la sous-famille A, et est classée comme quatrième isoenzyme identifiée dans cette catégorie. (16,17)

Les trois familles du cytochrome P450 qui sont responsables du métabolisme des médicaments sont CYP1, CYP2 et CYP3. Six isoenzymes, à elles seules, ont pour substrat la grande majorité de ces composés, soit CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 et CYP3A4. Parmi elles, CYP3A4 est responsable du métabolisme d'environ 50 % des médicaments et drogues métabolisées par le cytochrome P450. Une même substance peut être métabolisée par plusieurs isoenzymes distinctes. (16,17)

1.1.2 Principaux modèles pour le métabolisme *in vitro*

Au cours des dernières décennies, plusieurs modèles *in vitro* ont été développés dans le but de reproduire le métabolisme des médicaments et des drogues. Une partie essentielle de ce projet consistait à déterminer lequel parmi ceux-ci était le mieux adapté pour répondre aux besoins spécifiques de cette étude et de ceux du CTQ. Afin de garantir un choix éclairé, une revue approfondie de la littérature a été réalisée, ce qui a permis de mieux comprendre les différentes approches qui étaient disponibles. Ce travail a été crucial pour identifier non seulement les forces et les limites de chaque modèle, mais aussi leur pertinence dans le contexte précis de cette étude. Cette sous-section présentera donc les principaux modèles employés pour le métabolisme *in vitro* qui ont été répertoriés dans la littérature avec une description de leurs caractéristiques, mais aussi de leurs aspects positifs et négatifs.

1.1.2.1 Hépatocytes humains

L'utilisation d'hépatocytes humains, donc de cellules de foie intactes, est un choix populaire pour les études de métabolisme *in vitro* puisqu'ils sont très représentatifs des conditions *in vivo*. Ils contiennent toutes les enzymes de phase I et II permettant le métabolisme des xénobiotiques. Ils sont principalement utilisés sous deux formes, en suspension ou comme cellules adhérentes. Les hépatocytes sous forme adhérente offrent une durée de vie supérieure, allant jusqu'à un maximum de quatre semaines. Il a cependant été démontré que cette forme est sujette à une diminution de l'expression des enzymes du CYP450 selon le temps, avec une variation de l'effet pour chaque isoforme. La cryopréservation d'hépatocytes primaires vendus sous forme de suspension est maintenant effectuée pour pallier à la courte stabilité de cet outil. (13,18)

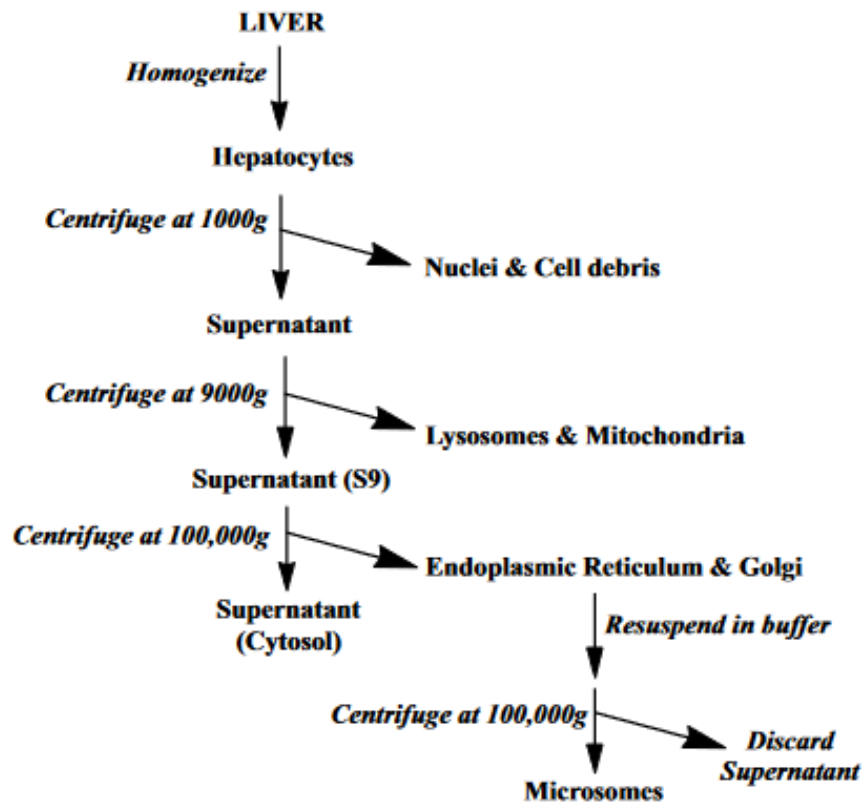
Ce modèle, étant utilisé depuis de nombreuses années, est bien connu et caractérisé. Une abondance de données est donc disponible dans la littérature à son sujet, contenant autant des informations sur son utilisation générale que des études précédentes l'ayant employé. Cela constitue une base solide et fiable pour orienter et valider les tests dans de nouvelles recherches. Il est aussi l'un des modèles les plus

représentatifs de la situation *in vivo*, grâce à sa grande diversité enzymatique et sa capacité à reproduire les interactions biologiques d'une cellule intacte, comme elles se produisent normalement dans un environnement naturel. (13,18)

Il est cependant coûteux, un aspect à considérer vu sa durée de vie plutôt limitée. Il peut également comporter des variations interindividuelles, ce qui peut être compensé grâce à l'utilisation d'un *pool* (mélange) d'hépatocytes provenant de plusieurs donneurs. (18)

À partir d'hépatocytes ou de morceaux de foie, il est possible de générer d'autres fractions hépatiques permettant de produire des métabolites de médicaments et drogues. Ces fractions contiennent des enzymes de différentes natures, permettant de répondre à différents besoins selon les études. Ils sont obtenus à la suite de plusieurs centrifugations d'hépatocytes, ce qui est illustré à la figure 1.1. Les modèles résultants sont la fraction S9, le cytosol et les microsomes. Ils seront décrits davantage plus loin dans cette section.

Figure 1.1 Préparation de fractions subcellulaires de foie. (19)



1.1.2.2 Fraction S9

La fraction S9 est une préparation subcellulaire obtenue à partir d'hépatocytes et est composée des fractions cytosolique et microsomale qui seront décrites ultérieurement. Ces deux sous-fractions sont complémentaires en contenu enzymatique et la fraction S9 contient donc dans son ensemble les enzymes permettant les réactions de phase I et II du métabolisme des xénobiotiques. (19)

Comparativement à ses deux sous-fractions, la fraction S9 permet de représenter de façon relativement complète le profil métabolique d'un médicament ou d'une drogue, puisqu'elle permet autant les réactions de fonctionnalisation que de conjugaison. Elle est plus facile à manipuler que les hépatocytes et sa conservation est plus simple que pour ces derniers puisqu'elle peut être préparée à l'avance, congelée et stockée durant de longues périodes sans perte d'activité enzymatique. De plus, elle est une option plus abordable que les hépatocytes. (13,19)

La fraction S9 constitue un modèle simplifié des hépatocytes avec une capacité métabolique notable, mais elle ne peut cependant pas recréer avec autant d'exactitude les conditions *in vivo* que les hépatocytes, en raison de l'absence de compartimentalisation cellulaire et de certains composés présents dans les cellules intactes, ce qui limite sa capacité à reproduire pleinement les interactions biologiques complexes présentes chez l'humain. Contrairement aux hépatocytes, l'utilisation de la fraction S9 nécessite l'ajout de cofacteurs pour permettre l'activité enzymatique. Finalement, elle entraîne une plus faible expression enzymatique que l'utilisation exclusive du cytosol ou des microsomes. (13,19)

1.1.2.3 Cytosol

Le cytosol est une sous-fraction de la fraction S9 et est relativement peu utilisé dans les études de métabolisme *in vitro* (18). Il comprend principalement des enzymes de phase II, telles que les glutathion S-transférases (GST), les N-acétyltransférases (NAT), les sulfotransférases (SULT) et les méthyltransférases. Tout comme pour la fraction S9, ses enzymes nécessitent l'ajout de cofacteurs exogènes pour exprimer leur activité. (13,19)

L'avantage du cytosol est que ses enzymes sont présentes en concentration supérieure comparativement à celle dans la fraction S9, puisqu'elles ne subissent pas de dilution supplémentaire. Le désavantage de l'utilisation de ce modèle est que seulement les enzymes de phase II solubles s'y retrouvent, ce qui exclut les UDP-glucuronosyltransférases (UGT) et par conséquent, les voies métaboliques qui sont associées à

ces enzymes ne peuvent pas être investiguées. Il ne contient également aucune enzyme de phase I et il est donc impossible d'obtenir un métabolisme complet avec la fraction cytosolique. (13)

1.1.2.4 Microsomes

Les microsomes de foie humain, tout comme le cytosol, sont une sous-fraction de la fraction S9. Ils sont un des modèles les plus utilisés pour les études de métabolisme *in vitro*. Leur contenu en enzymes est complémentaire au cytosol et ils contiennent donc majoritairement des enzymes responsables du métabolisme de phase I et les UDP-glucuronosyltransférases (UGT). Ils nécessitent, au même titre que la fraction S9 et le cytosol, l'utilisation de cofacteurs exogènes pour permettre la formation de métabolites.

Un des avantages des microsomes de foie humain, comparativement à la fraction S9, est l'expression plus élevée de leurs enzymes permettant le métabolisme, puisque ces dernières ne sont pas diluées dans le cytosol. D'autres aspects positifs des microsomes sont leur coût abordable et leur simplicité d'utilisation et de conservation. Ils sont également un des modèles *in vitro* les mieux caractérisés pour la recherche sur le métabolisme des médicaments et drogues.

Ce modèle n'est cependant pas adapté pour les études de métabolisme de phase II ou pour recréer un profil métabolique semblable à la situation *in vivo*. Il ne peut également pas être utilisé pour tenter d'estimer de manière quantitative les biotransformations produites chez l'humain, puisque les enzymes CYPs et UGTs sont enrichies dans la fraction microsomale et n'entrent en compétition avec aucune autre enzyme. Comme pour plusieurs autres modèles, les microsomes peuvent présenter un contenu en enzymes qui varie d'un individu à l'autre. Ce problème peut heureusement être surmonté grâce à l'utilisation d'un *pool* de plusieurs donneurs. (13,18)

1.1.2.5 Lignées cellulaires

Il est également possible d'utiliser des lignées cellulaires pour les études de métabolisme *in vitro*. Les lignées cellulaires qui sont choisies pour de telles études sont généralement issues de tumeurs ou sont modifiées génétiquement pour augmenter leur vitesse de prolifération. Une exigence essentielle est qu'elles doivent reproduire le plus fidèlement possible la physiologie des hépatocytes humains dans des conditions *in vivo*. Deux lignées cellulaires bien connues dans ce domaine sont Hep G2 et HepaRG.

Comparativement aux hépatocytes, les lignées cellulaires ont l'avantage d'être plus simple à garder en culture, vu leur stabilité et leur aptitude à proliférer indéfiniment. Elles offrent donc une durée de vie non limitée, ce qui est un aspect non négligeable vu leur coût plutôt élevé. Elles constituent cependant un modèle de métabolisme *in vitro* moins populaire que les microsomes ou les hépatocytes. Cela peut être expliqué tout d'abord par un phénomène nommé dédifférenciation cellulaire, qui entraîne une perte progressive des caractéristiques propres aux hépatocytes, réduisant ainsi leur ressemblance avec ces derniers et leur fonctionnalité en tant que modèle de métabolisme *in vitro* au fil du temps. Elles ont également une activité enzymatique beaucoup plus faible que certains autres modèles, ce qui limite leurs applications. Enfin, leur entretien nécessaire et leur utilisation plus complexe que d'autres modèles en font un outil moins favorisé dans les études. (13,20)

1.1.2.6 Autres modèles

Quelques autres modèles, moins populaires, peuvent aussi permettre de réaliser des études de métabolisme *in vitro*. Parmi ceux-ci figurent les microsomes contenant des enzymes humaines recombinantes, vendus entre autres sous le nom commercial Supersomes®. Ils sont issus de cellules d'insectes, qui ne contiennent à la base aucune activité des CYPs et des UGTs. Ces cellules sont modifiées génétiquement pour exprimer une de ces enzymes de façon plus ciblée, puis les microsomes sont isolés à partir de celles-ci. Un type de microsome recombinant peut donc exprimer uniquement l'activité enzymatique de l'isoenzyme CYP3A4, par exemple. Ce modèle est surtout utilisé pour étudier les réactions métaboliques catalysées par des enzymes spécifiques. Il n'est donc pas adapté pour étudier un métabolisme plus complexe d'un médicament, orchestré par plusieurs enzymes. (13)

Enfin, des tranches de foie ou un foie perfusé isolé de source animale sont parfois utilisés pour des études sur le métabolisme des médicaments. Ils sont considérés comme des modèles de qualité permettant de reproduire un métabolisme *in vitro* de façon relativement fiable, mais ils comportent de nombreux désavantages. Ces derniers incluent une difficulté au médium expérimental à pénétrer à l'intérieur des tissus, une faible reproductibilité des résultats et une courte viabilité dû au processus de cryopréservation non optimisé pour ces types de produits. Ces modèles ne sont pas bien caractérisés et impliquent une manipulation beaucoup plus complexe que pour d'autres produits. (13)

1.1.3 Choix du modèle de métabolisme *in vitro* pour le projet

Les microsomes de foie humain ont été choisis comme modèle de métabolisme *in vitro*, car ils répondent de manière idéale aux critères et besoins spécifiques de ce projet et de ceux du CTQ. Comme mentionné plus tôt, ils constituent un outil abordable dont l'utilisation et la conservation sont simples. Ils permettent d'obtenir des résultats reproductibles et font partie des modèles les mieux caractérisés permettant la génération de métabolites, ce qui offre une quantité notable de littérature sur laquelle se fier.

Les microsomes ne permettent pas de représenter la situation *in vivo* pour tous les composés, parce qu'ils ne contiennent aucune enzyme de phase II, à l'exception des UGTs. Cela ne constitue cependant pas un problème pour ce projet, puisque les métabolites ciblés par le CTQ, comme il est généralement le cas en toxicologie clinique, sont en très grande majorité des composés créés pendant la phase I du métabolisme, principalement par les CYPs. Les microsomes optimisent les concentrations en CYPs et en UGTs comparativement à d'autres outils comme la fraction S9, parce que ces enzymes ne subissent pas de dilution supplémentaire par le cytosol. Ce modèle permet donc d'atteindre la meilleure efficacité pour produire le type de métabolites qui est le plus communément analysé au laboratoire.

Le protocole pour réaliser des études de métabolisme *in vitro* avec des microsomes de foie humain est simple. Il implique d'incuber à 37 °C les microsomes avec la substance à tester et un système régénérateur de NADPH dans un tampon phosphate, afin de recréer des conditions biologiques proches de celles d'une cellule, notamment en termes de pH et de température. Le système régénérateur de NADPH est habituellement composé de NADP⁺ (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), de G6P (glucose-6-phosphate), de G6PDH (glucose-6-phosphate déshydrogénase) et de MgCl₂. Ce système a pour but de permettre un apport prolongé en NADPH, un cofacteur important pour permettre l'activité des CYPs. Il est aussi possible d'ajouter un cofacteur permettant aux UGTs de fonctionner, mais dans ce projet, il n'a pas été inclus. La complexité ajoutée et la baisse de sensibilité analytique instrumentale causées par l'ajout d'un groupement glucuronide à une molécule motivent plusieurs laboratoires, dont le CTQ, à intégrer des étapes de déconjugaison enzymatique à leurs protocoles pour retirer ces glucuronides. Le projet visait spécifiquement les métabolites de phase I, l'ajout d'un cofacteur permettant la glucuronidation et d'une étape de déconjugaison avant l'analyse aurait complexifié inutilement le protocole. Enfin, après l'incubation, la réaction enzymatique est arrêtée, ce qui peut être effectué avec un solvant comme de l'acétonitrile.

Comme mentionné précédemment, l'utilisation d'un *pool* de plusieurs donneurs comme source de microsomes est fortement avantageuse. Cela permet de réduire l'impact de la variabilité interindividuelle et d'obtenir des résultats plus homogènes et représentatifs. Étant donné que les métabolites sont formés préférentiellement par certaines enzymes du CYP450, il est important de noter que les résultats des expériences *in vitro* peuvent varier selon la source de microsomes utilisée, puisque le contenu enzymatique présente généralement des différences d'une source à l'autre.

1.2 Outils analytiques utilisés

1.2.1 Principes de la chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie liquide à haute performance (ou HPLC, pour *high performance liquid chromatography*) est une technique de chimie analytique largement utilisée, ayant pour but de séparer les composés présents dans une solution. Le principe de cette méthode repose sur l'acheminement sous pression d'un échantillon liquide par une phase mobile à travers une colonne remplie d'une phase stationnaire. La séparation des différents analytes présents dans l'échantillon repose sur leur affinité par rapport aux phases mobile et stationnaire. Plus l'affinité entre un composé et la phase stationnaire est élevée par rapport à son affinité avec la phase mobile, plus il restera pour une longue durée dans la colonne parce qu'il sera retenu par la phase stationnaire présente dans celle-ci. Le temps qu'un composé met à arriver au détecteur après son passage dans la colonne est appelé temps de rétention (t_R). La détection d'un composé générera un signal sous forme de pic qui pourra être observé sur un chromatogramme, qui est l'enregistrement des signaux en fonction du temps lors d'une séparation chromatographique. (21)

La chromatographie liquide en phase inverse est la plus utilisée. Elle est définie par une phase mobile polaire et une phase stationnaire non polaire, ce qui fait en sorte que les composés polaires auront normalement des temps de rétention plus courts. La chromatographie liquide en phase dite normale fonctionne de façon opposée. L'élution de la phase mobile peut se produire en mode gradient ou isocratique. Le mode isocratique désigne un mode où la composition de la phase mobile ne subira aucune modification sur une certaine période de temps, qu'elle soit composée à 100 % d'une solution A ou de certaines proportions de solutions A et B. Le mode gradient, quant à lui, désigne un mode où se produira une variation de la composition de la phase mobile au cours de l'analyse, ce qui se traduira par une modification des proportions des solutions A et B. Dans le cas d'une méthode inverse, la proportion de phase mobile non polaire augmentera souvent au cours de la chromatographie, dans le but de faciliter la sortie des composés hydrophobes. (21)

La chromatographie liquide à ultra haute performance (UPLC), utilisée au cours de ce projet, est simplement une version plus performante de la HPLC. Une différence majeure entre ces deux techniques est le diamètre des particules dans la colonne, qui se situe entre 3 et 5 μm pour la HPLC et qui est inférieur ou égal à 2 μm pour la UPLC. Les particules de taille inférieure augmentent la surface de contact entre les analytes et la phase stationnaire et permettent également d'utiliser une pression d'élution de la phase mobile plus élevée, deux facteurs qui contribuent à une séparation chromatographique plus efficace. (22)

En général, une bonne séparation chromatographique des composés est considérée comme une priorité lors du développement d'une méthode analytique, pour plusieurs raisons. Elle permet tout d'abord d'éviter le chevauchement des pics, qui peut fausser la quantification des composés, et implique souvent des pics plus étroits qui auront un ratio de signal sur bruit plus élevé, ce qui facilite leur détection. Une meilleure séparation des pics permet également de mieux les discriminer, et par conséquent de les identifier avec une plus grande fiabilité.

L'efficacité de la séparation entre deux pics chromatographiques peut être mesurée grâce à la résolution. Cette dernière peut être calculée comme suit :

Équation 1.1 Calcul de la résolution entre deux pics chromatographiques (23)

$$R = 1,18 \times \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0,5h1} + W_{0,5h2}} \right)$$

$$\text{Où } \begin{cases} R = \text{Résolution} \\ t_{R1}, t_{R2} = \text{Temps de rétention de chaque pic } (t_{R1} < t_{R2}) \text{ (s)} \\ W_{0,5h1}, W_{0,5h2} = \text{Largeur du pic à mi-hauteur (s)} \end{cases}$$

Il est également commun de déterminer la résolution entre deux composés à l'aide de calculs utilisant la largeur du pic à la base de ce dernier. Cependant, ce calcul adapté pour utiliser la largeur du pic à sa mi-hauteur a l'avantage de contrer l'effet de l'étalement possible de la base du pic, un phénomène communément appelé *tailing*, qui peut amener une surestimation de la largeur d'un pic. L'utilisation de la formule adaptée présentée ci-dessus contribue donc à obtenir des valeurs de résolution plus fiables et constantes. Une valeur de résolution indiquant une séparation considérée comme idéale entre deux pics est généralement égale ou supérieure à 1,5. (23) L'équation 1.1 a été utilisée pour la section du projet consacrée à l'adaptation de la méthode chromatographique de dépistage de drogues et médicaments

couramment utilisée au laboratoire. Elle a permis de mesurer l'impact de chacune des nouvelles méthodes testées sur la résolution entre certains composés sélectionnés.

1.2.2 Spectrométrie de masse avec analyseur quadripôle/temps de vol (QToF)

Un système HPLC peut être couplé avec un spectromètre de masse. La spectrométrie de masse repose sur l'ionisation des molécules pour permettre dans un second temps leur identification grâce à leur ratio masse/charge (m/z). Elle peut avoir plusieurs utilisations, comme l'identification de composés de masses et de polarité variables, leur quantification, ou encore l'analyse structurale de ces derniers. Elle est utilisée dans de nombreux domaines comme la chimie, la biologie, la médecine, la pharmacologie et l'industrie alimentaire, pour n'en nommer que quelques uns. Un spectromètre de masse est normalement constitué de trois parties : une source d'ionisation, un analyseur et un détecteur. (24,25)

L'ionisation des molécules faisant leur entrée dans le spectromètre de masse est une étape cruciale pour permettre leur détection subséquente sous forme de ratio m/z . Une source d'ionisation peut être utilisée soit en mode positif pour étudier les ions positifs, soit en mode négatif pour étudier les ions négatifs. Plusieurs types de sources existent et peuvent être choisies en fonction des résultats recherchés et du type de molécules analysées. Un mode d'ionisation communément utilisé pour l'analyse des médicaments et drogues et qui a été utilisé pour ce projet fonctionne par nébulisation électrostatique (ESI, pour *Electrospray Ionization*), dont le processus suit plusieurs étapes. L'échantillon liquide provenant du HPLC est introduit dans la source à travers un capillaire ayant une tension appliquée se situant habituellement entre 2 et 4 kV. Cette différence de potentiel permet la formation de fines gouttelettes chargées, qui sont propulsées vers l'analyseur. Durant leur trajet à pression atmosphérique vers l'analyseur, le solvant contenu dans les gouttelettes est évaporé, un phénomène pouvant être accéléré par un flux de gaz comme du N_2 . L'évaporation du solvant crée une augmentation de la densité de charge et les forces coulombiennes provoquent finalement la fragmentation successive des gouttelettes jusqu'à l'obtention d'ions gazeux individuels, prêts à être analysés. (26) L'utilisation d'une source ESI en mode positif créera généralement des ions $[M + H]^+$, en raison d'une protonation qui se produit grâce aux acides souvent présents dans la ou les phases mobiles. La masse d'un analyte qui sera ultimement observée correspondra donc à la masse de la molécule de base, additionnée à celle d'un atome d'hydrogène, le tout divisé par le nombre de charges positives de la molécule. (25) Le terme $[M + H]^+$ sera fréquemment utilisé dans ce mémoire, en omettant par soucis de simplicité la mention du concept de division par le nombre de charge, qui est dans la majorité des cas de 1.

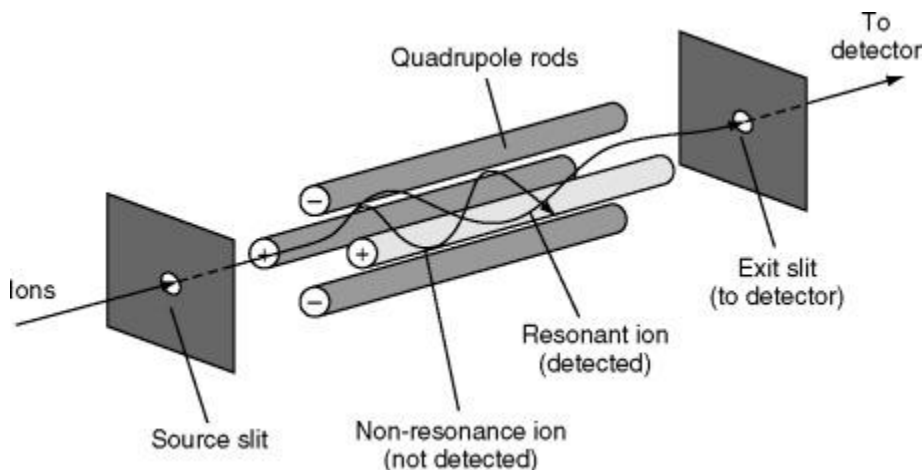
L'analyseur a pour fonction de séparer les différents analytes selon leur $[M + H]^+$ respectif. Des analyseurs peuvent être combinés pour réaliser une spectrométrie de masse dite en tandem (MS/MS). Les composés seront tout d'abord séparés, puis subiront une fragmentation dans une cellule de collision, et les fragments créés pourront à leur tour être triés par un second analyseur, puis acheminés au détecteur. (27) La fragmentation des molécules permet d'obtenir des informations supplémentaires sur leur structure et d'augmenter la confiance en leur identification. Un type d'analyseur couramment utilisé dans de nombreux domaines est le triple quadripôle (QQQ). Il est actuellement utilisé pour le dépistage de drogues, de médicaments et de certains métabolites au laboratoire. Ce projet fera l'essai d'un autre type d'analyseur, utilisant en tandem un quadripôle et un analyseur à temps de vol (QToF). Ces deux types d'analyseurs seront décrits de façon plus complète sous peu.

Les ions ayant traversé l'analyseur arriveront finalement au détecteur, qui est combiné à un système de traitement des données. Le détecteur aura pour fonction de convertir les ions en un signal électronique proportionnel à leur abondance et d'amplifier ce dernier pour qu'il puisse être traité informatiquement. (25) Il est cependant important de noter que tous les composés ne créeront pas un signal d'intensité égale lors de la détection d'un nombre égal d'ions. Le ratio du signal entre deux composés à concentration égale est nommé facteur de réponse relative (RRF, *pour relative response factor*). (28)

Comme mentionné plus tôt, l'analyseur triple quadripolaire est un type d'analyseur couramment utilisé et ce, dans plusieurs domaines. La méthode de dépistage des drogues, médicaments et métabolites actuellement utilisée au CTQ utilise un triple quadripôle. Un quadripôle est constitué de quatre tiges métalliques parallèles placées symétriquement autour d'un axe et dotées d'un potentiel électrique. Ces électrodes sont regroupées en deux paires opposées, où l'une est portée à un potentiel positif et l'autre à un potentiel négatif. La polarité des électrodes est alternée de façon constante, créant un champ électrique oscillant qui influencera la trajectoire des ions. Sous l'effet de ce champ, ces derniers suivent une trajectoire décrite comme sinusoïdale. Selon leur rapport m/z et la fréquence du champ appliqué, certains ions conserveront une trajectoire stable et pourront traverser le quadripôle jusqu'au détecteur, tandis que les autres seront progressivement déviés et éliminés. Un analyseur triple quadripolaire (QQQ) contient en réalité uniquement deux quadripôles servant d'analyseur de m/z , celui du centre servant plutôt de cellule de collision (Q2). Cette cellule est utilisée pour fragmenter, à l'aide d'un gaz inerte comme l'azote, les ions n'ayant pas été déviés du premier quadripôle (Q1), permettant ainsi une meilleure identification et caractérisation des composés analysés. Une énergie de collision peut être choisie pour

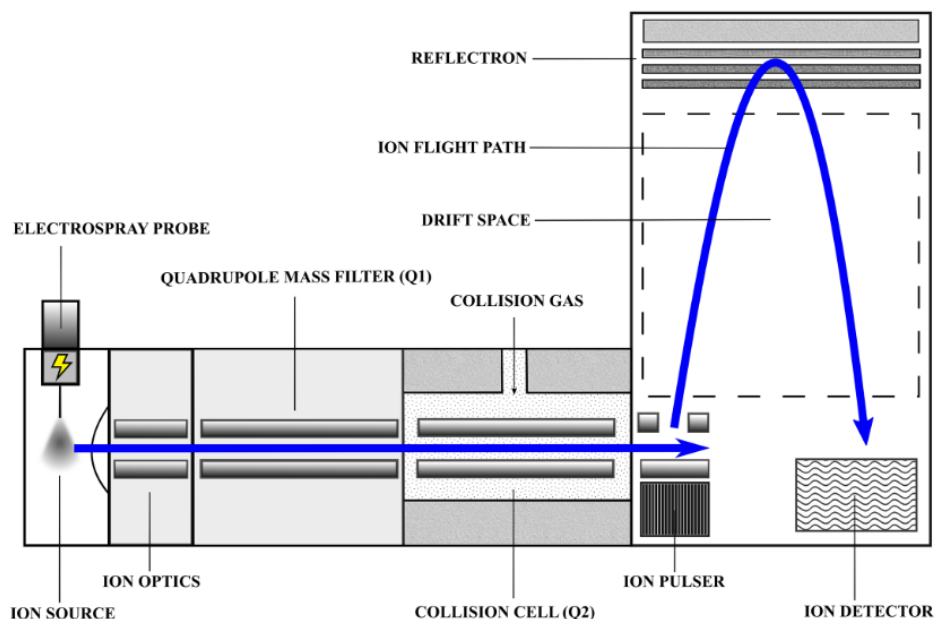
privilégier la formation de fragments précis, et une sélection de m/z peut également être effectuée avec le dernier quadripôle (Q3), permettant de ne laisser passer que les molécules mères ainsi que des fragments choisis pour ces molécules au détecteur. (26)

Figure 1.2 Schéma d'un quadripôle (29)



L'analyseur utilisé au cours de ce projet, communément appelé QToF, combine un quadripôle et un analyseur à temps de vol. Cette technologie ressemble grandement au triple quadripôle, à l'exception du dernier quadripôle qui est remplacé par un analyseur à temps de vol. Dans ce système, le premier quadripôle joue toujours un rôle de filtre, sélectionnant uniquement les ions correspondant à un $[M + H]^+$ spécifique ou appartenant à une plage définie de valeurs $[M + H]^+$. Ces ions passent ensuite dans une cellule de collision, qui permet la fragmentation de ces derniers grâce à un gaz inerte. Après leur sortie de la cellule de collision, les ions sont dirigés vers l'analyseur à temps de vol. Le fonctionnement de cet analyseur est relativement simple. Dès leur entrée à l'intérieur de celui-ci, les ions arrivent au pulseur d'ions. Une pulsation haute tension est alors appliquée, ce qui provoque une accélération des ions vers le tube de vol (*drift space*). À ce stade, tous les ions possèdent une énergie cinétique identique. Une fois dans le tube de vol, aucun champ électrique n'est présent, et leur vitesse de déplacement ne dépend plus que de leur masse : les ions plus légers se déplacent plus rapidement que les ions plus lourds vers le détecteur, permettant ainsi leur séparation en fonction du temps de vol. Les systèmes ToF plus modernes utilisent un réflectron qui corrige la dispersion d'énergie cinétique et spatiale des ions de même m/z , assurant leur arrivée simultanée au détecteur. L'allongement de la trajectoire de vol engendrée par le réflectron améliore par le fait même la résolution massique, qui sera expliquée sous peu. (30)

Figure 1.3 Schéma d'un analyseur quadripôle/temps de vol (30)



Les analyseurs de masse peuvent permettre d'atteindre différents niveaux de résolution de masse. La résolution d'un spectromètre de masse est déterminée par son habileté à distinguer deux pics de m/z rapprochés dans un spectre de masse (31). Le triple quadripôle est considéré comme un analyseur de basse résolution et permet de déterminer la masse nominale d'un composé, donc la somme des masses nominales de chaque atome le constituant. La masse nominale d'un atome correspond à la masse entière de son isotope stable le plus abondant, soit la somme des protons et neutrons le composant. La masse nominale est théoriquement un nombre entier, mais le triple quadripôle fournit généralement une précision d'une décimale sur celle-ci, en raison de la manière dont le signal est traité. Le QToF est pour sa part un analyseur de masse de haute résolution. Il permet de déterminer la masse exacte d'un composé, qui est calculée en additionnant les masses monoisotopiques de chaque atome formant la molécule. La masse monoisotopique d'un atome est la masse exacte de son isotope stable le plus abondant. Le QToF fournit généralement une précision de masse de quatre à cinq décimales. Cette précision permet de distinguer des molécules ayant de minimes différences de masse et d'identifier précisément un composé en comparant sa masse exacte à la valeur théorique connue. (32)

L'analyse des composés en spectrométrie de masse peut se faire selon deux approches générales, en dépistage ciblé ou non ciblé. L'analyse ciblée permet de détecter spécifiquement des analytes d'intérêt dans un échantillon. Pour identifier un composé, cette méthode nécessite des valeurs de référence qui sont déterminées expérimentalement à l'intérieur à l'aide d'un étalon. Ces valeurs incluent généralement

le ratio m/z à un temps de rétention précis selon la méthode analytique employée, mais également des fragments caractéristiques du composé analysé. (33) Le spectromètre de masse à triple quadripôle est particulièrement bien adapté pour les analyses ciblées. Grâce à son mode d'acquisition des données MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), il permet de sélectionner pour chacun des analytes d'intérêt un ion parent dans le premier quadripôle, de sélectionner l'énergie de fragmentation nécessaire pour optimiser la formation d'un fragment précis et de suivre ce dernier dans le troisième quadripôle. Cette approche permet d'atteindre une sensibilité et une sélectivité accrues. (26) L'analyse ciblée réalisée avec un triple quadripôle représente un outil fiable et reproductible pour l'identification et la quantification des analytes puisqu'elle permet une optimisation de la méthode basée sur des composés précis et l'usage de courbes de calibration rigoureusement établies. Les données résultant de ce type d'analyse sont généralement simples à traiter. Elle est cependant limitée aux composés dont les valeurs de référence sont connues et elle rend donc quasi impossible l'identification d'une substance pour laquelle aucun étalon analytique n'est disponible ou dont la présence dans l'échantillon n'a pas été anticipée.

L'analyse non ciblée en spectrométrie de masse est une technique exploratoire qui, grâce à un mode d'acquisition en balayage, permet optimalement de détecter tous les composés présents dans un échantillon, sans nécessiter une connaissance préalable de ces derniers. Le spectromètre de masse à temps de vol couplé à un quadripôle (QToF) est communément utilisé pour ce type d'analyse. (30) En effet, grâce à sa haute résolution, il permet d'obtenir des masses exactes qui rendent possible l'association d'un signal spectral à un composé. Cette précision de masse permet soit de retrouver directement un composé via des bases de données, soit de remonter à sa formule brute et à sa structure moléculaire, ce qui est impossible avec les masses nominales générées par un triple quadripôle. (34)

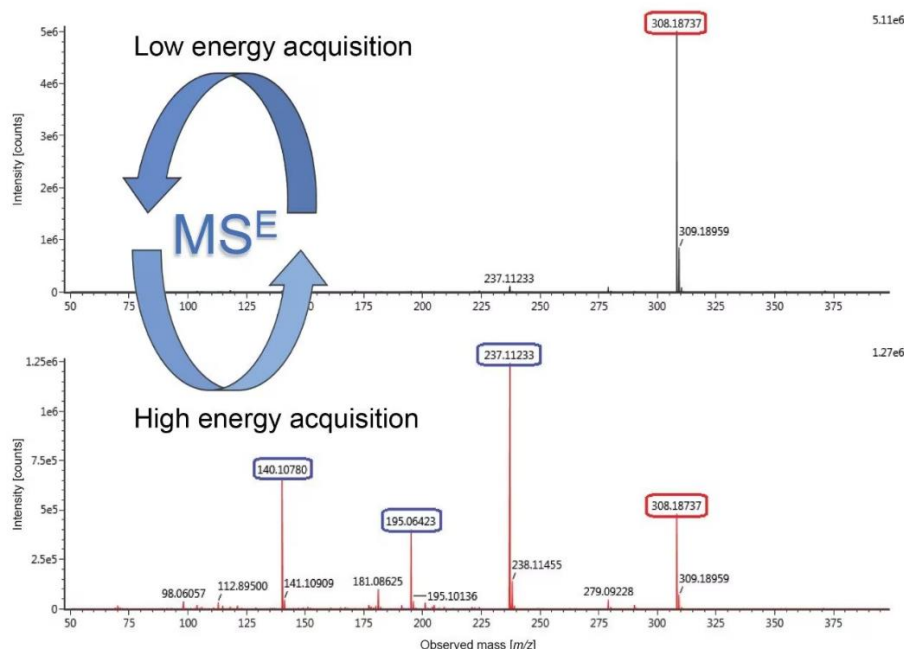
Le dépistage non ciblé à haute résolution permet principalement de réaliser des analyses qualitatives en déterminant la présence ou l'absence d'un composé, ainsi que des analyses semi-quantitatives. Le fait qu'il analyse le contenu entier d'un échantillon au lieu de se concentrer sur quelques composés précis lui amène une moins grande sensibilité et sélectivité, comparativement à une analyse ciblée. De plus, une courbe d'étalonnage est nécessaire pour procéder à une quantification fiable, ce qui n'est pas inclus en analyse non ciblée, en plus d'être impossible à réaliser en l'absence d'un étalon analytique. L'analyse semi-quantitative constitue donc une alternative pour estimer la concentration approximative ou relative d'un composé. Elle est utilisée pour estimer l'abondance relative d'un analyte et se fait en comparant l'intensité du signal de celui-ci avec son intensité dans un autre échantillon ou avec une valeur de référence. Elle

donne une idée approximative des variations de concentration entre des échantillons et non une mesure exacte et elle est surtout utilisée pour repérer des tendances dans une expérience. (35)

L'acquisition des données en analyse non ciblée peut se faire selon deux modes, DDA (*data-dependant acquisition*) et DIA (*data-independant acquisition*). En DDA, seuls les ions les plus abondants subiront une fragmentation, ce qui optimisera la qualité des spectres MS et engendrera des données moins chargées, facilitant l'analyse et le traitement de ces dernières. En mode DIA, tous les ions passant par le quadripôle, généralement inclus dans une gamme de $[M + H]^+$ choisie par l'utilisateur, subiront une fragmentation dans la cellule de collision. Ce mode permet d'obtenir une meilleure couverture du contenu de l'échantillon ainsi qu'une meilleure reproductibilité entre les analyses. Contrairement au DDA, le DIA assure l'analyse et la fragmentation de tous les composés indépendamment de leur intensité, évitant ainsi une perte d'informations due à une sélection trop restreinte. Ce mode implique cependant une quantité très élevée de données recueillies par l'instrument, ce qui représente un défi pour l'analyse de celles-ci. Il est tout de même privilégié pour les études exploratoires, car il permet d'assurer une meilleure détection des analytes inconnus en limitant les biais de sélection occasionnés par le mode DDA. (30)

Le mode MS^E est un mode DIA qui a été adopté pour ce projet. Son fonctionnement repose sur une alternance entre deux fonctions d'acquisition : une avec une énergie de collision faible ou nulle permettant de récolter des informations sur les ions précurseurs intacts, et une autre avec une rampe d'énergie de collision croissante plus élevée favorisant la fragmentation de ces ions précurseurs. L'appareil effectue des scans d'une durée définie en alternance pour chacune des deux fonctions et les enregistre dans deux fichiers distincts, facilitant ainsi la différenciation des pics représentant des fragments et ceux correspondant aux molécules intactes, un avantage important en analyse non ciblée. Il est toutefois important de noter que puisqu'il n'y a aucune sélection d'ions précurseurs pour la fragmentation, les spectres acquis à haute énergie peuvent contenir des fragments issus de plusieurs précurseurs simultanément. Une étape de déconvolution chromatographique est donc essentielle pour associer correctement chaque fragment à son ion parent, ce qui est généralement effectué par des algorithmes intégrés dans des logiciels spécialisés. (36)

Figure 1.4 Représentation schématique du mode MS^E. L'ion précurseur est identifié en rouge et ses fragments sont indiqués en bleu. (36)



Dans le cadre de ce projet, l'analyse non ciblée et les données à haute résolution qui en découlent constituent des outils indispensables. Comme mentionné plus tôt, l'analyse non ciblée permet la détection de composés inconnus ou inattendus, sans avoir à se limiter à une liste prédéfinie de molécules. Il s'agit d'une technique qui se veut génératrice d'hypothèses et orientée sur la découverte de composés. Elle est donc idéale pour des expériences de métabolisme *in vitro* visant à identifier les métabolites de nouvelles substances psychoactives. Elle permet de les détecter, même en n'ayant aucune connaissance préalable sur leur nature. L'exactitude de masse liée à la haute résolution du QToF permet de procéder à une identification putative de ces métabolites, sans avoir besoin de leurs étalons, ce qui constitue un avantage majeur puisqu'ils sont la majorité du temps difficile d'accès ou inexistant. Ce projet ne visant pas à obtenir de quantification précise des métabolites créés, les limites du QToF à ce sujet ne constituent donc pas un obstacle.

Il est important de noter que l'identification d'un composé dans un échantillon ne peut être officiellement confirmée qu'à l'aide d'un étalon. L'analyse non ciblée permet cependant d'orienter les recherches et de poser des hypothèses quant à la présence d'un composé avec un certain niveau de confiance, tout dépendant des informations disponibles. Ce type d'analyse génère une grande quantité de données relativement complexes qui entraîne des défis au niveau du traitement et de l'interprétation de ces

dernières. Le processus pour traiter ces données et établir un niveau de confiance en l'identification d'une substance sera décrit dans la prochaine section.

1.3 Analyse des données de masse à haute résolution

Comme il a été mentionné précédemment, l'analyse non ciblée génère une quantité très importante de données, dont l'échelle varie en fonction de nombreux facteurs, mais qui peut facilement atteindre plusieurs millions de points de données brutes par échantillon (37). L'interprétation de ces données peut donc représenter un défi de très grande taille.

L'idée que ce type d'analyse détecte pratiquement l'ensemble du contenu d'un échantillon pourrait laisser imaginer que les résultats se présentent sous la forme d'une liste claire et complète de composés identifiés. Or, la réalité est tout autre : les données obtenues sont brutes et non annotées (non assignées à des informations structurales ou à des molécules précises), elles sont retrouvées directement sous forme de masses exactes à différents temps de rétention. La difficulté réside dans le fait qu'une masse dite exacte peut être reliée à un nombre très important de composés distincts, parfois d'un ordre de plusieurs milliers de molécules. Il est également important de considérer que l'instrument analytique apportera nécessairement une incertitude de mesure sur ces masses, même avec une calibration adéquate selon les standards établis. Cette incertitude de masse contribue de façon notable à l'augmentation du nombre de composés possibles pour chaque ion détecté. L'identification de composés précis dans un échantillon devient donc une tâche complexe qui nécessite une investigation approfondie. (34)

La complexité et le volume des données générées par l'analyse non ciblée font en sorte qu'elles sont pratiquement impossibles à investiguer de façon manuelle. Des pipelines informatiques sont nécessaires pour extraire l'information pertinente des données brutes et les convertir en un format qui facilite leur interprétation. (38)

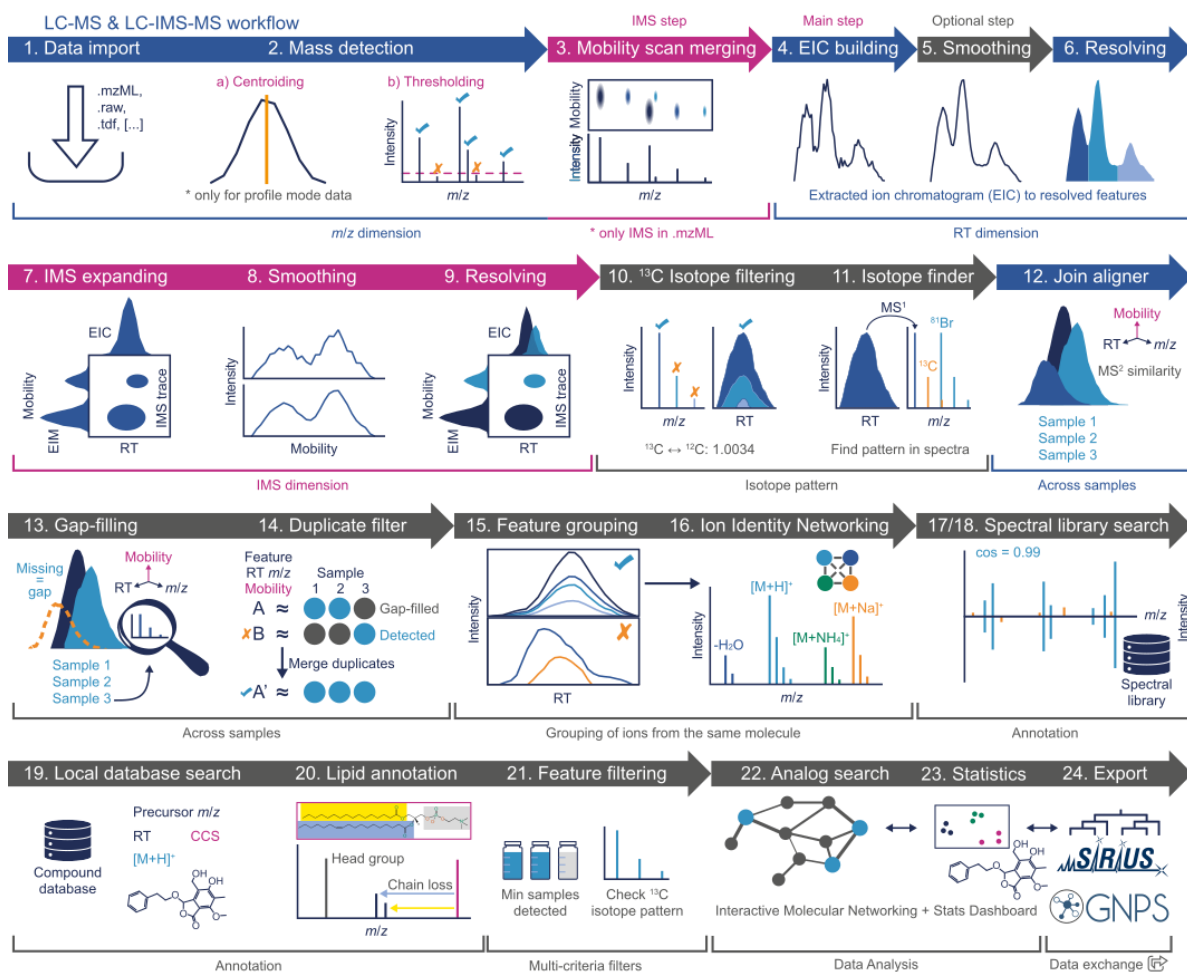
Le processus de traitement des données non ciblées peut être divisé en deux grandes parties : la génération d'une liste de *features* et l'investigation de ces *features*. Un *feature* fait référence à un ensemble de signaux corrélés dans un spectre de masse et est associé à un ion distinct qui a été détecté par l'instrument analytique. Un *feature* est caractérisé par un ratio m/z et une intensité. Lorsque la spectrométrie de masse est couplée à une chromatographie liquide, comme il est le cas dans ce projet, il sera également représenté par le temps de rétention du pic chromatographique associé. (38) Le terme

feature ne semble pas avoir pas d'équivalent français correspondant précisément à la définition établie, il sera donc utilisé tel quel dans ce mémoire.

Le processus de génération de *features* est réalisé à l'aide de logiciels spécialisés. Ces derniers incluent, entre autres, MZmine, MS-DIAL et XCMS. La plupart de ces logiciels permettent d'automatiser le procédé pour faciliter son application sur le long terme. Des flux de travail (*workflows*) distincts sont généralement requis selon l'instrument analytique et la méthode d'acquisition employés. (38)

La figure 1.5 présente le flux de travail général proposé par le logiciel MZmine pour le traitement des données découlant de l'analyse non ciblée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). Ce dernier permet également de traiter les données LC-MS/MS, ce qui n'est pas mentionné explicitement dans le schéma.

Figure 1.5 Représentation schématique du flux de travail proposé par MZmine pour la génération d'une liste de *features* à partir de données brutes obtenues par analyse LC-MS et LC-MS/MS. (38)



Le processus proposé par le logiciel MZmine pour le traitement des données LC-MS ou LC-MS/MS en mode non ciblé contient de nombreuses étapes. Réaliser l'entièreté de celles-ci n'est pas obligatoire pour obtenir une liste de *features* exploitable. Les flèches bleues indiquent les étapes clés du processus, indispensables à la création des *features* à partir de données brutes provenant d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Les flèches roses contiennent des étapes additionnelles spécifiques à l'analyse par LC-IMS-MS (LC-MS couplé à une spectrométrie de mobilité ionique), qui ne concernent donc pas ce projet. Les flèches grises désignent des fonctions facultatives qui peuvent être utilisées au besoin, pour affiner davantage la liste de *features* ou tenter d'annoter ces derniers. La majorité des étapes sont constituées de plusieurs paramètres dont les valeurs peuvent être ajustées selon le type d'échantillon analysé et la nature des données attendues.

La procédure permettant d'obtenir une liste de *features* à partir de données brutes peut s'avérer relativement complexe, comme l'illustre ce schéma. Le flux de travail proposé par MZmine est cependant un bon exemple de processus à la fois complet et personnalisable, qui permet à l'aide d'étapes optionnelles et de paramètres ajustables de traiter de façon juste et précise les données et de s'adapter aux besoins de l'expérience. Par souci de concision, seules les étapes principales du schéma, qui sont illustrées en bleu, seront brièvement décrites.

Bien que les logiciels de traitement comme MZmine, XCMS ou MS-DIAL diffèrent par leurs interfaces et algorithmes, les étapes générales qui mènent à la génération de *features* sont globalement similaires d'un outil à l'autre. Le traitement des données brutes nécessite tout d'abord leur importation dans un format accepté par le logiciel utilisé (Étape 1 figure 1.5). Ce dernier procède ensuite à une détection des masses exactes et crée une « liste de masses » contenant les m/z détectés et leur intensité respective. Un seuil d'intensité peut être défini pour exclure les signaux de faible intensité du reste du traitement (Étape 2 figure 1.5). (38)

À partir de chacune des masses détectées, le logiciel produira un EIC (*Extracted Ion Chromatogram*), qui affiche l'intensité du signal d'un ion précis en fonction du temps de rétention sur un nombre minimal de scans consécutifs. Les EICs correspondant aux exigences définies par l'utilisateur (ex. nombre minimal de scans consécutifs et intensité minimale) sont stockés dans une liste de *features* préliminaire par échantillon (Étape 4 figure 1.5). (38)

Les EICs stockés dans cette liste de *features* peuvent contenir plusieurs pics qui co-éluent partiellement. Un processus de déconvolution chromatographique est donc effectué par le logiciel, dans le but de séparer ces pics en *features* individuels (Étape 6 figure 1.5). (38)

Finalement, pour les expériences visant à comparer le contenu de plusieurs échantillons, il est possible de réaliser un alignement des *features* correspondants, pour créer une seule liste de *features* regroupant les signaux détectés à travers l'ensemble des échantillons. Il est normal d'observer une légère variation de m/z ou de temps de rétention pour un même composé entre différents échantillons d'une même expérience. Un logiciel comme MZmine a une fonction qui permet, grâce à un score d'alignement basé sur des standards déterminés par l'utilisateur, de regrouper les composés associés malgré ces fluctuations (Étape 12 figure 1.5). (38)

Le but principal du processus informatique qui a été décrit est de transformer les données brutes LC-HRMS hautement complexes en une liste de *features* qui peut être annotée ou exportée pour une analyse ultérieure. Il est particulièrement important d'optimiser ce flux de traitement et de procéder à un tri des données pour bien détecter les composés pertinents tout en supprimant un maximum de bruit de fond et de *features* qui n'auront vraisemblablement pas de pertinence à l'expérience en déroulement, puisque la tentative d'identification des *features* conservés peut d'avérer particulièrement longue et complexe.

Comme il a été mentionné plus tôt, une masse exacte à elle seule ne constitue généralement pas une donnée suffisante pour tenter d'identifier une substance. Il est généralement nécessaire de combiner cette information avec des données complémentaires, telles qu'un ratio isotopique, qui fournit une indication sur la formule chimique, ou un spectre de fragmentation, qui renseigne sur la structure moléculaire. Ces éléments permettent d'améliorer la fiabilité de l'identification. (34)

Une méthode communément employée pour tenter d'identifier un *feature* est de comparer ses caractéristiques expérimentalement obtenues avec des valeurs contenues dans des bases de données accessibles gratuitement, telles que ChemSpider, Human Metabolome DataBase (HMDB), METLIN, MassBank et HighResNPS. Plusieurs bases de données comme celles mentionnées sont alimentées constamment et contiennent une très grande quantité d'informations. Malgré tout, elles demeurent inévitablement incomplètes, surtout lorsqu'il est question de nouveaux composés. (34)

Plusieurs outils informatiques ont été créés au cours des dernières années et sont continuellement en développement, dans le but de faciliter l'annotation et l'identification des *features*. Ces logiciels ont l'avantage de combiner la recherche dans des bases de données avec des algorithmes d'analyses plus avancés, ce qui offre une complémentarité très utile face aux bases de données incomplètes.

Le logiciel MZmine, décrit précédemment, propose plusieurs fonctions permettant d'annoter des *features*. En pratique, il est surtout utilisé pour les étapes de prétraitement, comme la création, le tri et l'alignement des *features*. Ainsi, bien que certaines options d'annotation soient disponibles, les données sont souvent exportées vers des logiciels plus spécialisés dans l'identification des composés, tels que SIRIUS, qui est mentionné en exemple dans la figure 1.5.

Sirius est un logiciel contenant une panoplie d'outils qui aident à identifier des molécules à partir de données de spectrométrie de masse. Il analyse les caractéristiques des signaux obtenus, telles que les masses exactes, les ratios isotopiques et les spectres de fragmentation (MS/MS), pour proposer des informations comme la formule chimique, la structure possible ou encore la catégorie à laquelle le composé appartient. Pour y parvenir, il utilise des bases de données de structures connues, mais également des méthodes informatiques plus avancées comme des modèles statistiques et des algorithmes d'apprentissage automatique. La majorité des résultats fournis par SIRIUS sont accompagnés d'un score de confiance, qui permet de savoir à quel point la proposition est jugée fiable par le logiciel. (39) L'utilisation d'un tel logiciel est souvent nécessaire lorsque l'analyse d'une grande quantité de *features* est désirée, mais ce type d'outil requiert généralement l'acquisition d'une licence, ce qui peut représenter une barrière pour certaines études.

Lorsqu'un *feature* en particulier suscite l'intérêt, il est possible d'exploiter des outils en accès libre pour en extraire certaines informations. Par exemple, ChemCalc permet de générer des formules chimiques candidates à partir d'une masse exacte observée, en proposant des candidats en ordre croissant de taux d'erreur sur cette masse (40). Molgen, quant à lui, propose des structures moléculaires compatibles avec une formule chimique donnée (41). Ces outils produisent toutefois un nombre très élevé de suggestions, souvent peu spécifiques. Pour affiner ces hypothèses, il peut être pertinent de les combiner à des outils plus spécialisés comme CFM-ID, qui utilise les spectres de masse obtenus expérimentalement pour prédire des fragments et tenter une identification structurale (42).

Il est cependant difficile, même en combinant plusieurs outils, d'arriver efficacement à identifier un composé. Cette difficulté est principalement due au fait qu'ils fonctionnent de façon indépendante et que chacun ne prend en considération que certaines des informations obtenues expérimentalement. Les suggestions obtenues sont donc en quantité trop nombreuses et peu sélectives. L'utilisation d'un logiciel comme SIRIUS facilite grandement la tentative d'identification des composés, puisqu'il combine ces outils dans un seul logiciel et prend en considération l'ensemble des données expérimentales pour faire ses suggestions.

Les outils qui ont été mentionnés ne représentent qu'une infime partie des possibilités permettant l'analyse et l'interprétation des données obtenues par l'analyse non ciblée. La description de l'ensemble de ces possibilités dépasserait le cadre et les objectifs de ce mémoire, qui vise avant tout à illustrer quelques principes fondamentaux sans en faire une synthèse exhaustive. L'article « *Developments in high-resolution mass spectrometric analyses of new psychoactive substances* » publié par Klingberg et al. présente une synthèse approfondie des méthodes actuellement disponibles pour l'analyse non ciblée des NSP et est recommandé pour le lecteur intéressé (10).

Malgré l'accès à une panoplie d'outils puissants et de techniques avancées, l'identification des *features* demeure une tâche complexe. Ces outils comportent un risque d'erreur qui est non négligeable, et ont particulièrement du mal à générer des hypothèses pour de nouveaux composés, qui sont totalement absents des bases de données, comme il est le cas pour de nombreuses NSP. Ils demeurent tout de même d'une aide précieuse et permettent d'orienter plus efficacement les démarches exploratoires.

Il a déjà été mentionné que l'identification d'une substance nécessite la comparaison avec un étalon analytique pour atteindre une confiance maximale. En l'absence d'un étalon, ce niveau de confiance varie en fonction des données expérimentales qui sont disponibles sur cette substance. Ce niveau de confiance, n'étant pas quantifiable, peut être considéré comme abstrait et peut être difficile à communiquer de façon concise et précise par les chercheurs. En 2007, le Chemical Analysis Working Group (CAWG) de la Metabolomics Standards Initiative (MSI) a proposé une échelle permettant de standardiser le niveau de confiance associé à l'identification des métabolites (43). Une version plus étendue de cette échelle a depuis été proposée par Schymanski et al., qui semble être à ce jour la référence dominante dans le domaine (44). Cette dernière est présentée au tableau 1.2.

Tableau 1.2 Niveaux de confiance proposés par Schymanski et al. pour l'analyse en spectrométrie de masse à haute résolution (44)

Niveau	Degré de certitude structurelle	Données minimales requises
1	Structure confirmée	MS, MS/MS, TR, étalon analytique
2	Structure probable	MS, MS/MS, Base de données MS/MS MS, MS/MS, données exp.
3	Structure(s) candidate(s)	MS, MS/MS, données exp.
4	Formule moléculaire sans équivoque	MS (incluant ratio isotopique)
5	Masse exacte d'intérêt	MS

Selon cette échelle, un niveau de confiance de 1 représente le niveau le plus élevé. Il implique un cas où la structure proposée a été confirmée à l'aide d'un étalon et où une correspondance de masse exacte, de ratio isotopique, de temps de rétention et de fragmentation est observée. Le niveau 1 permet généralement de confirmer une identification dans le domaine de la chimie analytique. Le niveau 2 de cette échelle indique une condition où aucune comparaison avec un étalon n'a été effectuée, mais que les informations disponibles permettent de proposer une structure unique très plausible. Ces informations incluent une masse exacte et un ratio isotopique qui concordent avec la structure proposée, un temps de rétention plausible pour le type de molécule suggéré, ainsi qu'un spectre MS/MS concordant avec la structure, qui inclut des fragments qui lui sont caractéristiques. Les données expérimentales doivent être compatibles avec ce qui est retrouvé dans la littérature ou les bases de données ou encore à ce qui peut être généré par des outils informatiques comme ceux qui ont été décrits plus tôt. (44)

Le niveau 3 de l'échelle présentée représente une zone plus grise. Il est utilisé pour parler d'une situation où les informations disponibles sont suffisantes pour proposer plusieurs structures ou une classe de composés, mais pas assez précises pour suggérer une structure unique. Les informations requises pour ce niveau de confiance sont très semblables à celles du niveau 2. Elles incluent une masse exacte, un ratio isotopique, un temps de rétention et un spectre de fragmentation qui concordent avec les structures

plausibles. La différence principale entre les niveaux 2 et 3 réside dans la précision des données disponibles et leur pouvoir discriminant. (44)

Le niveau 4 de l'échelle de Schymanski et al. indique un cas où une formule moléculaire a pu être établie de façon certaine, mais où les informations disponibles ne sont pas suffisantes pour suggérer des structures possibles. Ce niveau exige la présence d'une masse exacte et d'un ratio isotopique pouvant être assignés clairement à une formule chimique. Finalement, le niveau 5 indique le niveau de certitude le plus bas de cette échelle. Il est utilisé pour parler d'une masse exacte qui a été mesurée dans un échantillon et qui peut représenter un intérêt pour l'étude. Aucune information permettant de proposer une formule moléculaire ou une structure n'est disponible dans ce cas. Le niveau 5 ne devrait s'appliquer qu'à quelques masses présentant un intérêt particulier, comme celles incluses dans une liste de *features*, puisqu'il serait contreproductif d'étiqueter toutes les masses d'un échantillon comme étant de niveau 5. Il est généralement recommandé d'utiliser un blanc analytique pour s'assurer que cette masse ne provient pas de la solution de préparation et qu'elle est pertinente pour l'étude. (44)

Cette échelle couvre bien l'ensemble des possibilités rencontrées lors du traitement des données non ciblées et permet en conséquence la communication d'un degré de confiance pour l'identification d'un composé, quelles que soient les informations qui sont disponibles à son sujet.

CHAPITRE 2

MÉTHODOLOGIE

2.1 Protocole de génération de métabolites à l'aide de microsomes de foie humain

Ce protocole de génération de métabolites a été grandement inspiré par l'article de Knights et al. (45)

Pour cette partie du projet, deux substances mères ont été choisies comme modèles pour tester le protocole de génération de métabolites, soit le midazolam et le fentanyl. Il s'agit de deux molécules dont le métabolisme est bien connu et documenté dans la littérature, les rendant idéales pour évaluer l'efficacité de la méthode.

Des tests préliminaires, combinés à l'examen de la fiche produit des microsomes achetés, ont révélé que ces derniers ont une concentration assez basse, comparativement à d'autres sources de microsomes, en ce qui a trait à certaines isoenzymes du CYP450 responsables du métabolisme de plusieurs médicaments, comme par exemple l'isoenzyme 2D6, responsable du métabolisme de la venlafaxine. La concentration en isoenzyme 3A4, responsable du métabolisme de près de la moitié des médicaments (16), est quant à elle notable dans ces microsomes. Ce constat a guidé notre sélection, puisque nos deux substances mères, le midazolam et le fentanyl, dépendent principalement de CYP3A4 pour leur métabolisme. Pour chacune des substances mères, une seule expérience a été réalisée.

Le pool de microsomes de foie humain utilisé pour le projet provient de la compagnie Thermo Fisher Scientific. Il contient les microsomes de 50 donneurs différents et a une concentration en protéines de 20 mg/mL. Il a été conservé à -80 °C entre chaque utilisation.

Trois concentrations ont été testées pour chaque substrat (midazolam et fentanyl), soit 1 µg/mL, 10 µg/mL et 30 µg/mL. Pour chacune des trois concentrations, des prélèvements ont été faits à différents moments de l'incubation, sur une période totale de trois heures, afin d'observer la cinétique d'apparition des divers métabolites et déterminer la nature de ceux-ci.

Pour chacun des tubes à incuber, un volume de solution méthanolique du composé à tester concordant avec la concentration finale désirée a été évaporé sous azote. Ensuite, 50 µL d'une solution A (NADP⁺ à 10

mM, G6P à 30 mM et MgCl_2 à 30 mM) et 25 μL d'une solution B (G6P-D à 8 U/mL), ayant toutes les deux pour but la régénération du NADPH, ont été ajoutées. Par la suite, 412 μL de tampon phosphate 0,1 M au pH ajusté à 7,4 ont été ajoutés, puis le mélange a été placé une première fois au bain-marie tempéré à 37 °C pour une durée de 5 minutes. La réaction a ensuite été initiée avec l'ajout de 13 μL de suspension de microsomes à 20 mg/mL et le mélange a été remis au bain-marie à 37 °C.

Chaque tube a subi plusieurs prélèvements de 50 μL à des temps prédéterminés, allant du moment de l'ajout des microsomes (0 min) au temps final choisi (3 h). Un volume de 25 μL d'acétonitrile a été ajouté à chacun des prélèvements afin de mettre fin à la réaction enzymatique. Les tubes ont ensuite été centrifugés durant 5 minutes à 10,000 x g, à 4 °C.

Nous avons préalablement déterminé que notre instrument analytique avait des performances supérieures pour l'évaluation précise du $[\text{M} + \text{H}]^+$ d'un xénobiotique ou de son métabolite lorsque la concentration de celui-ci se situait entre 0,125 ng/mL et 2,5 ng/mL. Afin de limiter l'incertitude instrumentale sur la détermination des $[\text{M} + \text{H}]^+$, nous nous sommes fixé une limite de cet ordre pour la majorité des étapes du projet.

Dans cette partie du projet, le surnageant a été dilué à une concentration théorique de 6,66 ng/mL pour chaque échantillon, assurant ainsi que toutes les concentrations soient uniformisées à la même échelle et dans une plage relativement acceptable pour l'appareil analytique. Cette valeur a été choisie car elle représente la concentration maximale en substrat attendue en l'absence de métabolisme *in vitro* et les échantillons ont donc été dilués pour atteindre cette valeur théorique, en fonction de leur concentration initiale avant l'incubation. Elle a volontairement été préparée à un niveau plus élevé que la limite de 2,5 ng/mL pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il était prévu qu'une certaine conversion du substrat en métabolites allait se produire, et donc que la valeur théorique de 6,66 ng/mL allait nécessairement être inférieure en pratique pour la plupart des échantillons. Ensuite, il était attendu que les métabolites aient une concentration largement inférieure à la concentration de substrat de départ, en plus d'un signal inférieur à celui-ci pour une concentration équivalente (RRF). Cette stratégie allait donc logiquement permettre d'optimiser leur visualisation.

Pour chaque expérience, un contrôle négatif a été réalisé en suivant toutes les étapes du protocole, à l'exception de l'ajout des microsomes. Ce contrôle avait pour but de vérifier l'efficacité du processus et de déterminer quels composés apparaissaient exclusivement grâce au métabolisme *in vitro*.

Un étalon combiné fréquemment utilisé au laboratoire a été utilisé dans ce projet comme contrôle positif. Il s'agit d'un mélange contenant la majorité des drogues, médicaments et métabolites disponibles au laboratoire, qui a été utilisé pour confirmer ou infirmer l'apparition de certains métabolites.

Les signaux des substances mères et de leurs métabolites ont été normalisés à l'aide de standards internes. La cocaïne-D₃ a été utilisée comme référence pour l'expérience avec le midazolam, comme aucun standard se rapprochant davantage de cette molécule n'était disponible au laboratoire. Les résultats ont démontré que la variation du signal au cours de la séquence analytique était suffisamment similaire entre les deux molécules pour que la cocaïne-D₃ puisse être considérée comme une référence fiable dans cette analyse. Pour l'expérience avec le fentanyl, le fentanyl-D₅ a été utilisé comme standard interne.

L'identification manuelle des métabolites ainsi que l'évaluation de leur cinétique a été effectuée à l'aide des logiciels Masslynx et TargetLynx.

2.2 Paramètres instrumentaux

L'analyse des échantillons a été faite par chromatographie liquide à ultra haute performance couplée avec un spectromètre de masse hybride quadripôle/temps de vol (UPLC-QToF-MS).

2.2.1 Chromatographie liquide à ultra haute performance

La séparation des analytes a été réalisée grâce à un système de chromatographie liquide à ultra haute performance (Acquity UPLC) (Waters) muni d'une colonne Acquity UPLC HSS T3 (2,1 mm x 100 mm ; 1,8 µm) (Waters) thermostatée à 45 °C. Un préfiltre a été ajouté à la colonne afin de prolonger sa durée de vie. La température de l'auto-injecteur a été stabilisée à 25 °C et chaque injection a été faite en mode *Full Loop* avec un volume de prélèvement d'échantillon de 10 µL. Les phases mobiles ainsi que le gradient utilisé sont présentés au tableau 2.1. Le débit d'élution était de 0,4 mL/min.

Tableau 2.1 Gradient utilisé pour la chromatographie liquide à ultra haute performance (UPLC)

Temps (min)	% A	% B
0	95	5
0,5	95	5
1	75	25
3	75	25
4	60	40
6	60	40
7	50	50
8	50	50
10	5	95
10,5	5	95
11	95	5

A : Acétate d'ammonium 5 mM et acide acétique 0,1 % (v/v) dans l'eau

B : Acétonitrile : Méthanol (50:50) avec acide acétique 0,1 % (v/v)

2.2.2 Spectrométrie de masse

Le spectromètre de masse utilisé pour l'acquisition des données est le Xevo G2-XS QToF (Waters) avec un mode d'ionisation ESI+. L'azote a été utilisé comme gaz pour le cône, pour la désolvatation et comme gaz de collision.

Les paramètres du QToF utilisés sont présentés au tableau 2.2. Ces paramètres sont pour la plupart ceux qui sont recommandés par Waters pour un débit d'élution de 0,4 mL/min.

Tableau 2.2 Paramètres instrumentaux utilisés pour le spectromètre de masse quadripôle/temps de vol (QToF)

Paramètres de l'instrument	
Voltage au capillaire (kV)	3
Débit du gaz du cône (L/h)	150
Débit du gaz de désolvatation (L/h)	1000
Température de désolvatation (°C)	500
Température de la source (°C)	150
Mode d'acquisition des données	Sensibilité
Mode de traitement des données	Centroïde
Temps d'acquisition (min)	10,25

L'acquisition des données a été réalisée en mode MS^E avec les conditions suivantes :

Fonction 1 : Gamme de masse de 50 à 650 m/z sans application d'énergie de collision.

Fonction 2 : Gamme de masse de 50 à 650 m/z avec une rampe d'énergie de collision de 10 à 40 V.

Le temps de balayage pour chacune des fonctions était de 0,5 s.

2.3 Adaptation de la chromatographie

La méthode chromatographique présentée ci-dessus était déjà employée au CTQ avant le commencement de ce projet. Il s'agit d'une méthode UPLC permettant le dépistage ciblé de plus de 300 drogues et médicaments, qui inclut également quelques métabolites. Elle a été créée pour permettre la détection de composés précis, en grande majorité des drogues et médicaments relativement hydrophobes, et n'est donc pas parfaitement adaptée pour une méthode d'analyse non ciblée qui prioriserait le dépistage de métabolites de drogues, qui sont généralement plus hydrophiles que leur molécule mère. Le projet a donc soulevé l'intérêt de développer une version encore plus polyvalente de cette chromatographie. Cette modification a pour objectif de favoriser une meilleure séparation des composés en général, en priorisant cependant les métabolites plus hydrophiles, pour permettre une meilleure discrimination de ceux-ci au niveau de leurs temps de rétention et donc faciliter leur identification éventuelle à l'aide d'un étalon. Une meilleure séparation permet également de faciliter la déconvolution lorsque deux composés co-éluent et d'attribuer plus aisément une masse ou un fragment à un composé précis, ce qui constitue un avantage majeur dans l'analyse non ciblée de molécules inconnues.

Malgré les avantages anticipés de cette chromatographie adaptée, la méthode chromatographique initiale a été utilisée pour la majorité des parties du projet parce que celles-ci ont été développées à partir de composés connus, qui étaient bien caractérisés avec cette méthode initiale. Elle constituait donc une bonne référence pour l'optimisation des paramètres expérimentaux et pour confirmer la présence d'un grand nombre de molécules puisque leur temps de rétention est connu dans celle-ci. La chromatographie adaptée présente un potentiel futur pertinent pour être utilisée un cadre exploratoire, qui permettrait le dépistage de métabolites inconnus plus hydrophiles, présentant des temps de rétentions plus courts et pour lesquels aucune donnée préalable n'est disponible.

Pour mieux adapter la chromatographie initiale aux futurs besoins du projet, un allongement de cette dernière a été effectué, ce qui est une procédure commune quand le but visé est d'obtenir une meilleure séparation générale. Aucune modification n'a été apportée à la composition des phases mobiles ou à la nature de la colonne chromatographique, qui étaient déjà bien adaptées aux composés visés. Trois nouvelles durées de chromatographie ont été testées, soit 15, 20 et 25 minutes. Un gradient linéaire, donc sans segments isocratiques, a été utilisé. Ces derniers ont surtout leur utilité dans des méthodes ciblées, lorsque les analytes sont connus et que le but est de mieux séparer des composés précis. Dans un contexte

d'analyse non ciblée, ils n'ont généralement pas leur place. Les trois nouvelles chromatographies ont été comparées avec la chromatographie initiale (11 minutes).

Pour réaliser cette partie du projet, dix composés ont été ajoutés dans une solution contenant 10 % d'acétonitrile, afin de s'harmoniser avec les paramètres chromatographiques initiaux de la méthode. La concentration finale injectée dans l'appareil était de 2,5 ng/mL pour chacun des composés. La nature de ces dix molécules est présentée dans le tableau 3.7 de la section Résultats et discussion. Ces composés ne sont pas tous des métabolites, car ces derniers sont difficiles à se procurer. Chacune des quatre chromatographies a été testée sur trois échantillons de composition identique. L'amélioration de la séparation a été mesurée à l'aide de la résolution entre les composés (voir équation 1.1), en utilisant les chromatogrammes du logiciel Masslynx.

2.4 Processus général pour le tri de données

Comme il a été mentionné précédemment, une quantité très importante de données résulte de l'analyse non ciblée. L'extraction d'informations pertinentes à partir de ces données brutes représente un défi en raison de leur complexité et de leur densité. Pour rendre l'analyse possible, il est essentiel de trier ces données pour réduire la quantité de *features* à investiguer. Cette étape du projet visait donc à trouver une méthode permettant de faire émerger des métabolites issus d'une expérience *in vitro* à partir de la quantité importante de données générées par l'analyse non ciblée, en réduisant le volume de *features* à investiguer. En optimisant le tri et la réduction des informations à analyser, il devient possible d'orienter les prochaines étapes vers une exploitation plus ciblée des *features* retenus, pour pouvoir éventuellement procéder à leur identification.

Au cours de ce projet, beaucoup d'efforts ont été investis pour trouver une méthode permettant d'extraire les métabolites créés suite à une expérience de métabolisme *in vitro* parmi la vaste quantité de données générées par l'analyse non ciblée. Des recherches ont été menées pour trouver divers logiciels, outils informatiques et méthodes qui permettraient, une fois combinés, d'atteindre notre but. La méthodologie qui a été pensée repose sur la soustraction des données découlant de deux échantillons, un post-incubation et un pré-incubation. L'idée derrière cette approche est que seuls les composés créés au cours de l'incubation, incluant les métabolites, devraient subsister. Cet objectif théoriquement simple a néanmoins posé plusieurs défis lors de sa mise en application. En effet, l'optimisation manuelle des étapes et paramètres permettant la création des *features* s'est avérée particulièrement complexe, entraînant la

production d'un nombre considérable de *features*, en atteignant souvent plus de 100 000 par échantillon, ce qui prouvait que le processus n'était pas optimal. Un autre problème empêchant pour sa part la soustraction d'échantillons était l'alignement non optimal des *features* contenus dans ces derniers. En effet, de légères variations des valeurs de t_R et de $[M + H]^+$ peuvent survenir entre différents échantillons, et sans une capacité avancée du logiciel pour associer par lui-même les *features* correspondants, l'alignement efficace des composés entre deux échantillons devient pratiquement impossible, surtout face à un nombre aussi élevé de *features*.

Ce n'est que vers la fin du projet qu'une version plus évoluée d'un logiciel (MZmine v.4.1.0) a été déployée et s'est avérée beaucoup plus efficace et sélective pour la création de *features*, simplifiant également le *workflow* pour générer ces derniers. Son utilisation permet de créer de façon beaucoup plus directe un *workflow* constitué d'étapes et de filtres précis pour produire une liste de *features* et procéder à un tri de ces derniers selon les besoins. Il propose également des étapes et valeurs de paramètres adaptés selon la méthode d'analyse utilisée (UPLC, QToF, DIA). Une option permettant de procéder à la soustraction des composés entre deux échantillons est par ailleurs disponible, il permet donc de mettre en œuvre la méthode envisagée. Le travail restant à faire pour cette section du projet consistait donc à ajuster les paramètres pour atteindre le meilleur équilibre entre sensibilité et sélectivité, c'est-à-dire la détection des métabolites tout en limitant les *features* n'étant vraisemblablement pas associés à des métabolites.

Pour évaluer la performance du *workflow* permettant la création et le tri des *features* et pour tester l'efficacité de la soustraction des composés entre plusieurs échantillons, des tests ont tout d'abord été faits en solution pure. Dix composés à une concentration de 2,5 ng/mL chacun ont été ajoutés à une solution contenant 10 % d'acétonitrile et ont été injectés sur l'appareil analytique avec la méthode d'analyse décrite à la section 2.2. La cocaïne- D_3 a été utilisée comme standard interne. Ces composés ont été sélectionnés de manière à couvrir l'ensemble de la plage de temps de la méthode UPLC en fonction de leurs temps de rétention, tout en présentant une sensibilité variable afin d'assurer une représentativité optimale. Le blanc utilisé pour la soustraction était composé uniquement d'acétonitrile à 10 %. Le but d'effectuer de premiers tests en solution pure avec des composés connus en forte concentration était d'évaluer plus facilement le bon fonctionnement du processus et d'orienter plus aisément les valeurs de paramètres à utiliser.

Après avoir précisé les paramètres grâce aux essais en solution pure, des tests avec des échantillons issus de l'expérience de métabolisme *in vitro* du midazolam ont été effectués. L'objectif était de tester le processus en travaillant avec des résultats qui étaient encore une fois attendus, mais dans une matrice plus complexe et représentative du type d'échantillon ciblé par cette étude. Contrairement aux tests en solution pure, il était prévu que ces essais engendreraient une densité de données similaire à celle qui serait rencontrée dans un test où les métabolites ne seraient pas connus, rendant l'analyse plus près du cadre visé par ce projet.

Plus d'une vingtaine de paramètres peuvent être optimisés dans le *workflow* proposé par MZmine. Un des objectifs de cette section du projet était de tester l'impact de la variation de ces paramètres sur la sensibilité et la sélectivité de la liste de *features* créée. Les paramètres pouvant être ajustés incluent entre autres la hauteur minimale du *feature*, sa largeur approximative, le nombre de scans formant le pic et des valeurs de tolérance liées aux écarts de temps de rétention ou de *m/z*, qu'ils surviennent au sein d'un même échantillon ou entre différents échantillons. Ils ont tous été testés, en fonctionnant majoritairement par essai-erreur autour des valeurs proposées par le logiciel et celles incluses dans la méthode analytique. La variation de la grande majorité des paramètres a eu une influence négligeable sur les résultats, pour plusieurs raisons. En général, les valeurs proposées par MZmine pour la méthode analytique utilisée se sont révélées être bien adaptées. De plus, les paramètres liés à l'incertitude de l'appareil analytique, tels que la tolérance aux fluctuations des *m/z* entre échantillons ou entre les scans constituant un *feature*, n'ont montré aucun impact pertinent sur les résultats, ce qui atteste de la précision des mesures fournies par l'appareil. Cette section présentera la méthode de pensée qui a été adoptée pour trier les données, et principalement l'importance d'un processus personnalisé selon les échantillons, par observation des résultats.

Deux paramètres ont été retenus et évalués à travers trois niveaux de variation pour mesurer leur effet sur les résultats, en raison de leur pertinence et de leur incidence plus marquée sur ces derniers. Le premier est la hauteur minimale du *feature*, donc la hauteur minimale que le sommet de son pic chromatographique doit avoir pour qu'il soit inclus dans la liste. Ce paramètre a un impact direct sur le nombre de composés détectés. Le second est le nombre minimal de scans formant le *feature*, soit le nombre de scans consécutifs où le $[M + H]^+$ relié au composé est identifié. Une façon plus imagée de concevoir ce paramètre serait de le voir comme le nombre de points de données qui dessinent le pic chromatographique associé au *feature*. Un pic plus large présentant un signal élevé sera généralement

composé d'un plus grand nombre de points de données qu'un pic étroit de faible intensité. La raison soutenant ce choix est que ce paramètre impacte également le nombre de composés intégrés à la liste de *features*, détectant souvent plus facilement les composés ayant un signal plus élevé. Le CTQ recommande un minimum de 5 scans pour obtenir un pic de qualité sur cet appareil, tandis que MZmine en suggère 4 pour notre type d'analyse. L'utilisation du mode MS^F réduit habituellement le nombre de scans consécutifs pour chaque composé et une diminution de cette valeur a été considérée comme potentiellement nécessaire pour améliorer la détection des faibles signaux attendus avec certains métabolites. L'objectif était d'évaluer l'impact de cette réduction sur la détection des signaux et par le fait même l'augmentation du nombre total de composés à investiguer.

L'ensemble des paramètres optimisables pour le *workflow* proposé par MZmine sont rassemblés dans une seule interface simplifiée et permettent collectivement de procéder aux étapes essentielles de la figure 1.5 qui ont été décrites en détail, soit la création de la liste de masses exactes (étape 2), la production des EICs (étape 4), la déconvolution chromatographique (étape 6) et, au besoin, l'alignement des échantillons (étape 12). Chacun de ces paramètres a un impact sur certaines de ces étapes. Les deux qui ont été retenus pour être démontrés dans ce mémoire, soit la hauteur du *feature* et le nombre de scans consécutifs, ont plus précisément un impact sur les étapes 4 et 6. L'ensemble des paramètres permet donc de créer la liste de *features*, de les trier et d'aligner des échantillons, lorsque désiré. La soustraction entre deux échantillons qui est effectuée dans ce projet est appliquée après l'ensemble de ces traitements.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Métabolisme *in vitro* : Optimisation du protocole dans différents modèles

Le but de cette partie du projet était de tester la performance d'un protocole de génération de métabolites à partir de microsomes de foie humain à l'aide de deux composés modèles au métabolisme bien connu, le midazolam et le fentanyl. En considérant qu'il est peu réaliste de recréer tous les métabolites d'un composé grâce à une telle méthode, le but visé était d'arriver à produire et identifier au minimum un métabolite principal par substrat et, dans l'idéal, plusieurs métabolites principaux s'il y a lieu. Comme décrit dans la section matériel et méthodes, trois concentrations et plusieurs temps d'incubation ont été testés pour chacun des composés. Le but de ces variations de paramètres était de déterminer quelles conditions nous permettaient d'obtenir les meilleurs résultats, soit un ou plusieurs métabolites dans des concentrations nous permettant d'augmenter notre confiance en leur identification. Additionnellement, nous avons tenté d'observer la cinétique d'apparition des différents métabolites, de manière semi-quantitative ou qualitative, selon le modèle.

Dans cette section, les composés ont été recherchés selon une approche qui pourrait être qualifiée de « semi-ciblée ». Cette méthode repose sur la recherche des ions $[M + H]^+$ dans le logiciel Masslynx, ce qui nécessite une connaissance préalable des valeurs spécifiques associées aux métabolites de chacun des modèles. Par conséquent, cette approche s'appuie fortement sur les données disponibles dans la littérature, qui ont guidé l'identification présumée des métabolites présents dans les échantillons. Les termes métabolites présumés seront utilisés à de nombreuses reprises dans cette section. Une identification formelle ne peut être effectuée que lorsqu'un étalon est disponible pour le comparer avec les échantillons post métabolisme. Hélas, des étalons n'étaient disponibles au laboratoire ainsi que chez des fournisseurs uniquement pour une minorité de métabolites du midazolam et du fentanyl, ce qui appuie la nécessité de ce projet. L'intention était donc d'obtenir des informations telles que le $[M + H]^+$, le ratio isotopique et les fragments caractéristiques, qui permettront d'identifier ces métabolites et d'établir un niveau de confiance relatif en l'identification effectuée.

Un étalon combiné déjà employé au laboratoire a fait usage de contrôle positif dans ce projet. Il contient pratiquement l'ensemble des drogues, médicaments et métabolites présents au laboratoire. Il a été utilisé

premièrement par soucis de simplicité, mais aussi parce qu'il apportait beaucoup d'informations dû à son nombre très élevé de composés. De plus, cet étalon combiné présentait un intérêt supplémentaire en permettant de détecter des molécules dont la présence dans nos échantillons n'aurait pas été anticipée.

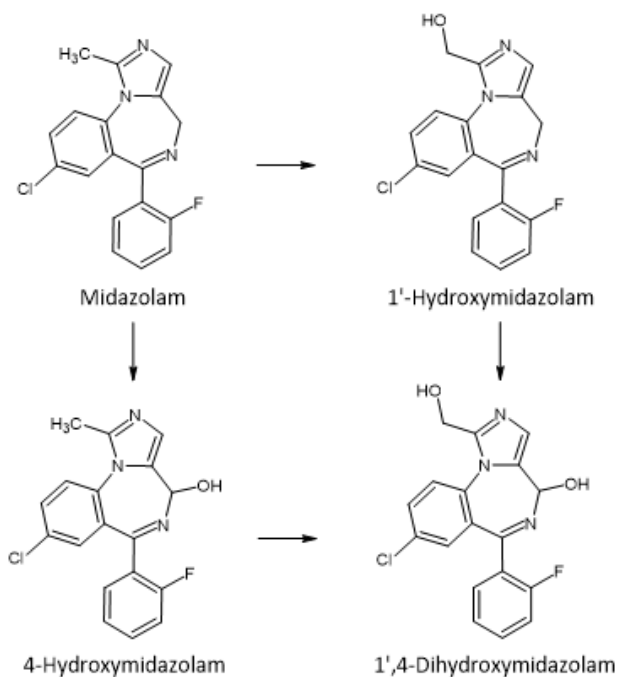
Pour assurer une meilleure compréhension de cette section, il a été jugé pertinent de rappeler la méthode de dilution des échantillons qui a été expliquée en section 2.4. Les concentrations initiales de substrat, qui étaient respectivement de 1 µg/mL, 10 µg/mL et 30 µg/mL, ont toutes été diluées pour être sur une échelle finale équivalente en substrat dans les échantillons analysés. Cela signifie concrètement que tous les échantillons associés à la concentration initiale de 30 µg/mL ont subi une dilution 30 fois supérieure à ceux associés à la concentration initiale de 1 µg/mL. Cette échelle a été choisie, malgré ses limites, parce qu'elle permettait à la fois d'injecter une concentration de substrat qui se situe dans la plage tolérable de l'appareil analytique et d'optimiser la détection des métabolites, comme il a été expliqué à la section 2.4.

Les résultats présentés dans cette section ne sont donc pas représentatifs des quantités absolues de métabolites formés, puisque les métabolites dans certains échantillons subissent une dilution plus élevée. Ils sont cependant représentatifs des signaux qui seront observés avec la méthode analytique employée, selon la concentration initiale de substrat utilisée. Ainsi, dans cette section, toute mention d'une concentration fera référence à la concentration initiale du substrat, avant dilution. Ce choix s'explique par le fait que c'est cette concentration qui détermine la formation des métabolites et l'intensité des signaux détectés pour cette méthode analytique et cet appareil, en tenant compte des dilutions nécessaires pour leur utilisation.

3.1.1 Midazolam

Comme expliqué dans la section 2.1, le midazolam est un composé au métabolisme bien connu et bien décrit dans la littérature. Il constituait donc une bonne référence pour tester le protocole de génération de métabolites. Son métabolisme est assez simple, avec un faible nombre de métabolites de phase I. Les métabolites littéraires présentés à la figure 3.1 sont tous générés par l'isoenzyme CYP3A4, faisant du midazolam un substrat de choix pour cette expérience.

Figure 3.1 Métabolisme de phase I du midazolam, selon la littérature (46)



La figure 3.1 présente les trois métabolites de phase I du midazolam, tous obtenus après une ou plusieurs hydroxylations de ce dernier. Des métabolites glucuronidés sont aussi retrouvés dans la littérature, mais ne sont pas présentés dans cette figure puisqu'ils sont produits par un métabolisme de phase II, qui est impossible à obtenir avec la méthode utilisée dans ce projet.

Le 1'-hydroxymidazolam est le métabolite principal du midazolam, représentant de 60 % à 70 % des produits de biotransformation de ce dernier. Le 4-hydroxymidazolam représente quant à lui 5% ou moins de cet ensemble de métabolites formés, et de faibles quantités de 1',4-dihydroxymidazolam ont été détectées dans certaines études, mais n'ont pas été quantifiées. (47)

L'objectif de l'expérience avec le midazolam était idéalement d'observer ses trois métabolites de phase I, en établissant cependant une priorité sur son métabolite principal, le 1'-hydroxymidazolam.

Une recherche des $[M + H]^+$ associés aux métabolites littéraires du midazolam a été faite dans le logiciel Masslynx pour chacun des échantillons analysés. Le tableau 3.1 présente des informations théoriques et expérimentales sur le midazolam et les trois métabolites soupçonnés d'être apparus lors de l'expérience réalisée au cours de ce projet. Il est important de se rappeler que ces métabolites n'ont pas été

formellement identifiés, à l'exception du 1'-hydroxymidazolam, puisqu'un étalon est nécessaire pour procéder à une réelle identification et qu'aucun étalon n'était disponible au laboratoire pour le 4-hydroxymidazolam et le 1',4-dihydroxymidazolam.

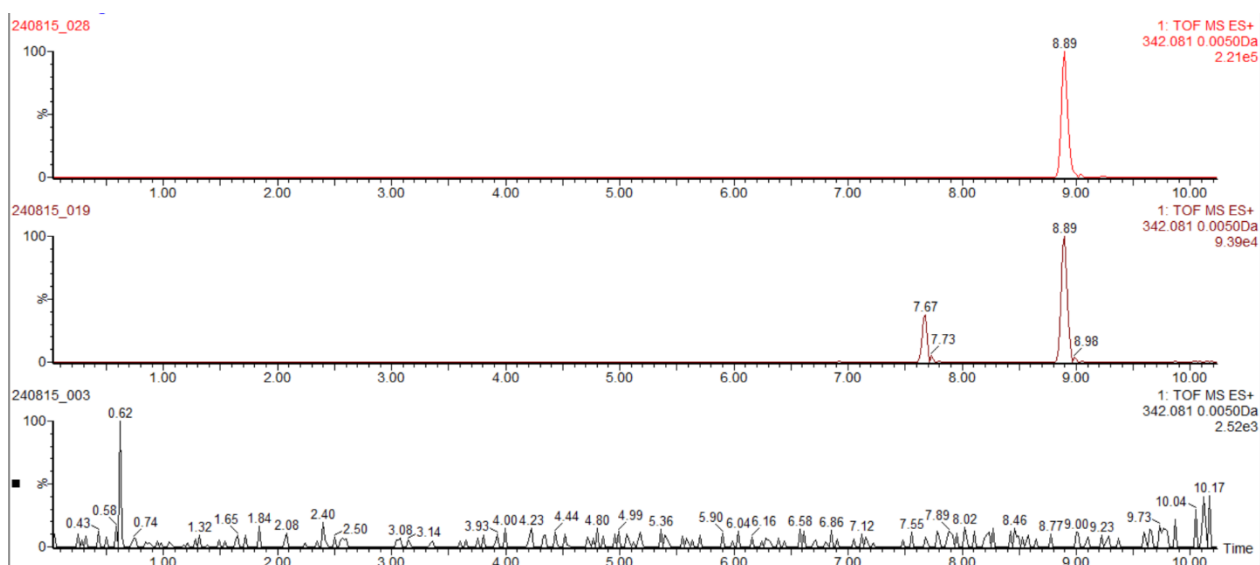
Tableau 3.1 Informations expérimentales et théoriques sur le midazolam et les trois métabolites présumés. (48–50)

	Nom	Biotransformation	t_R (min)	Formule brute	[M + H]⁺	Fragment(s)
MID	Midazolam	-	8,95	C ₁₈ H ₁₃ ClFN ₃	326,0860	291,1172 244,0329
M1	1'-Hydroxymidazolam	Hydroxylation	8,89	C ₁₈ H ₁₃ ClFN ₃ O	342,0809	324,0704 203,0376
M2	4-Hydroxymidazolam	Hydroxylation	7,67	C ₁₈ H ₁₃ ClFN ₃ O	342,0809	297,0595
M3	1',4-Dihydroxymidazolam	Di-hydroxylation	7,33	C ₁₈ H ₁₃ ClFN ₃ O ₂	358,0758	-

Les informations présentées dans le tableau 3.1 incluent la valeur du $[M + H]^+$ théorique pour chacun des composés, la formule chimique associée ainsi que la biotransformation subie par le midazolam pour former chacun des métabolites. Les temps de rétention inscrits sont quant à eux ceux qui ont été observés pour chacun des métabolites avec la méthode chromatographique utilisée. Les fragments indiqués sont des fragments importants qui ont été observés dans les résultats, qui ont aussi été rapportés dans la littérature et dans des bases de données pour ces métabolites. Aucun fragment caractéristique n'a été identifié dans les résultats et dans la littérature pour le 1',4-dihydroxymidazolam. Pour l'ensemble de cette section, chaque valeur expérimentale de $[M + H]^+$ qui a été associée à une valeur littéraire, qu'il s'agisse d'un métabolite ou un fragment, présentait une erreur de masse inférieure au seuil recommandé qui est de 5 ppm.

La figure 3.2 démontre l'apparition de différents signaux chromatographiques associés à un $[M + H]^+$ de 342,0809, qui correspond à un midazolam hydroxylé, suite à l'expérience avec les microsomes de foie humain. Trois chromatogrammes ont été superposés pour créer cette figure. Celui du bas est un contrôle négatif, contenant le midazolam et toutes les composantes du milieu d'incubation, à l'exception des microsomes. Le chromatogramme du centre est quant à lui associé à un échantillon où le métabolisme s'est produit, et celui du haut est relié à l'étalon combiné utilisé au laboratoire, contenant du 1'-hydroxymidazolam, mais aucun 4-hydroxymidazolam.

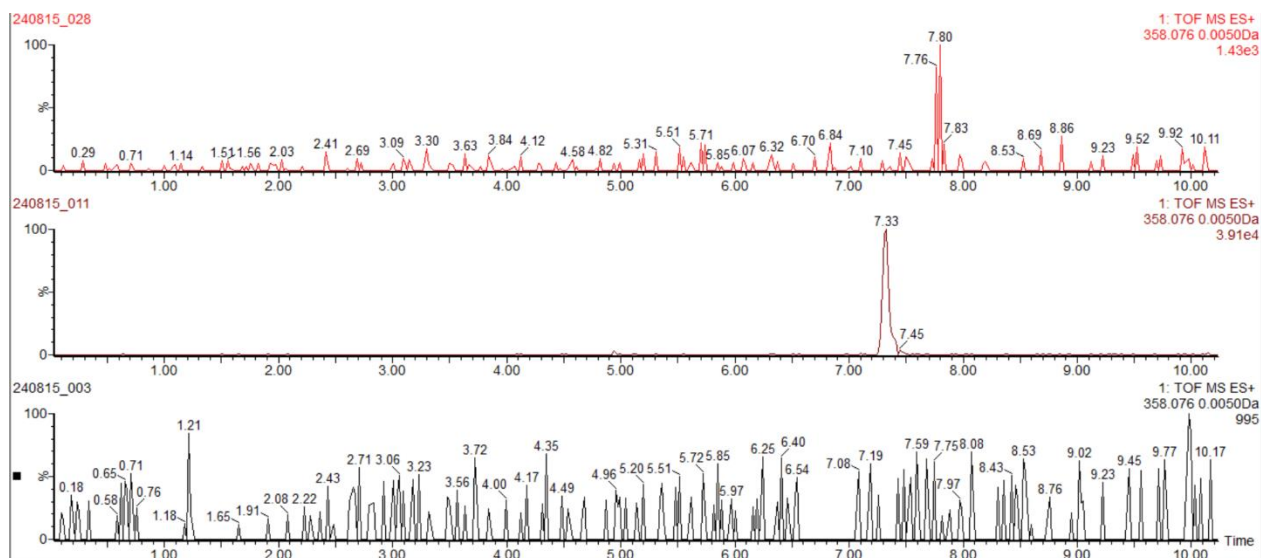
Figure 3.2 Superposition de chromatogrammes associés à un $[M + H]^+$ de 342,0809, présentant un contrôle négatif (bas), un échantillon avec métabolisme (centre) et un contrôle utilisé au laboratoire contenant le 1'-hydroxymidazolam (haut)



La figure 3.2 démontre que l'expérience de génération de métabolites a permis de produire le 1'-hydroxymidazolam et soutient l'hypothèse que le 4-hydroxymidazolam aurait également été généré au cours de l'incubation. Ces deux composés ne se trouvent pas dans le contrôle négatif, ce qui indique qu'ils sont apparus après l'incubation avec les microsomes. Les deux hydroxymidazolams ont des spectres MS/MS similaires, il peut donc être utile de se fier à leur temps de rétention ainsi qu'à leurs proportions l'un par rapport à l'autre pour les différencier. Le 1'-hydroxymidazolam est un composé faisant partie de la solution de contrôle positif du laboratoire, alors que le 4-hydroxymidazolam n'en fait pas partie. En observant le chromatogramme du haut et son pic à 8,89 min, il est possible d'affirmer que dans l'échantillon post-incubation, on retrouverait le 1'-hydroxymidazolam à 8,89 minutes. Le composé présent à 7,67 minutes serait donc possiblement le 4-hydroxymidazolam. La littérature soutient également que le 4-hydroxymidazolam est formé en quantité beaucoup moins importante que le 1'-hydroxymidazolam, ce qui appuie l'hypothèse que le pic à 7,67 minutes, qui est largement inférieur au pic à 8,89 minutes dans tous les échantillons, serait du 4-hydroxymidazolam.

La figure 3.3 démontre quant à elle l'apparition d'un signal associé à un $[M + H]^+$ de 358,0758, correspondant à un midazolam dihydroxylé, suite à l'expérience avec les microsomes de foie humain. Le même principe que pour la figure 3.2 a été utilisé. Le chromatogramme du bas est un contrôle négatif, celui du centre est lié à un échantillon où le métabolisme s'est produit et où le 1',4-dihydroxymidazolam semble apparaître en quantité notable. Le chromatogramme du haut est relié à l'étalon combiné du laboratoire, ne contenant pas de 1',4-dihydroxymidazolam.

Figure 3.3 Superposition de chromatogrammes associés à un $[M + H]^+$ de 358,0758, présentant un contrôle négatif (bas), un échantillon avec métabolisme (centre) et un étalon combiné utilisé au laboratoire (haut)



La figure 3.3 soutient l'hypothèse que l'expérience de génération de métabolites aurait permis de produire le 1',4-dihydroxymidazolam. Celui-ci, représenté par le pic à 7,33 minutes, ne se trouve pas dans le contrôle négatif, ce qui indique qu'il serait apparu après l'incubation avec les microsomes. L'étalon combiné du laboratoire a été utilisé dans ce cas-ci comme second outil pour appuyer l'hypothèse de l'apparition du 1',4-dihydroxymidazolam. Ce dernier ne fait pas partie des molécules constituant ce contrôle, et aucun signal correspondant à ce composé n'est retrouvé dans le chromatogramme du haut.

Les temps de rétention des trois composés concordent avec leur identification en tant que métabolites présumés. Le temps de rétention du 1'-hydroxymidazolam concorde avec celui de son étalon, le second métabolite relié à ce $[M + H]^+$ serait le 4-hydroxymidazolam, et le 1',4-dihydroxymidazolam serait vraisemblablement le plus polaire, ce qui concorde avec son temps de rétention plus court que les deux autres composés.

Les trois métabolites présumés concordent avec la théorie en ce qui concerne leur masse exacte et leur ratio isotopique assez distinctif. Le 1'-hydroxymidazolam, pour lequel des fragments caractéristiques ont été identifiés et qui a également été comparé à un étalon, peut être classé avec un niveau de confiance de 1, et être identifié de façon formelle. Comme aucun étalon n'était disponible pour le 4-hydroxymidazolam mais qu'il a tout de même pu être associé à un fragment caractéristique d'un type d'hydroxymidazolam, ce dernier peut être associé à un niveau de confiance de 3. Aucun fragment caractéristique n'a été attribué au 1',4-dihydroxymidazolam, ce qui lui donne un niveau de confiance de

4. Observer la cinétique d'apparition des différents métabolites nous permet cependant d'appuyer l'hypothèse que celui-ci apparaîtrait dans certains échantillons. Ce fait sera mieux expliqué avec la figure 3.5.

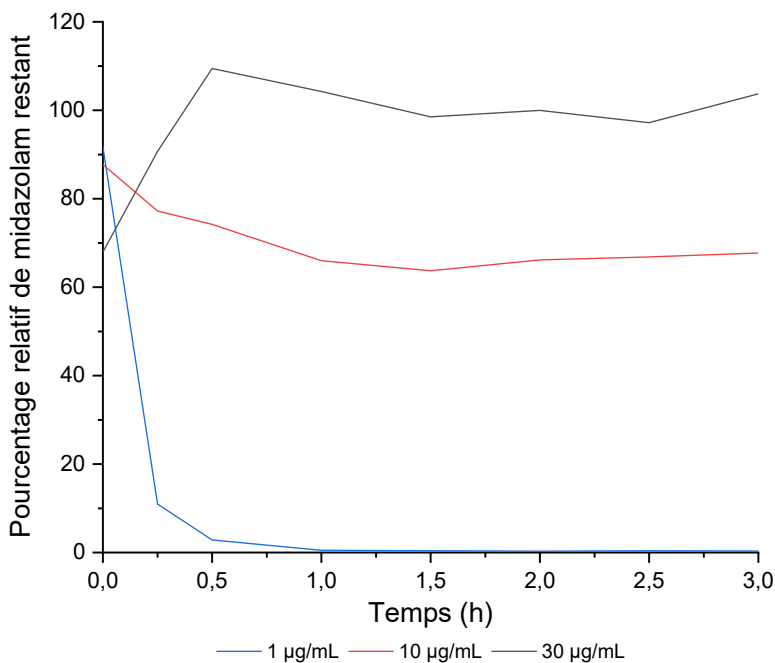
Les figures 3.4 et 3.5 ont pour but d'illustrer les tendances de diminution du midazolam et d'augmentation du métabolite confirmé ainsi que des deux métabolites présumés, selon le temps d'incubation et les trois concentrations testées. La méthode d'analyse utilisée n'est pas à proprement dit une méthode quantitative, mais plutôt semi-quantitative. Les valeurs présentées dans les graphiques permettent de comprendre la cinétique générale du métabolisme produit, mais ne peuvent pas être considérées comme des valeurs exactes.

La figure 3.4 présente le pourcentage relatif du midazolam restant selon le temps d'incubation pour les trois concentrations testées. Ce pourcentage relatif représente le pourcentage du signal du midazolam par rapport au signal obtenu pour ce dernier dans le contrôle négatif, où aucune réaction métabolique n'est sensée s'être produite, ce qui correspondrait théoriquement à un taux de midazolam restant de 100 %. Cette méthode a été utilisée pour prendre en considération la possibilité d'un métabolisme presque instantané lors du mélange entre le substrat et les enzymes.

Équation 3.1 Équation utilisée pour le pourcentage relatif de midazolam restant exprimé sur l'axe y de la figure 3.4

$$\text{Pourcentage relatif} = \frac{\text{Intensité du signal du midazolam dans l'échantillon analysé}}{\text{Intensité du signal du midazolam dans le contrôle négatif}} * 100$$

Figure 3.4 Pourcentage relatif du midazolam restant selon le temps d'incubation pour les trois concentrations testées



La figure 3.4 permet de constater qu'à la plus faible concentration initiale de substrat testée (1 µg/mL), le midazolam est rapidement consommé par le mélange réactionnel. Après seulement 15 minutes d'incubation, seulement environ 10 % du midazolam initial est détecté par l'appareil analytique, et environ 2 % sont restants après 30 minutes. À concentration plus élevée (10 µg/mL), le midazolam est également consommé dans des proportions notables, mais n'est pas complètement métabolisé par le mélange réactionnel, comparativement à l'incubation à 1 µg/mL. Cela peut signifier que le mélange réactionnel en question serait saturé et ne contiendrait pas suffisamment d'enzymes pour métaboliser cette quantité de midazolam dans des temps raisonnables pour une expérience. Pour la plus haute concentration initiale de substrat (30 µg/mL), il n'est pas possible de constater visuellement une diminution du midazolam, ce qui indique que cette concentration serait définitivement trop élevée pour la quantité d'enzymes utilisée. Le pourcentage relatif apparaît souvent comme étant supérieur à 100 % pour cette concentration. Cela peut être hypothétiquement dû à plusieurs facteurs. Sa concentration de départ en substrat était peut-être légèrement supérieure à la valeur visée de 30 µg/mL, malgré des efforts pour être rigoureux lors de sa préparation. Également, comme proportionnellement parlant la dégradation du substrat semble avoir été très faible dans cet échantillon, il est possible que la concentration de midazolam analysée ait dépassé la capacité optimale de l'appareil, compromettant ainsi l'exactitude des mesures. De plus, puisque la

méthode d'analyse n'est pas quantitative, une certaine imprécision demeure quant aux mesures obtenues. Le temps zéro de la plus haute concentration initiale de substrat semble constituer une valeur aberrante par rapport à ce qui était attendu. La dilution importante qui a dû être faite pour cet échantillon a pu causer un manque d'homogénéité qui pourrait expliquer ce résultat. Toutefois, la cause exacte de cet écart demeure inconnue. Cela dit, cette valeur n'a aucun impact sur la visualisation des tendances, ni sur les conclusions qui peuvent en être tirées.

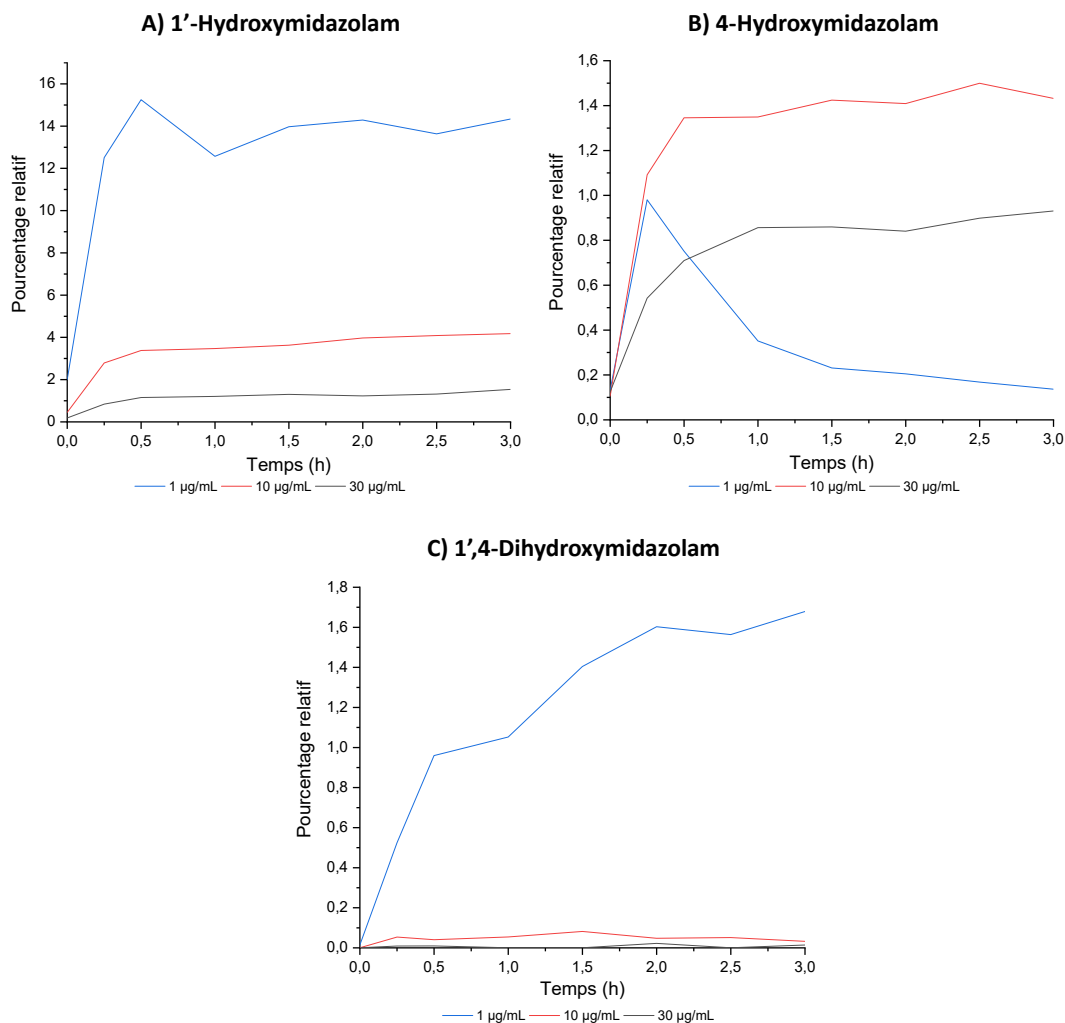
La figure 3.5 présente la variation du pourcentage relatif de formation des trois métabolites présumés selon le temps d'incubation, pour les trois concentrations testées. Ce pourcentage relatif représente le pourcentage de midazolam qui aurait été transformé en chacun des métabolites. Il a donc été calculé en faisant le rapport du signal du métabolite sur le signal du midazolam considéré comme total dans le contrôle négatif, en rapportant ce rapport en pourcentage. Il est important de se rappeler que les métabolites et leur substrat ne sont pas toujours équivalents en terme de signal, un concept expliqué dans la section 1.2.2 sous le nom de *relative response factor* (RRF). Comme il est impossible de connaître ce ratio sans étalon et qu'un étalon n'était pas disponible pour chacun des métabolites, les calculs ont été faits sans le prendre en considération. Bien que les RRF des métabolites ne soient pas tous connus, il est raisonnable de supposer qu'ils sont d'un ordre de grandeur comparable, compte tenu de leur structure similaire. Ainsi, même si les pourcentages relatifs présentés ne correspondent pas à des concentrations absolues, ils permettent une comparaison pertinente entre les métabolites.

Équation 3.2 Équation utilisée pour le pourcentage relatif de formation des métabolites exprimé sur l'axe y de la figure 3.5

$$\text{Pourcentage relatif} = \frac{\text{Intensité du signal du métabolite dans l'échantillon analysé}}{\text{Intensité du signal du midazolam dans le contrôle négatif}} * 100$$

Malgré que la méthode soit semi-quantitative et ne procure pas des résultats exacts, il est intéressant et pertinent d'observer les tendances générales d'apparition des différents métabolites, lorsque cela est possible. En effet, cela permet de déterminer l'impact de la variation des différents paramètres sur l'apparition des métabolites, que ce soit par le nombre de métabolites observés ou la concentration relative de ceux-ci, et de déterminer les meilleures conditions à utiliser selon les besoins précis.

Figure 3.5 Variation du pourcentage relatif selon le temps pour les trois concentrations testées pour A) le 1'-hydroxymidazolam, B) le 4-hydroxymidazolam et C) le 1',4-dihydroxymidazolam



La figure 3.5 permet d'émettre plusieurs observations. Tout d'abord, le 1'-hydroxymidazolam a bel et bien été formé de façon majoritaire comparativement aux deux métabolites présumés, comme il était prévu selon la littérature. Cette figure permet également de constater que certaines concentrations de substrat semblent favoriser la formation de différents métabolites. En effet, seule la plus faible concentration initiale (1 µg/mL) a semblé permettre la formation de 1',4-dihydroxymidazolam dans des concentrations notables, puisque seulement des traces ont été détectées à 10 µg/mL, et aucune trace n'a été détectée à la plus haute concentration. L'utilisation d'une concentration plus élevée de substrat semble donc limiter la formation de métabolite secondaire. Cela peut être dû au fait que lors de l'utilisation d'une concentration plus faible en substrat, ce dernier s'épuiserait, et l'enzyme responsable du métabolisme se

mettrait à transformer les métabolites déjà formés, ce qui permettrait la production d'un métabolite secondaire, qui dans le cas présent est le 1',4-dihydroxymidazolam. Lors de l'utilisation d'une quantité plus élevée de substrat pour la même quantité d'enzymes, ce phénomène ne semble pas se produire, ou du moins avec une moins grande importance. Il est possible que l'enzyme CYP3A4 ait une plus grande affinité pour le substrat que pour ses métabolites, ce qui expliquerait qu'elle priorise le substrat lorsqu'il est en quantité suffisante. Le 4-hydroxymidazolam semble particulièrement affecté par ce phénomène, puisqu'on peut le voir diminuer après 15 minutes d'incubation à 1 µg/mL, alors qu'une augmentation est bien visible pour le 1',4-dihydroxymidazolam. Le signal semble être maximisé pour le métabolite principal et le métabolite secondaire avec l'utilisation de la plus faible concentration de substrat, alors que le signal du 4-hydroxymidazolam semble être maximisé avec l'utilisation de la concentration de 10 µg/mL.

Comme mentionné plus tôt dans cette section, aucun fragment caractéristique n'a été trouvé dans la littérature pour le 1',4-dihydroxymidazolam, ce qui diminuerait normalement la confiance en son identification. Cependant, l'analyse de la cinétique d'apparition des différents métabolites présumés permet de poser l'hypothèse que celui-ci apparaîtrait bel et bien, en se fiant à la théorie sur l'affinité de l'enzyme envers les différents substrats.

La figure 3.5 apporte beaucoup d'informations, mais n'est pas représentative de la quantité absolue de métabolites formés, puisque comme il a été mentionné, les trois concentrations ont été diluées pour être à la même échelle. Un échantillon contenant 30 µg/mL de substrat ne produira pas nécessairement 30 fois la concentration en métabolites qu'un échantillon ne contenant que 1 µg/mL de substrat, surtout si la même quantité d'enzymes a été utilisée. La quantité de métabolites dans les échantillons plus dilués a donc un risque d'être sous-estimée. Ce type de dilution était cependant nécessaire pour respecter la plage de concentration acceptable de l'appareil et la figure 3.5 est pertinente puisqu'elle illustre bien les signaux qui seront observés pour ces trois concentrations initiales de substrat en utilisant cette méthode analytique.

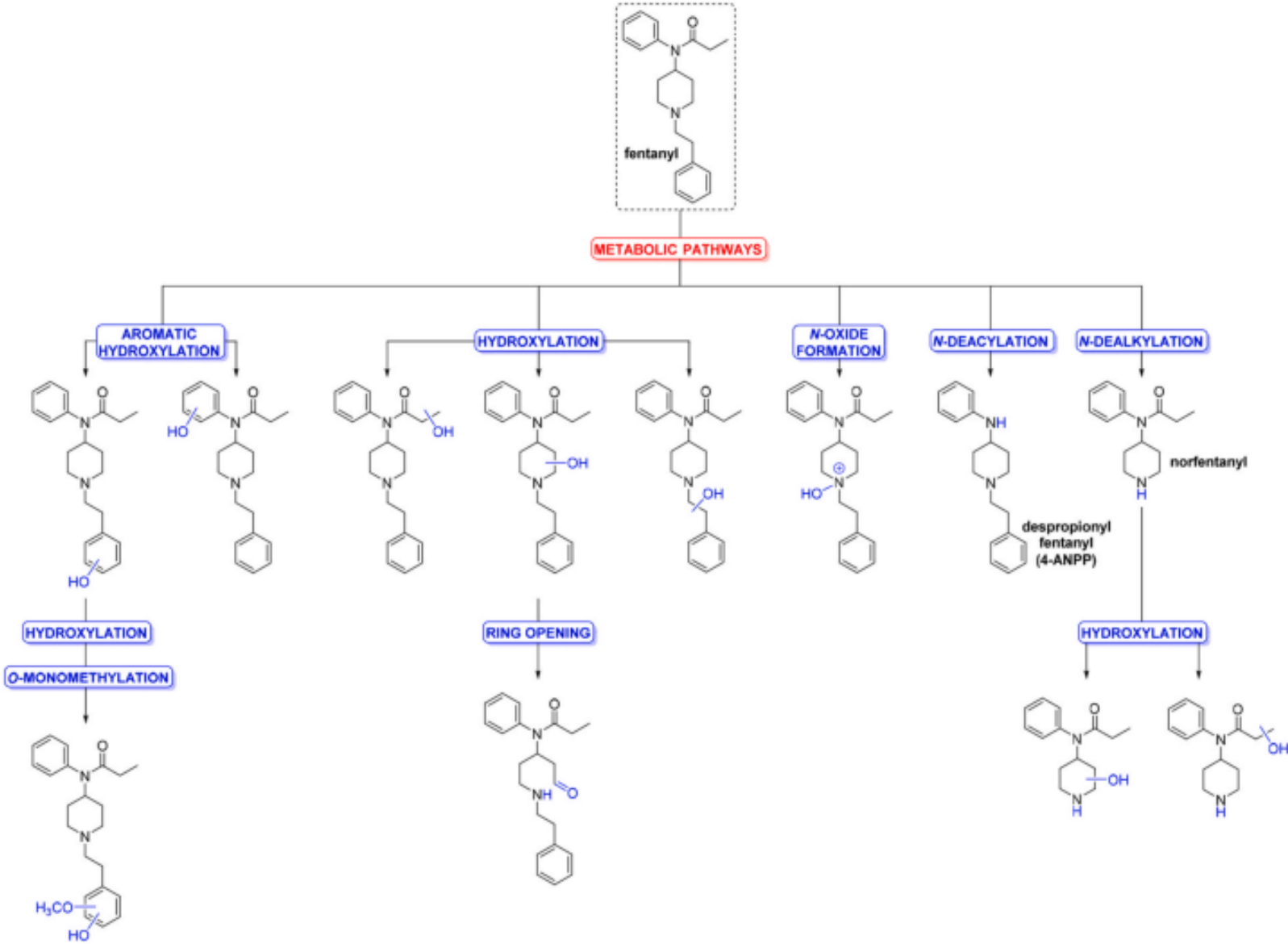
Puisqu'avec l'appareil utilisé au cours de ce projet, une dilution importante est nécessaire, la concentration initiale de 30 µg/mL n'a pas autant d'utilité. Il peut cependant valoir la peine de tester deux concentrations différentes, soit 1 µg/mL et 10 µg/mL, puisqu'elles apportent chacune une maximisation du signal pour différents métabolites parmi les trois qui ont été observés. La figure 3.5 démontre également que l'atteinte d'un plateau arrive après 30 minutes pour le signal du 1'-hydroxymidazolam et du 4-

hydroxymidazolam, ce qui indique que la majeure partie de la réaction se produirait dans ce délai. Le 1',4-dihydroxymidazolam continue quant à lui à augmenter au cours des trois heures. Pour observer efficacement les métabolites majoritaires, 30 minutes de temps d'incubation seraient suffisantes alors que pour observer des métabolites moins courants, un temps d'incubation plus long serait recommandé.

3.1.2 Fentanyl

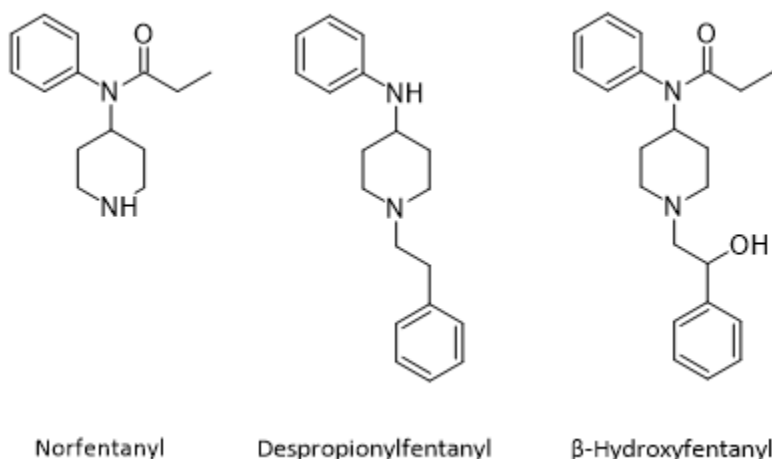
Le second modèle qui a été choisi pour tester la méthode de génération de métabolites est le fentanyl. Il s'agit d'un composé qui a été largement étudié au cours des dernières années, ce qui fait que son métabolisme est bien connu et bien décrit dans la littérature. Il est cependant plus complexe que celui du midazolam, avec un plus grand nombre de métabolites identifiés. Son métabolisme repose majoritairement sur des réactions de phase I, réalisées par l'isoenzyme CYP3A4 du cytochrome P450, ce qui fait du fentanyl un second substrat très intéressant à utiliser pour ce projet. Son métabolisme littéraire est présenté à la figure 3.6.

Figure 3.6 Métabolisme du fentanyl, selon la littérature. (51)



La figure 3.6 présente les métabolites du fentanyl retrouvés dans la littérature. Ceux-ci sont principalement formés suite à des réactions de phase I, par une hydrolyse ou une hydroxylation. Les métabolites de phase II sont peu courants pour le fentanyl, mais peuvent survenir à l'occasion, comme avec la méthylation présentée dans cette figure. La méthode utilisée dans ce projet ne permet cependant pas la méthylation des composés. Le norfentanyl est le métabolite principal du fentanyl et il est par conséquent le composé le plus utilisé dans les laboratoires pour confirmer la consommation de fentanyl chez un individu. Les autres métabolites les plus courants du fentanyl sont le despropionylfentanyl et les composés hydroxylés du fentanyl, plus particulièrement le β -hydroxyfentanyl.

Figure 3.7 Structures des métabolites les plus courants du fentanyl



L'objectif de l'expérience avec le fentanyl était idéalement d'observer plusieurs de ses métabolites dans des concentrations pertinentes, en priorisant cependant son métabolite principal, le norfentanyl.

Une recherche de tous les $[M + H]^+$ associés aux métabolites littéraires du fentanyl a été faite avec le logiciel Masslynx pour chacun des échantillons analysés. Le tableau 3.2 présente des informations théoriques et expérimentales sur le fentanyl et les cinq métabolites soupçonnés d'être apparus lors de l'expérience réalisée au cours de ce projet. Ces métabolites n'ont pas été formellement identifiés, à l'exception du norfentanyl et du β -Hydroxyfentanyl, puisque des étalons étaient disponibles uniquement pour ces deux composés.

Tableau 3.2 Informations expérimentales et théoriques sur le fentanyl et les cinq métabolites présumés. (52,53)

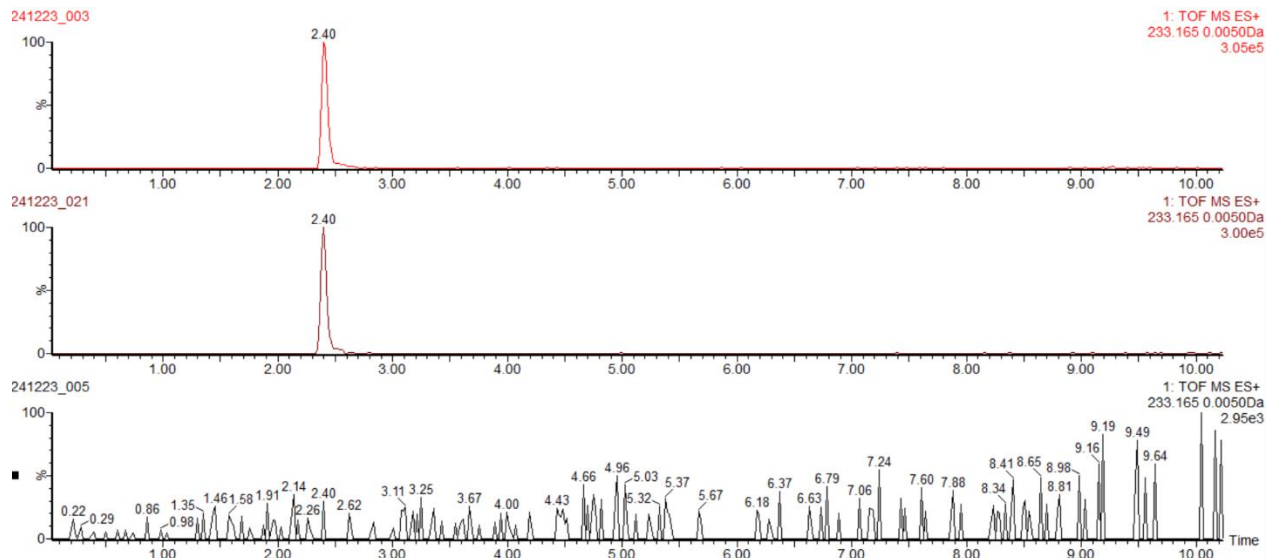
	Nom	Biotransformation	t_R (min)	Formule brute	[M + H]⁺	Fragment(s)
FEN	Fentanyl	-	5,03	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O	337,2280	188,1439 105,0698
M1	Norfentanyl	N-désalkylation	2,40	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O	233,1654	84,0813
M2	-	Hydroxylation	3,84	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂	353,2229	188,1439
M3	-	Hydroxylation	4,15	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂	353,2229	204,1388
M4	β-Hydroxyfentanyl	Hydroxylation	4,54	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂	353,2229	204,1388
M5	-	-	6,66	-	353,2229	-

Les informations présentées au tableau 3.2 incluent la valeur du $[M + H]^+$ théorique pour chacun des composés, la formule chimique associée ainsi que la biotransformation du fentanyl qui s'est vraisemblablement produite pour obtenir chacun des métabolites. Les temps de rétention inscrits sont quant à eux ceux qui ont été observés pour chacun des composés avec la méthode chromatographique utilisée. Les fragments indiqués sont des fragments importants qui ont été observés dans les résultats et qui ont aussi été rapportés dans la littérature pour ces métabolites.

Comme le démontre le tableau 3.2, l'expérience d'incubation du fentanyl avec les microsomes de foie humain a permis de générer plusieurs de ses métabolites. Le norfentanyl (M1) a été créé avec succès, ce qui a pu être confirmé à l'aide d'un étalon. Plusieurs fentanyls hydroxylés semblent avoir été produits, soit les métabolites présumés M2 et M3, et le β -Hydroxyfentanyl, dont la présence a également été confirmée à l'aide d'un étalon. Le métabolite présumé M5 présente peu d'informations dans le tableau. Il s'agit d'un pic mineur, dont l'intensité reste relativement faible, qui pourrait correspondre à un métabolite puisqu'il est associé au $[M + H]^+$ de 353,2229 et que son signal augmente avec le temps d'incubation. Il ne peut cependant pas être associé avec autant de certitude à la formule chimique d'un fentanyl hydroxylé, puisque son ratio isotopique ne correspond pas parfaitement à son ratio théorique et varie entre les différents échantillons. De plus, aucun fragment caractéristique n'a été retrouvé dans son spectre de masse. Les résultats laissent penser que le despropionylfentanyl n'aurait pas été produit au cours de cette expérience, bien qu'il s'agisse d'un des métabolites importants du fentanyl.

La figure 3.8 illustre l'apparition du norfentanyl suite à l'expérience réalisée avec les microsomes. Elle est constituée de trois chromatogrammes superposés, tous générés avec la recherche d'un $[M + H]^+$ de 233,1654. Le chromatogramme inférieur représente un contrôle négatif, comprenant le fentanyl ainsi que les composantes du milieu d'incubation, mais excluant les microsomes. Celui du milieu correspond à un échantillon où le métabolisme s'est produit, tandis que le chromatogramme supérieur représente l'étalon combiné du laboratoire, contenant du norfentanyl et servant ici de contrôle positif.

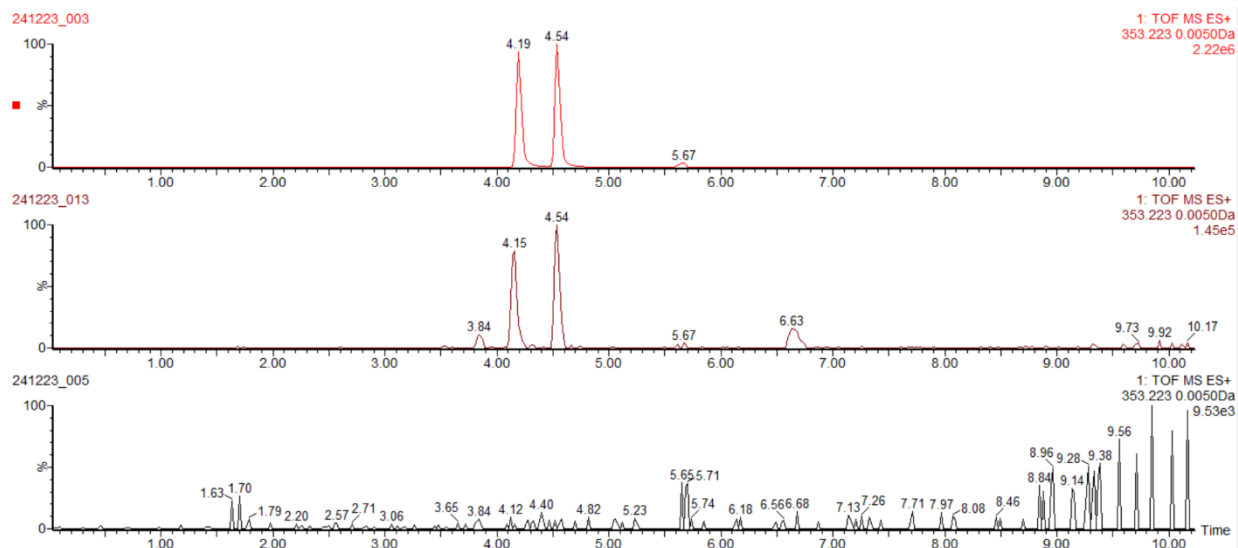
Figure 3.8 Superposition de chromatogrammes associés à un $[M + H]^+$ de 233,1654, présentant un contrôle négatif (bas), un échantillon avec métabolisme (centre) et un étalon combiné utilisé au laboratoire (haut)



La figure 3.8 démontre que l'expérience d'incubation du fentanyl avec les microsomes de foie humain a permis de produire le norfentanyl. Celui-ci ne se retrouve pas dans le contrôle négatif, ce qui indique que sa présence est due au processus de métabolisme *in vitro*. L'échantillon avec métabolisme a été comparé avec l'étalon combiné du laboratoire, contenant du norfentanyl. Cette comparaison permet d'identifier ce composé avec une confiance maximale, puisque les temps de rétention, les ratios isotopiques et les spectres de masse des deux pics concordent entre eux, notamment avec la présence du fragment caractéristique de 84,0813 retrouvé pour les deux pics.

La figure 3.9 démontre pour sa part l'apparition de différents signaux chromatographiques correspondant à un $[M + H]^+$ de 353,2229, suite à l'expérience avec les microsomes de foie humain. Une superposition de chromatogrammes a également été faite pour cette figure, avec un contrôle négatif (bas), un échantillon avec métabolisme (milieu) et l'étalon combiné du laboratoire contenant du β -hydroxyfentanyl (haut).

Figure 3.9 Superposition de chromatogrammes associés à un $[M + H]^+$ de 353,2229, présentant un contrôle négatif (bas), un échantillon avec métabolisme (centre) et un étalon combiné utilisé au laboratoire (haut)



Lors de la recherche d'un $[M + H]^+$ de 353,2229 dans l'échantillon post métabolisme *in vitro* (centre), plusieurs pics chromatographiques apparaissent. L'étalon combiné du laboratoire (haut) contient deux composés correspondant à cette valeur, le méthoxyacétylfentanyl (4,19 min) et le β -hydroxyfentanyl (4,54 min). Ce contrôle permet d'affirmer que du β -hydroxyfentanyl s'est formé au cours de cette expérience, grâce aux temps de rétention identiques et aux spectres de masse très similaires entre l'échantillon et le contrôle, incluant le même fragment caractéristique pour chacun des deux pics. Le pic à 4,15 minutes dans l'échantillon découlant de l'expérience pourrait laisser penser qu'il est relié au méthoxyacétylfentanyl retrouvé dans l'étalon combiné du laboratoire, mais plusieurs raisons amènent à la conclusion qu'il ne s'agit pas du même composé. Tout d'abord, la différence de temps de rétention est relativement élevée pour des échantillons provenant de la même séquence analytique. Ensuite, les spectres de masse des deux composés sont assez différents et le fragment caractéristique relié à un hydroxyfentanyl retrouvé dans le pic à 4,15 minutes de l'échantillon post incubation n'est pas retrouvé dans le pic à 4,19 minutes du contrôle. Un petit pic à 5,67 minutes est également commun entre l'échantillon et l'étalon combiné. Il ne semble pas être lié à un métabolite, puisque son signal ne varie pas selon le temps d'incubation. La nature de ce signal demeure inconnue. Les pics à 3,84 et 6,63 minutes pourraient potentiellement être reliés à des métabolites vu, entre autres, l'augmentation de leur signal selon le temps d'incubation.

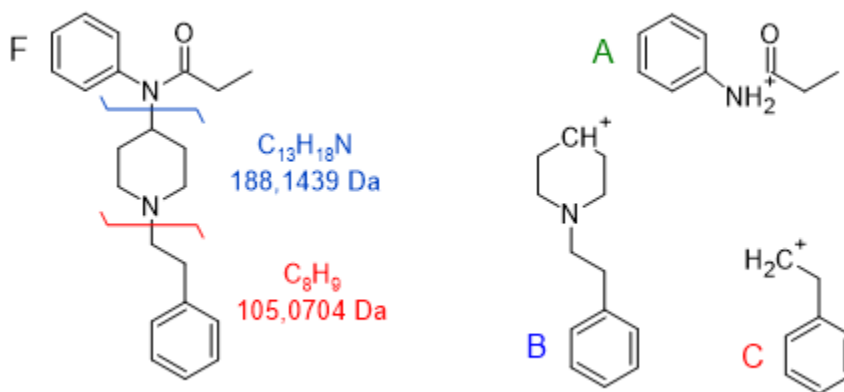
Le présent cas met en lumière les défis, mais aussi le potentiel de l'analyse non ciblée et du lot d'informations qui en découlent. De nombreux pics apparaissent et pourraient correspondre à des

métabolites distincts, plus précisément à différents types d'hydroxyfentanyl. La difficulté réside dans l'identification et la différenciation de ces composés en s'appuyant sur les informations disponibles. La sous-section suivante présentera une approche méthodologique visant à distinguer ces différents métabolites potentiels.

Tentative de différenciation des signaux ayant un $[M + H]^+$ de 353,2229.

Pour tenter de différencier les signaux reliés à un $[M + H]^+$ de 353,2229, correspondant potentiellement à un fentanyl hydroxylé, une recherche de fragments caractéristiques a été effectuée. Cette démarche s'est basée sur l'identification des fragments principaux du fentanyl afin de localiser l'endroit où le groupement hydroxy a pu être ajouté. La figure 3.10 met en évidence les fragments principaux du fentanyl présentés dans la littérature. Le processus a aussi été fait avec des outils de prédiction de fragmentation en ligne, mais aucune information n'a pu en être tirée.

Figure 3.10 Fragments principaux du fentanyl (F), selon la littérature (53)



Deux fragments principaux du fentanyl sont présentés dans la littérature, ayant des $[M + H]^+$ respectifs de 188,1439 (B) et 105,0704 (C). Le fragment A est tout de même démontré pour indiquer une autre section potentielle sur laquelle pourrait se trouver le groupement hydroxy, mais il ne semble pas répertorié dans la littérature. Le tableau 3.3 présente les valeurs de $[M + H]^+$ qui ont été recherchées dans les échantillons pour en tirer des informations.

Tableau 3.3 Valeurs théoriques des $[M + H]^+$ des trois différents fragments, avant et après une hydroxylation

Fragment	$[M + H]^+$ avant hydroxylation	$[M + H]^+$ après hydroxylation
A	142,0762	164,0712
B	188,1439	204,1388
C	105,0704	121,0653

Le tableau 3.4 présente les fragments caractéristiques qui ont été trouvés dans les échantillons de cette expérience pour chacun des métabolites présumés.

Tableau 3.4 Fragments trouvés pour les différents métabolites présumés

Métabolite	t_R (min)	Fragment retrouvé	Association
M2	3,84	188,1439	B sans hydroxylation
M3	4,15	204,1388	B après hydroxylation
M4 (β -Hydroxyfentanyl)	4,54	204,1388	B après hydroxylation
M5	6,66	-	-

Le $[M + H]^+$ de 204,1388 est cohérent pour le β -hydroxyfentanyl, puisque le groupement OH devrait effectivement se retrouver sur la section B de la molécule. Le signal pour le métabolite présumé M3 signifie que le groupement hydroxy serait aussi sur la partie B de la molécule, et non sur la A. Le fragment trouvé pour le métabolite présumé M2 signifie que le OH serait probablement sur la partie A, contrairement aux deux autres métabolites. Aucun signal n'a été trouvé permettant d'avancer que le groupement serait plus précisément sur la section C ou non pour le composé M3. Aucune donnée supplémentaire n'a été obtenue pour affiner davantage les hypothèses concernant l'emplacement du groupement hydroxy sur les composés M2 et M3.

Des recherches dans la littérature et avec des outils de simulation de fragmentation (CFM-ID, ChemsSketch) n'ont permis d'identifier aucun fragment caractéristique permettant d'obtenir un indice sur la nature du composé M5.

Cette sous-section met en lumière la complexité de l'identification de composés en analyse non ciblée, notamment lorsqu'ils partagent le même $[M + H]^+$. La difficulté à distinguer ces signaux souligne les limites des méthodes conventionnelles pour différencier des molécules aux structures potentiellement similaires.

Parmi les métabolites vraisemblablement produits au cours de cette expérience, le norfentanyl et le β -hydroxyfentanyl sont les deux seuls qui peuvent être formellement identifiés avec un niveau de confiance de 1, vu leur comparaison avec un étalon. Les métabolites M2 et M3, dont la masse exacte et le ratio isotopique concordent avec la littérature, ont également été liés à un fragment caractéristique suggérant un type d'hydroxyfentanyl. Ces éléments permettent de leur attribuer un niveau de confiance de 3. Le ratio isotopique du métabolite présumé M5 ne concorde pas parfaitement avec la formule chimique d'un hydroxyfentanyl. Aucun fragment caractéristique n'a pu lui être associé non plus. Le métabolite présumé M5 serait donc classé avec un niveau de confiance de 5 pour cette expérience.

Un des objectifs de cette partie du projet était de déterminer les meilleures conditions d'incubation, soit celles permettant d'identifier au minimum un métabolite, et dans l'idéal plusieurs pour chacune des substances mères. De plus, nous cherchions à obtenir un fragment caractéristique du métabolite avec une intensité suffisante pour renforcer la confiance dans son identification.

Les tableaux suivants indiqueront de façon qualitative la présence ou l'absence de différents métabolites et de leur fragment caractéristique dans tous les échantillons de l'expérience utilisant le fentanyl comme molécule mère. Aucune observation de la cinétique de manière semi-quantitative n'a été faite pour le fentanyl, contrairement au midazolam. Cela est dû au fait qu'il est plus complexe d'en tirer des conclusions pertinentes si on ne peut pas voir tous les métabolites du fentanyl et que cette cinétique ne serait pas aussi représentative que celle du midazolam, où le métabolisme de phase I complet a vraisemblablement été obtenu.

La prochaine section se concentrera sur les métabolites principaux du fentanyl et ses deux métabolites présumés dont des fragments caractéristiques ont été trouvés, puisque ce sont ceux qui seraient le plus portés à être utilisés au laboratoire. Le métabolite potentiel M5 a donc été omis dans les tableaux. Le

tableau 3.5 présentera les résultats pour les métabolites seulement, sans prendre en considération leurs fragments. Le tableau 3.6 se concentrera ensuite uniquement sur les fragments caractéristiques de ces quatre métabolites. L'intensité du signal de chacune des molécules observées a été comparée à la limite de détection, qui est définie comme une hauteur de pic équivalente à trois fois le niveau de bruit observé. Le même code a été utilisé pour les deux tableaux. Un métabolite ou un fragment a été considéré non visible lorsque son signal chromatographique était inférieur à la limite de détection et est marqué par le symbole ✕ dans le tableau. Le symbole LD a été utilisé dans le tableau lorsqu'un signal était tout juste à la limite de détection, ce qui indique que le composé serait présent mais qu'une réserve peut être conservée pour son identification. Le symbole ✓ a été utilisé dans le tableau pour un signal supérieur à la LD, qui permet de confirmer avec une certitude plus élevée la présence du métabolite ou du fragment.

Tableau 3.5 Classification qualitative de la détection de quatre métabolites créés lors de l'expérience de métabolisme du fentanyl.

	Norfentanyl (233,1654)			β -hydroxyfentanyl (353,2229)		
	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$
0 min	LD	x	x	x	x	x
15 min	✓	✓	✓	✓	✓	✓
30 min	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1 h	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1h30	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2h	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2h30	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3h	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	M2 (353,2229)			M3 (353,2229)		
	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$
0 min	x	x	x	x	x	x
15 min	✓	✓	x	✓	✓	x
30 min	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1 h	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1h30	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2h	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2h30	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3h	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Note : Les $[M + H]^+$ recherchés pour chacun des métabolites sont indiqués entre parenthèses.

Le tableau 3.5 présente des résultats semblables entre les quatre métabolites. Ils sont tous visibles de façon notable après seulement 15 minutes, à l'exception de la concentration initiale de substrat la plus élevée, qui a dû subir une dilution supérieure. La méthode semble efficace pour l'observation des métabolites, autant pour les métabolites majeurs (norfentanyl et β -hydroxyfentanyl) que pour les métabolites présumés formés en quantité beaucoup moins importante (M2 et M3).

Tableau 3.6 Classification qualitative de la détection des fragments caractéristiques de quatre métabolites créés lors de l'expérience de métabolisme du fentanyl.

	Norfentanyl (84,0813)			β-hydroxyfentanyl (204,1388)		
	1 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	1 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
0 min	x	x	x	x	x	x
15 min	LD	LD	x	LD	LD	x
30 min	✓	✓	x	LD	✓	x
1 h	✓	✓	x	✓	✓	LD
1h30	✓	✓	x	✓	✓	LD
2 h	✓	✓	x	✓	✓	LD
2h30	✓	✓	x	✓	✓	LD
3h	✓	✓	LD	✓	✓	LD
	M2 (188,1439)			M3 (204,1388)		
	1 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	1 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
0 min	x	x	x	x	x	x
15 min	x	x	x	✓	LD	x
30 min	x	LD	x	✓	LD	x
1 h	LD	✓	x	✓	✓	x
1h30	LD	✓	x	✓	✓	x
2h	LD	✓	x	✓	✓	x
2h30	✓	✓	x	✓	✓	LD
3h	✓	✓	LD	✓	✓	LD

Note : Les $[M + H]^+$ recherchés pour chacun des fragments sont indiqués entre parenthèses.

Comme il était logiquement attendu, les fragments caractéristiques sont moins facilement détectables que leur molécule mère. La variation de concentration initiale a un impact déterminant, comme en témoigne la perte de signal observée à des concentrations initiales de substrat plus élevées, due aux dilutions nécessaires. L'utilisation de concentrations de substrat aussi élevées dans cette méthode s'avère donc peu pertinente en raison de cette perte de signal pour les fragments. Pour observer de façon efficace les

fragments caractéristiques des métabolites principaux, une durée d'incubation de 1 heure serait suffisante. Cependant, afin de détecter les fragments d'un plus grand nombre de métabolites, une incubation prolongée de 2h30 ou 3 heures serait recommandée.

Pour conclure cette section, les résultats ont démontré qu'il peut être pertinent de tester plus d'une concentration initiale de substrat pour observer de façon préférentielle différents métabolites d'un xénobiotique. L'utilisation d'une concentration initiale de 30 µg/mL ne s'est pas avérée pertinente vu la trop grande dilution nécessaire pour l'analyse, qui fait perdre une trop grande proportion du signal des métabolites mineurs et de leurs fragments. Dans le cas où le but visé est d'observer les métabolites majeurs seulement et de maximiser la productivité, un temps d'incubation plus court peut être utilisé. Pour maximiser le nombre de métabolites et l'intensité de ceux-ci, il pourrait être pertinent de faire une expérience de 3h. Cette hypothèse demeure toutefois à vérifier, puisqu'il est également possible que le métabolisme se maximise après un certain temps et que certains métabolites soient transformés à leur tour, ce qui diminuerait leur signal dans les échantillons.

Dans une optique plus générale, la méthode utilisée s'est avérée efficace pour atteindre les objectifs qui étaient visés pour cette section. Plusieurs métabolites ont vraisemblablement été produits pour chacun des deux modèles et les variations de paramètres ont permis de tirer certaines conclusions pertinentes, comme le temps d'incubation nécessaire et l'intervalle de concentration initiale de substrat à utiliser selon les besoins. Il est important de noter que cet intervalle peut changer selon le composé à tester et son affinité avec les enzymes présentes dans les microsomes. La source de microsomes utilisée peut aussi avoir un impact sur les résultats et pourra nécessiter des paramètres différents, puisque les lots de microsomes contiennent souvent des ratios d'enzymes qui peuvent différer.

3.2 Adaptation de la chromatographie

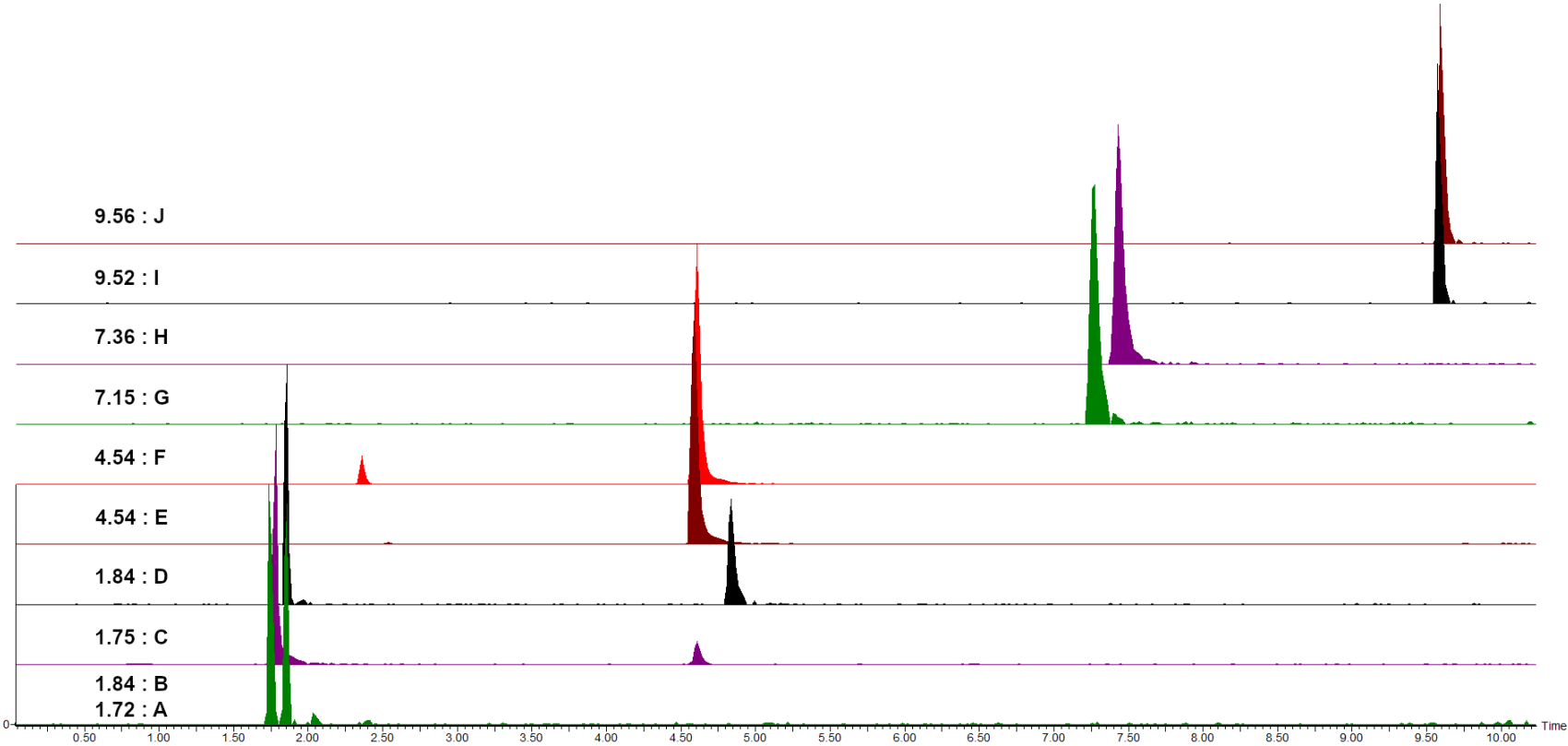
Afin de mesurer l'amélioration générale de la séparation suite à la modification de la méthode chromatographique initiale, dix composés issus de cette dernière ont été retenus en fonction de leur temps de rétention. La sélection visait à couvrir au mieux que possible l'ensemble de la durée de l'analyse. Quatre composés polaires ayant un court temps de rétention ont été choisis en raison de leur pertinence particulière pour la méthode développée. Les six autres composés ont été sélectionnés sous la forme de trois paires réparties sur le reste du chromatogramme, afin d'évaluer la résolution à différents moments de l'analyse. Pour simplifier l'identification des composés sur certaines des figures, une lettre a été assignée à chacun d'entre eux. Cette assignation ainsi que le $[M + H]^+$ associé sont présentés au tableau 3.7.

Tableau 3.7 Assignation des composés sélectionnés pour l'allongement de la chromatographie

Assignation	Nom du composé	$[M + H]^+$
A	Morphine	286,1443
B	Hydromorphone	286,1443
C	Anhydroecgonine Méthyl Ester	182,1181
D	Aténolol	267,1709
E	α -pyrrolidinovalérophénone	232,1701
F	Cocaïne	304,1549
G	Desméthylclozapine	313,1220
H	Clozapine	327,1376
I	Desméthylclomipramine	301,1472
J	Clomipramine	315,1628

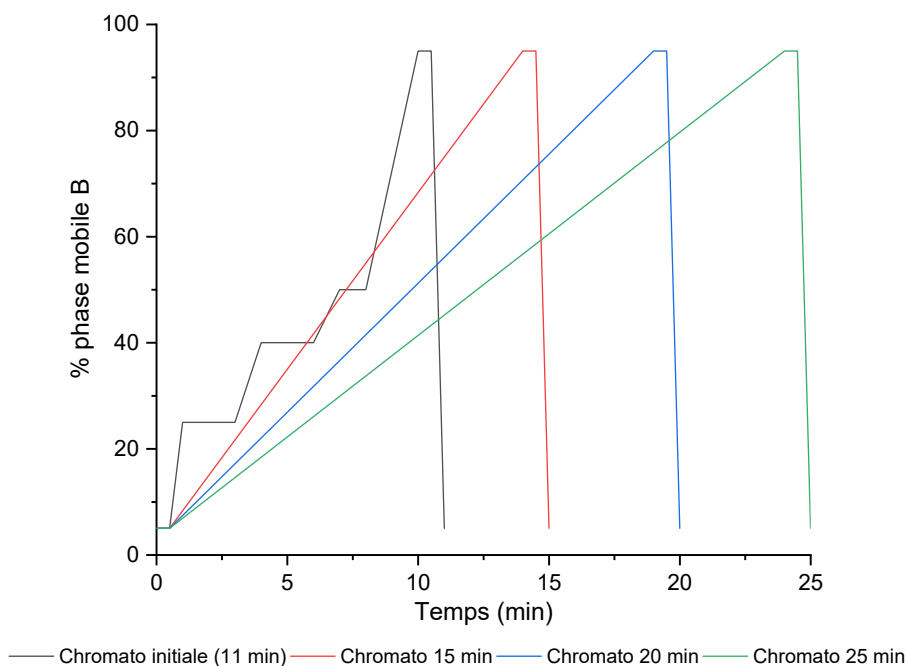
La figure 3.11 démontre la séparation suboptimale qu'apporte la chromatographie initiale aux dix composés sélectionnés. Les chromatogrammes respectifs des composés ont été superposés de façon décalée pour simplifier la visualisation. Les composés A et B se retrouvent dans le même chromatogramme puisqu'ils ont la même formule chimique et donc la même masse exacte. Les temps de rétention et les lettres associées sont indiquées sur la figure.

Figure 3.11 Séparation entre les composés sélectionnés avant l'allongement de la chromatographie



Pour procéder à l’allongement de la chromatographie, trois nouveaux gradients linéaires (15, 20 et 25 min) ont été testés et comparés avec le gradient initial (11 min). Les quatre gradients sont présentés à la figure 3.12.

Figure 3.12 Gradients testés pour l'allongement de la chromatographie

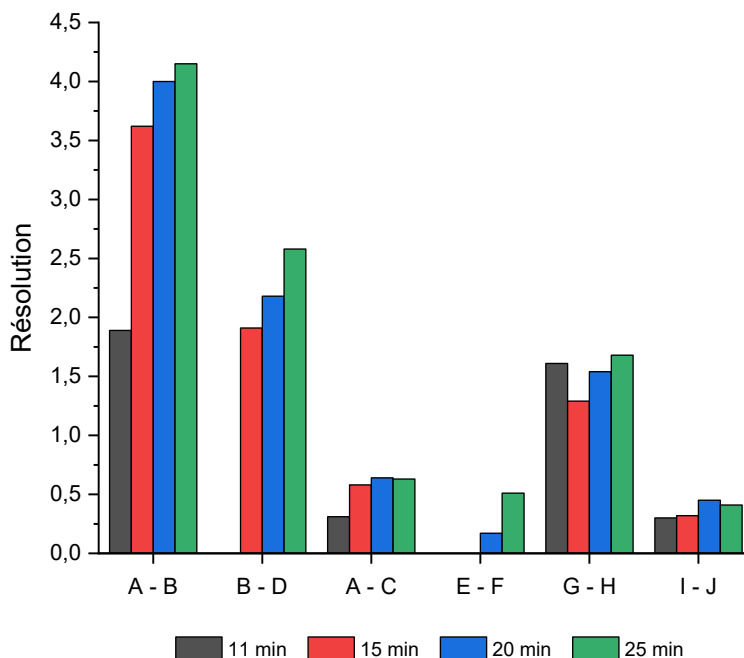


Pour analyser l’effet de l’allongement de la chromatographie, certains duos de composés ont été sélectionnés en se basant sur leur proximité, et la résolution a été calculée entre ceux-ci. Le tableau 3.9 et la figure 3.13 présentent la résolution calculée pour chaque duo de composés, pour chacune des quatre chromatographies. Chaque chromatographie a été analysée en triplicata, les résolutions présentées représentent donc les moyennes des résolutions de ces trois analyses.

Tableau 3.8 Résolution entre les composés sélectionnés selon les quatre chromatographies testées

Chromatographie	A – B	B – D	A - C	E - F	G - H	I - J
11 min	1,89	0,00	0,31	0,00	1,61	0,30
15 min	3,62	1,91	0,58	0,00	1,29	0,32
20 min	4,00	2,18	0,64	0,17	1,54	0,45
25 min	4,15	2,58	0,63	0,51	1,68	0,41

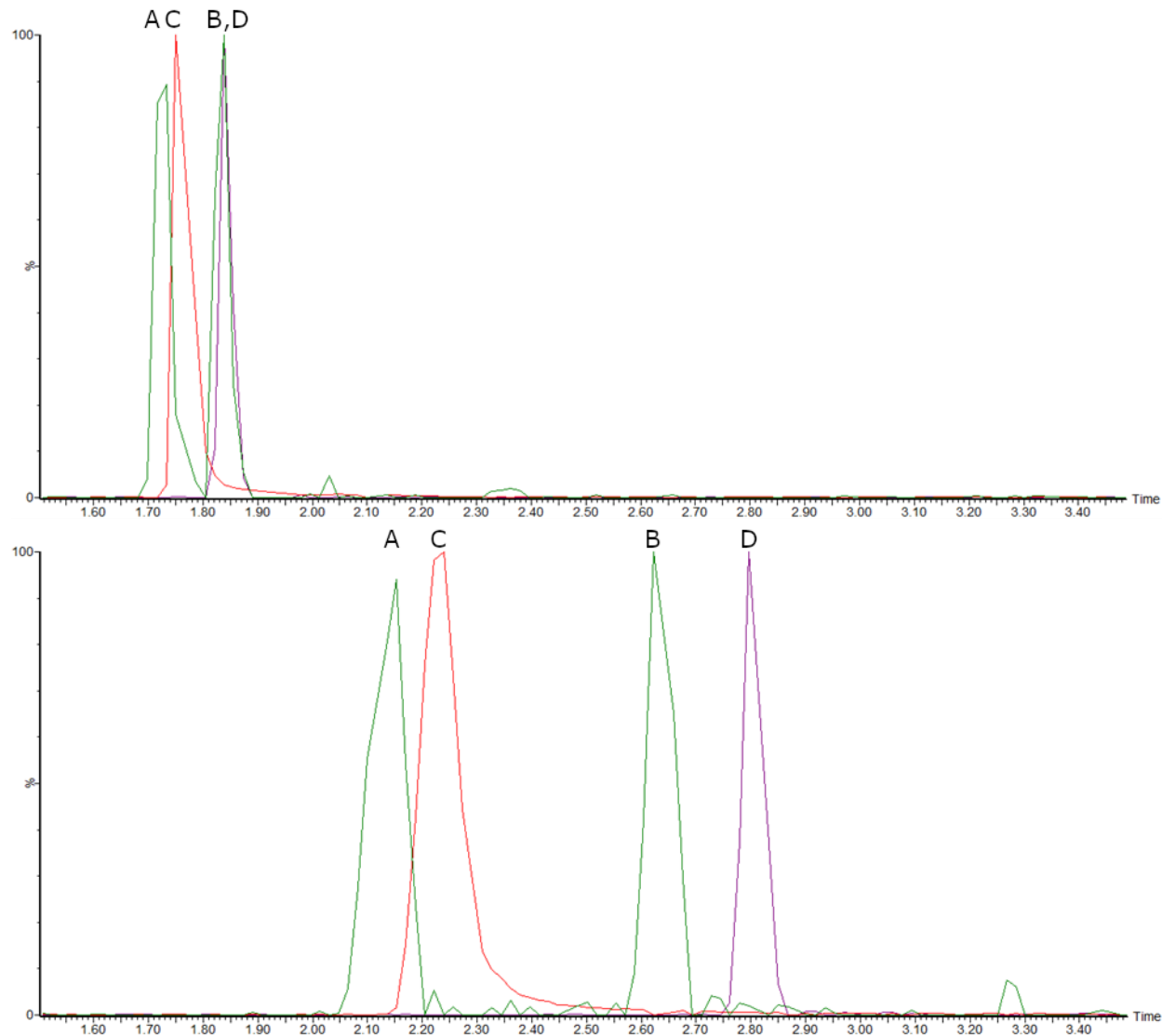
Figure 3.13 Résolution entre les composés sélectionnés selon les quatre chromatographies testées



La figure 3.13 démontre de façon plus visuelle l'efficacité de l'allongement de la chromatographie sur la résolution entre les composés sélectionnés. Elle permet de constater que l'augmentation de la résolution est inférieure pour les composés sortant plus tardivement dans la chromatographie (G à J). Par contre, les composés sortant dans la première moitié de la chromatographie initiale (A à F) subissent un effet positif de l'allongement de cette dernière.

Ces observations permettent d'avancer l'hypothèse que des métabolites, qui sont généralement des molécules plus polaires qui ont un temps de rétention plus court dans la méthode initiale, seraient avantagés par l'allongement de cette dernière. La figure 3.13 permet également de conclure que la chromatographie de quinze minutes amène une augmentation significative de la résolution pour les composés plus polaires comparativement à la méthode initiale, et que cette augmentation ne progresse pas de façon flagrante dans les chromatographies de 20 et 25 minutes. Comme les chromatographies plus courtes sont généralement préférées dans les laboratoires pour une question d'efficacité, la méthode de 15 minutes est jugée satisfaisante pour obtenir les résultats espérés. La figure 3.14 démontre la différence de séparation entre certains pics en début de chromatographie entre la chromatographie initiale (haut) et celle de quinze minutes (bas).

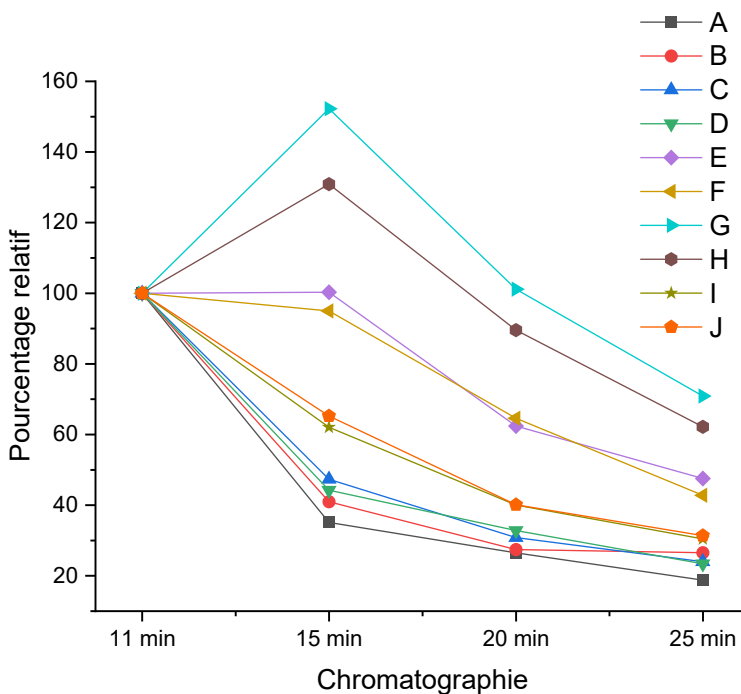
Figure 3.14 Chromatogrammes superposés des composés A à D, avec la chromatographie initiale (haut) et la chromatographie de quinze minutes (bas)



Comme il était attendu, l'allongement de la chromatographie a eu l'effet d'élargir les pics. Cet effet est normal, et n'aurait pas de conséquences majeures dans le contexte d'une analyse non quantitative comme il est question dans le cadre de ce projet. Cependant, un pic qui s'élargit va normalement subir par le fait même une diminution de sa hauteur maximale. Ce phénomène pourrait avoir des conséquences négatives dans le cas d'une analyse non ciblée, puisqu'un filtre de hauteur doit généralement être établi. Une molécule avec une sensibilité moins élevée pourrait donc ne pas être détectée, ou ne pas se démarquer suffisamment du bruit de fond pour faciliter l'analyse des données. Pour permettre de mieux visualiser la situation, une analyse de la diminution de la hauteur maximale des pics a été faite. La hauteur maximale

de chaque composé a été représentée comme un pourcentage relatif de la hauteur maximale du même composé dans la chromatographie initiale. Les résultats sont présentés à la figure 3.15.

Figure 3.15 Variation de la hauteur maximale (% relatif) des 10 composés, pour les quatre chromatographies testées



La figure 3.15 permet de constater qu'en utilisant la chromatographie de quinze minutes comparativement à la chromatographie initiale, deux phénomènes se produisent. Une grande diminution de la hauteur est observée pour les composés au début et à la fin de la chromatographie (A-D et I-J) lors de l'utilisation de celle de quinze minutes. Cette diminution du signal est amplifiée avec l'utilisation des chromatographies de vingt et vingt-cinq minutes. La hauteur maximale des composés au centre de la chromatographie (E-H) est stable ou augmente avec la chromatographie de quinze minutes, puis diminue à partir de celle de vingt minutes.

L'allongement de la chromatographie amène donc une grande perte de signal, qui est à considérer même si l'analyse n'est pas quantitative. Comme mentionné plus tôt, cette perte de signal amène un risque que certains composés soient difficilement détectés ou ne le soient pas du tout dans une analyse non ciblée. Ce risque augmente pour les composés ayant une faible sensibilité ou une faible concentration, ce qui est possible pour des métabolites qui ne sont pas majoritaires.

Un allongement de la chromatographie à quinze minutes serait donc le meilleur compromis entre les trois nouvelles chromatographies testées, puisqu'elle augmente la résolution de façon significative et qu'elle amène une perte de signal légèrement inférieure aux chromatographies de 20 et 25 minutes. Malgré la perte de signal importante occasionnée par la méthode chromatographique de 15 minutes, elle pourrait tout de même constituer une option favorable, en considérant les avantages qui résultent d'une séparation chromatographique accrue pour l'identification de nouveaux composés. L'injection d'un échantillon plus concentré pourrait permettre d'atténuer en partie cette diminution du signal.

3.3 Tri des données

Comme il a été mentionné dans la section 2.4, le but de cette partie du projet était d'identifier une stratégie permettant d'isoler une liste de *features* enrichie en métabolites créés *in vitro*, afin de réduire la complexité des données issues de l'analyse non ciblée et de faciliter l'investigation subséquente.

La méthodologie adoptée vise, dans un premier lieu, à diminuer au minimum la quantité de *features* non pertinents à l'étude en cours à l'aide d'un *workflow* composé d'étapes et de filtres précis. La deuxième étape consiste à soustraire un blanc à un échantillon ou un échantillon pré-métabolisme à un post-métabolisme. Le but théorique de cette seconde étape est que seuls les composés ajoutés, ou dans le cas ultime les composés apparus grâce au processus de métabolisme *in vitro*, restent. Dans une optique plus réaliste, le but visé est qu'un minimum de composés futiles soient présents après la soustraction.

Des tests ont tout d'abord été effectués à partir d'une solution pure dans laquelle des composés ont été ajoutés. Cela avait pour but d'évaluer rapidement et avec une plus grande facilité l'efficacité du processus dans des conditions quasi optimales, qui permettent logiquement de distinguer plus facilement les composés cibles. Des tests ont ensuite été réalisés avec des échantillons issus de l'expérience de métabolisme *in vitro* du midazolam, ce qui avait pour objectif de fournir une meilleure représentativité par rapport au type d'échantillons visé par ce projet, en travaillant avec une matrice identique. Cela a aussi permis de démontrer le type de travail requis avec ce type d'échantillons, caractérisé par des défis plus complexes en raison de la faible concentration attendue des composés cibles et de la densité plus élevée des candidats inconnus qui seront détectés.

Les termes composés cibles (CC) seront utilisés dans cette section pour parler des composés ajoutés en solution pure, ou des trois métabolites vraisemblablement créés au cours de l'expérience *in vitro* du midazolam. Les termes candidats inconnus (CI) désigneront pour leur part les *features* détectés dont la nature n'a pas encore été élucidée. Ces candidats inconnus, bien qu'ils ne fassent pas partie des composés cibles, pourraient potentiellement correspondre à des métabolites inattendus ou à d'autres composés d'intérêt, et seraient normalement inclus dans les étapes d'investigation subséquentes. Cette section du projet visait donc à détecter les composés cibles tout en affinant la liste de candidats inconnus qui seraient également sujets à une analyse, afin de réduire le volume total de données à explorer. Un tri sélectif a été tenté lorsqu'il en était possible, afin de permettre de centrer l'analyse sur les candidats inconnus les plus susceptibles de correspondre à des métabolites pertinents.

Logiquement, il était attendu que les tests en solution pure permettraient de détecter plus facilement tous les composés cibles, avec beaucoup moins d'ajustements nécessaires par rapport aux valeurs recommandées par MZmine. Il était également anticipé que la liste finale des *features* des échantillons en solution pure contiendrait beaucoup moins de candidats inconnus que celle des échantillons post-métabolisme, où les composés cibles sont en concentration plus faible et dans une matrice beaucoup plus chargée.

3.3.1 Solution pure

Le tableau 3.9 présente les dix composés qui ont été ajoutés à la solution utilisée pour les premiers tests de tri des données. Le temps de rétention (t_R) et le $[M + H]^+$ de chaque composé qui ont été identifiés par MZmine pour l'association ont également été indiqués dans le tableau.

Tableau 3.9 Composés ajoutés en solution pure pour les tests de tri des données

Composé	t_R (min)	$[M + H]^+$
Metformine	0,76	130,1093
Morphine	1,73	286,1443
Kétamine	3,60	238,0999
Cocaïne	4,57	304,1549
Mirtazapine	4,80	266,1657
Citalopram	6,86	325,1716
Clonazépam	8,08	316,0489
Nortriptyline	8,79	264,1752
Isotonitazène	9,03	411,2396
Fluoxétine	9,07	310,1419

Comme mentionné dans la section 2.4, les deux paramètres investigués qui seront présentés sont la hauteur minimale du *feature* et le nombre de scans consécutifs qui forment le pic associé à ce dernier. Ces paramètres ont été testés selon un plan factoriel à trois niveaux chacun, pour former un total de neuf conditions testées. Celles-ci sont identifiées par les lettres A à I et sont montrées au tableau 3.10.

Tableau 3.10 Combinaisons de paramètres testées en solution pure pour le tri des données

Scans \ Hauteur	Basse 1,2E4	Moyenne 2,5E4	Haute 5,0E4
3	A	B	C
4	D	E	F
5	G	H	I

Les valeurs de la hauteur minimale du pic et du nombre de scans consécutifs qui étaient à la base recommandées par le logiciel MZmine étaient respectivement de 5,0E4 et de 4.

Dans le but de minimiser le risque de perte de composés pertinents présentant un signal faible et pour vérifier l'impact de plus faibles signaux sur la sensibilité et la sélectivité des listes de *features*, deux hauteurs inférieures ont été testées. La hauteur de 1,2E4 a été sélectionnée comme valeur basse pour plusieurs raisons. Il s'agit du seuil où le signal devient suffisamment fort pour que l'appareil génère un pic mieux défini et identifie le $[M + H]^+$ relié au *feature* avec une plus grande fiabilité. À ce niveau, les pics se détachent suffisamment du bruit de fond, renforçant ainsi la confiance en leur présence et en leur identification. Tester cette valeur permet donc de voir son effet sur le nombre de CC et CI détectés au seuil de signal minimal acceptable pour la formation d'un *feature*.

La valeur moyenne de 2,5E4 a été choisie, car elle correspond à la médiane des hauteurs de *features* observées lorsque l'ensemble des *features* valides est pris en compte, soit ceux dépassant le seuil de 1,2E4. Dans ce type de recherche, il est indispensable de faire des choix pour réduire efficacement la quantité de *features* à investiguer, impliquant parfois l'élimination d'une part significative des données comme il est le cas ici. Finalement, le seuil de hauteur recommandé par MZmine a été choisi comme valeur maximale, non seulement en raison de sa recommandation, mais aussi parce qu'il inclut 25 % des *features* valides détectés à la valeur la plus basse, ce qui permet de réduire grandement le volume de données à traiter.

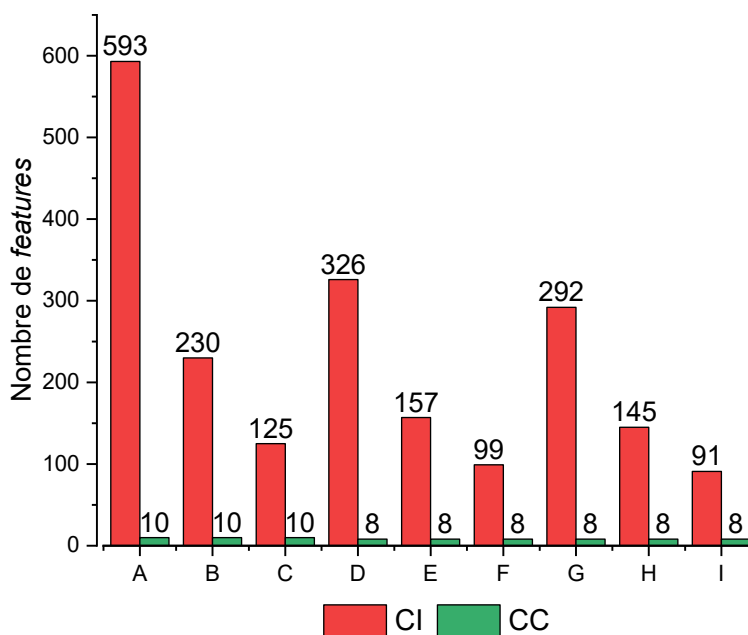
Le nombre de scans minimal recommandé par le laboratoire pour former un pic bien défini avec l'appareil analytique utilisé est généralement de 5. Cependant, l'analyse en mode MS^E réduit normalement le nombre de scans formant chaque pic, et il a été jugé pertinent de tester des valeurs inférieures pour ce

paramètre, soit de 4 et de 3, dans le but d'optimiser la détection des métabolites qui pourraient avoir des signaux plus faibles.

Les hypothèses attendues sont que le seuil de 5 scans risque d'être trop élevé et qu'il pourrait occasionner une perte de composés parmi les dix attendus. Il est possible qu'il soit nécessaire de descendre le nombre de scans à 3 ou 4 pour tous les observer. Au niveau de la hauteur minimale du *feature*, il est attendu qu'un grand nombre de candidats inconnus seront présents à la limite inférieure choisie qui est de $1,2E4$, puisque presque tous les composés se démarquant du bruit de fond seront inclus. Des composés cibles seront peut-être perdus à la hauteur la plus élevée, soit celle proposée par le logiciel, mais les candidats inconnus devraient diminuer de façon considérable.

La figure 3.16 présente le nombre de candidats inconnus (CI) et de composés cibles (CC) obtenus pour chacune des neuf conditions testées.

Figure 3.16 Candidats inconnus (CI) et composés cibles (CC) détectés par MZmine pour les conditions A à I testées en solution pure



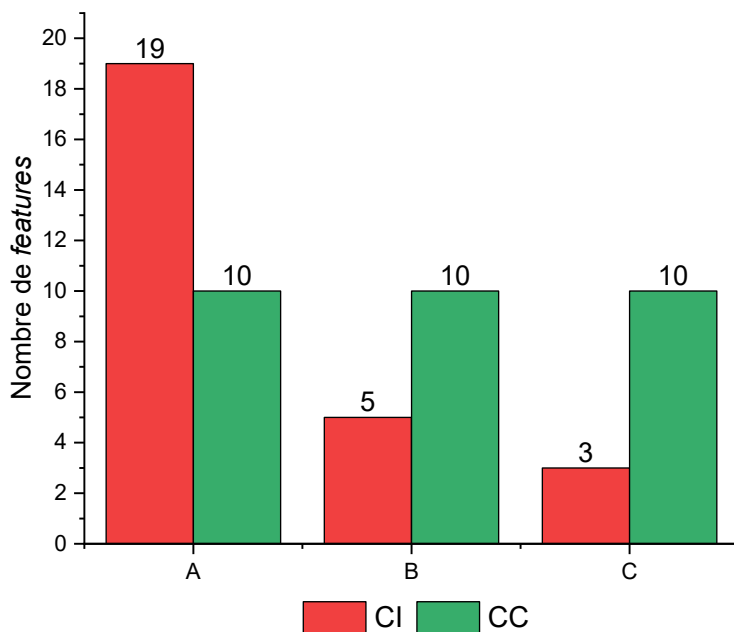
Cette figure démontre que l'utilisation d'un filtre requérant un minimum de 4 ou 5 scans consécutifs pour la formation d'un *feature* fait en sorte que tous les composés cibles ne sont pas identifiés par le logiciel. Deux composés (la metformine et la morphine) sur les dix intégrés dans la solution ne sont pas reconnus,

ce qui peut être expliqué par leur sensibilité plus faible que les huit autres composés. Cette figure confirme l'hypothèse qu'avec la méthode analytique utilisée, il est préférable d'utiliser un nombre de scans de 3. Pour les trois conditions associées à ce nombre de scans, tous les composés cibles sont détectés, ce qui implique qu'ils sont tous inclus avec le seuil de hauteur le plus élevé. Il est important de noter que l'utilisation d'un nombre réduit de scans consécutifs aura pour impact de favoriser la détection d'un plus grand nombre de composés, ce qui se traduira par un volume plus élevé de candidats inconnus à investiguer.

La figure suivante montre les composés cibles et les candidats inconnus restants après la soustraction du blanc. Les combinaisons de paramètres D à I n'ont pas été incluses dans cette figure, puisqu'il a déjà été démontré qu'un filtre de 3 scans consécutifs était nécessaire pour inclure tous les composés cibles et qu'il n'était donc pas pertinent de poursuivre avec l'étape de soustraction pour ceux-ci. Les trois conditions restantes ont été testées pour vérifier que l'effet de la soustraction sur la proportion de candidats inconnus restants est constant à différentes sensibilités.

Le but de la soustraction est d'évaluer son efficacité sur la diminution des candidats inconnus et de vérifier si elle occasionne une perte de composés cibles.

Figure 3.17 Candidats inconnus (CI) et composés cibles (CC) restants après la soustraction du blanc pour les conditions A à C.



Le graphique à barres démontre que la soustraction du blanc amène une grande diminution des candidats inconnus et n'affecte pas de façon négative le nombre de composés cibles détectés, comme il était espéré. Le tableau suivant présente les pourcentages de diminution des candidats inconnus pour chacune des trois conditions testées et a pour but de visualiser plus facilement la constance de l'effet de la soustraction pour différentes sensibilités.

Tableau 3.11 Pourcentages de diminution des candidats inconnus (CI) après la soustraction du blanc pour les conditions A à C

A 1,2E4	B 2,5E4	C 5,0E4
96,8 %	97,8 %	97,6 %

La soustraction s'est avérée efficace de façon constante à toutes les hauteurs de signal, avec une proportion de candidats inconnus retirés de la liste presque identique pour les trois conditions. Cette valeur est très élevée, soit de 96,8 % à 97,8 % de candidats inconnus enlevés. Seulement trois candidats inconnus sont restants en plus des composés cibles après la soustraction à la hauteur la plus élevée, ce qui constitue une charge de travail tout à fait raisonnable pour une investigation subséquente.

Les résultats de ces tests se sont révélés globalement satisfaisants. Il faut par contre se rappeler qu'ils ont été réalisés à partir d'échantillons en solution pure, dans des conditions quasi optimales. Il est attendu que la tâche devrait être plus complexe avec des échantillons post-métabolisme. Cette hypothèse sera testée dans la prochaine sous-section.

3.3.2 Échantillons avec métabolisme

Le tableau 3.13 fait un rappel sur les trois métabolites qui ont vraisemblablement été produits au cours de l'expérience d'incubation du midazolam avec les microsomes de foie humain. Le but de cette présente sous-section était de déterminer les conditions dans lesquelles les métabolites étaient inclus dans la liste de *features* tout en diminuant le nombre de candidats inconnus à investiguer. Le temps de rétention (t_R) et le $[M + H]^+$ de chaque métabolite présumé qui ont été identifiés par MZmine pour l'association ont également été indiqués dans le tableau.

Tableau 3.12 Métabolites attendus dans les tests de tri des données réalisés avec des échantillons post-métabolisme *in vitro* du midazolam

Composé	t _R (min)	[M + H] ⁺
1'-Hydroxymidazolam	8,89	342,0809
4-Hydroxymidazolam	7,67	342,0809
1',4-Dihydroxymidazolam	7,33	358,0758

Les tests effectués précédemment en solution pure ont permis de constater une perte de certains composés cibles lors de l'utilisation d'un nombre de scans consécutifs minimal de 4 ou 5 pour la détection d'un *feature*. Le fait que des composés présents en concentration élevée n'ont pas été détectés suggère que, dans une expérience de métabolisme *in vitro* où les signaux sont généralement plus faibles, un seuil supérieur à 3 scans risquerait de compromettre la détection de métabolites d'intérêt. Pour cette raison, il a été jugé non pertinent de tester une valeur de scans consécutifs supérieure à 3 pour les tests avec les échantillons post-métabolisme *in vitro*.

Un seul paramètre a donc subi des variations pour ces tests, soit la hauteur minimale du *feature*. Trois niveaux ont été évalués, pour former un total de trois conditions qui sont identifiées par les lettres A à C. Ces dernières sont présentées dans le tableau 3.14.

Tableau 3.13 Conditions testées avec les échantillons résultant de l'expérience de métabolisme *in vitro* du midazolam

Hauteur minimale du <i>feature</i>	Basse 1,2E4	Moyenne 2,5E4	Haute 5,0E4
	A	B	C

Pour ces essais, les mêmes valeurs de hauteur que pour le test d'échantillon en solution pure ont été conservées. Il se trouve que la valeur de seuil bas correspondait également à celle observée dans les échantillons issus de l'expérience de métabolisme *in vitro*. De plus, la médiane des hauteurs de *features* ainsi que la valeur élevée au ¾ des données se sont révélées égales pour les deux types d'échantillons, bien que leurs distributions diffèrent.

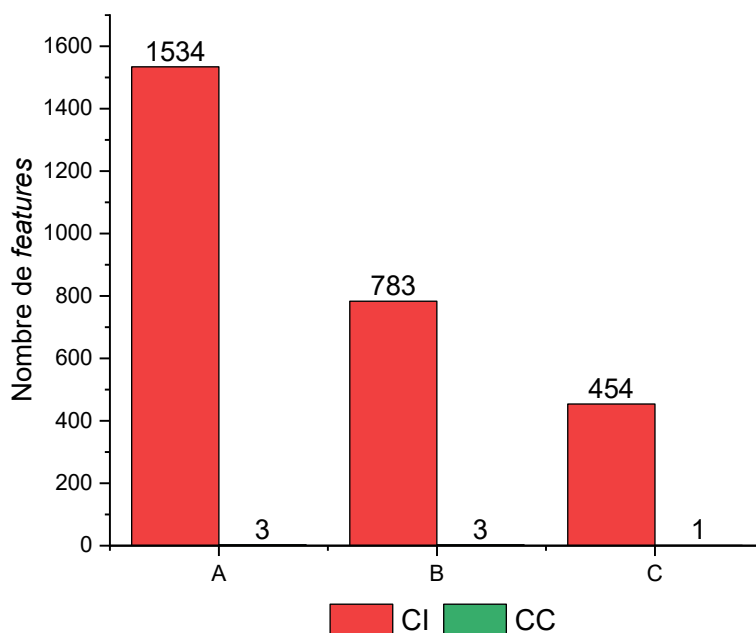
Contrairement aux tests en solution pure, où un unique échantillon a été utilisé, deux échantillons résultant de l'expérience de métabolisme *in vitro* du midazolam ont été combinés ici. MZmine a d'abord généré des *features* individuels pour chacun, puis a procédé à l'alignement des *features* correspondants entre les deux, permettant ainsi de construire une liste finale intégrant les composés retrouvés dans les deux échantillons ainsi que ceux détectés uniquement dans l'un des deux.

Les échantillons qui ont été sélectionnés maximisent, une fois combinés, chacun des trois métabolites analysés. L'un des deux échantillons est celui pour lequel le signal du 1'-hydroxymidazolam et du 1',4-dihydroxymidazolam sont les plus élevés et l'autre est celui dans lequel le signal maximal de 4-hydroxymidazolam a été observé. Dans le cadre d'une expérience de métabolisme *in vitro* réellement non ciblée, il peut être avantageux de combiner des échantillons comme il a été fait ici. Si la nature des métabolites attendus et celle des échantillons dans lesquels leur signal est maximisé ne sont pas connues, il peut être stratégique de combiner des échantillons issus de concentrations de substrat de départ différentes, privilégiant potentiellement la formation de différents métabolites, et ayant également subi un temps d'incubation prolongé. Il est cependant important de noter que la combinaison de plusieurs échantillons engendrera logiquement un plus grand nombre de *features* à trier et à investiguer.

Une hypothèse pour le test des conditions présentées au tableau 3.14 est que les trois métabolites ne seront peut-être pas tous détectés à la valeur de hauteur la plus élevée, contrairement aux composés en solution pure qui avaient un signal élevé. Il est attendu que beaucoup de candidats inconnus apparaîtront à la limite inférieure et qu'à tous les seuils de hauteur ils seront présents en quantité plus élevée qu'en solution pure.

La figure 3.18 présente le nombre de candidats inconnus (CI) et de composés cibles (CC) obtenus pour les trois conditions testées.

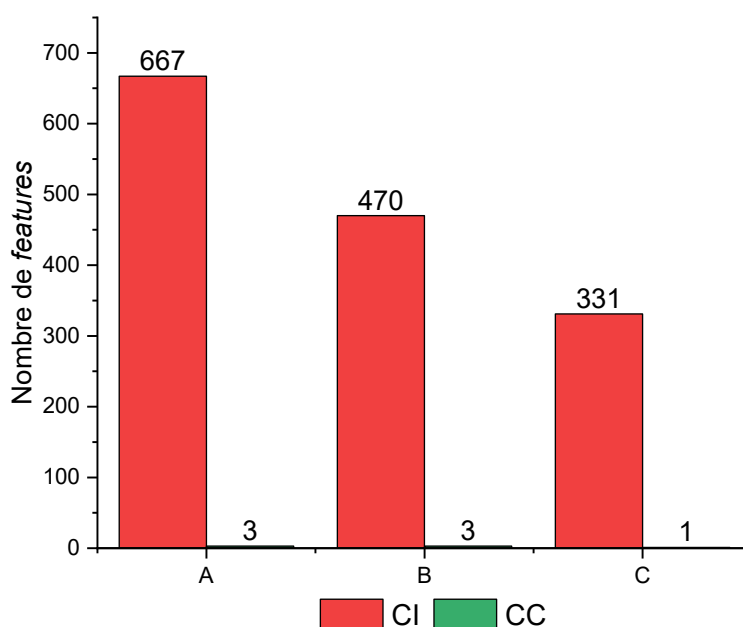
Figure 3.18 Candidats inconnus (CI) et composés cibles (CC) détectés par MZmine pour les conditions A à C testées avec les échantillons post métabolisme *in vitro* du midazolam



Cette figure permet de constater qu'une grande quantité de candidats inconnus sont présents avant la soustraction, ce qui est cohérent puisque ces tests combinent plusieurs échantillons et que ceux-ci contiennent logiquement beaucoup plus de composés qu'en solution pure. Au seuil de hauteur le plus élevé (C), seul le 1'-hydroxymidazolam, qui est le métabolite majoritaire, est détecté. Ce résultat peut s'expliquer par sa production nettement plus abondante dans les échantillons, comparativement aux deux autres métabolites. Les trois métabolites du midazolam sont détectés aux seuils bas (A) et moyen (B).

L'échantillon qui a été utilisé pour la soustraction des *features* dans ce test est le contrôle négatif produit lors de l'expérience de métabolisme *in vitro* du midazolam. Ce dernier contenait le midazolam ainsi que toutes les composantes du milieu d'incubation, à l'exception des microsomes, ce qui empêchait la formation de métabolites. Avec cette soustraction, il est attendu que seuls les composés produits lors de l'incubation du midazolam devraient rester, ce qui inclut les métabolites. La figure suivante démontre l'effet de la soustraction de ce contrôle négatif sur les composés cibles et les candidats inconnus restants pour chacune des conditions A à C.

Figure 3.19 Candidats inconnus (CI) et composés cibles (CC) restants après la soustraction du contrôle négatif pour les conditions A à C.



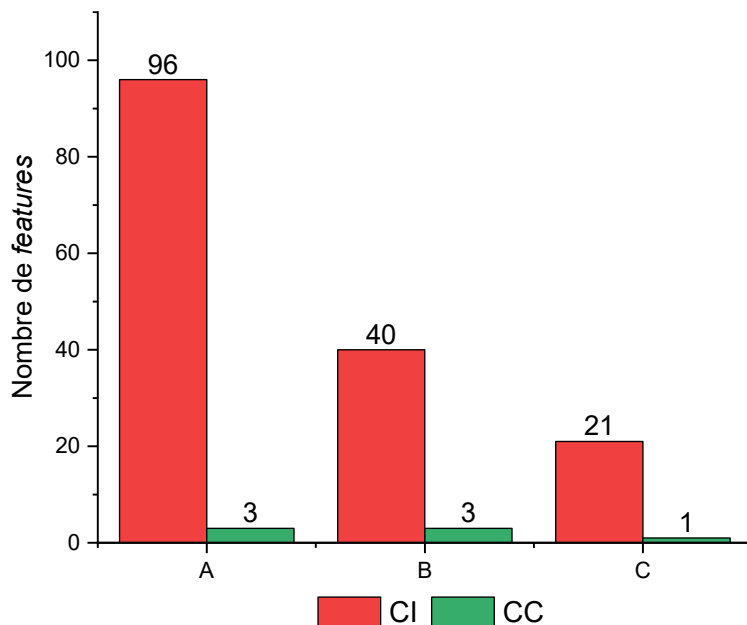
Une réduction des candidats inconnus est observable après la soustraction du contrôle négatif. Cependant, un grand nombre de candidats inconnus demeurent, et la quantité de données à investiguer reste trop importante après cette étape. Une observation des candidats inconnus restants a été effectuée pour déterminer quel ajustement des filtres serait adapté pour diminuer la quantité de *features* potentiellement non pertinents dans les échantillons traités. Dans ce type de test, l'observation des données est primordiale afin d'adapter le processus de tri selon les échantillons et les besoins spécifiques du cas analysé.

L'évaluation des données a permis de constater qu'une très grande majorité des *features* ont un temps de rétention inférieur à 1 minute. La soustraction du contrôle négatif n'a pas enlevé ces composés. La raison exacte derrière la présence et la proportion occupée par ces composés est inconnue. Cela peut potentiellement être expliqué par le type de composés qui étaient initialement présents dans le mélange réactionnel, qui auraient subi une dégradation ou un réarrangement durant l'incubation, ou encore certains qui se seraient créés durant cette dernière, qui seraient particulièrement hydrophiles et qui auraient donc un temps de rétention très court.

La décision d'appliquer un filtre supplémentaire pour retirer les *features* ayant un temps de rétention de 1 minute et moins a été prise, dans le but de voir si ce filtre allait rendre la quantité de candidats inconnus à investiguer plus approchable. Dans ce type de traitement de données, il peut être nécessaire de prendre de telles décisions afin de diminuer la charge de travail et de rendre les étapes suivantes réalisables. Il est important de noter que cela constitue une prise de risque de perdre des composés pertinents tels que des métabolites. Dans le cas présent, le risque a été pris parce que le temps de rétention élevé du midazolam (8,95 min) rendrait peu probable l'apparition de ses métabolites avant 1 minute, dans une optique où les temps de rétention de ces derniers ne seraient pas connus. Cela constituerait donc une prise de risque toujours présente, mais relativement faible. L'analyse non ciblée de données de haute résolution requiert une approche adaptée et cette situation illustre bien le type de démarche expérimentale qu'il peut être nécessaire de faire afin de faciliter l'identification des composés d'intérêt.

La figure suivante démontre l'effet de la soustraction du contrôle négatif combinée avec le filtre de temps de rétention sur le nombre de candidats inconnus (CI) et composés cibles (CC) restants.

Figure 3.20 Candidats inconnus (CI) et composés cibles (CC) restants après la soustraction du contrôle négatif combinée à l'application du filtre de temps de rétention pour les conditions A à C.



L'application du filtre de temps de rétention a engendré une très grande diminution des candidats inconnus. La tentative s'est donc avérée concluante, ce qui souligne l'importance d'observer les données pour les filtrer et les traiter de façon efficace.

Le tableau ci-dessous démontre en pourcentages la diminution des candidats inconnus pour chacun des trois seuils de hauteur, pour les deux tests effectués, soit avec la soustraction du contrôle négatif seulement et la soustraction combinée au filtre de temps de rétention.

Tableau 3.14 Pourcentages de diminution des candidats inconnus pour les conditions A à C, après la soustraction du blanc seule et la soustraction du blanc combinée au filtre de temps de rétention.

Test \ Conditions	A	B	C
Soustraction	56,52 %	39,97 %	27,09 %
Soustraction + Filtre t_R	93,74 %	94,89 %	95,37 %

Les résultats du tableau 3.15 permettent de visualiser de façon claire que la combinaison de la soustraction du contrôle négatif et du filtre de temps de rétention s'est avérée très efficace pour diminuer la quantité de candidats inconnus à investiguer, contrairement à l'usage de la soustraction seulement. Cela souligne l'importance d'inspecter les données pour choisir un traitement adapté selon le cas. La soustraction du contrôle négatif à elle seule ne crée pas un effet constant au niveau du pourcentage de diminution des candidats inconnus entre les seuils de hauteur, alors que la soustraction combinée au filtre de temps de rétention semble permettre de balancer l'effet entre les trois conditions.

Le seuil de hauteur maximal permet uniquement d'inclure le métabolite principal, le 1'-hydroxymidazolam, dans la liste de *features*, vu sa concentration largement supérieure par rapport aux deux autres métabolites. Le seuil moyen, qui inclut 50 % des données détectables, permet de visualiser les trois métabolites, et nous laisse avec un nombre final de candidats inconnus relativement gérable. Après la soustraction du contrôle et l'application du filtre de temps de rétention, l'observation des *features* restants n'a pas laissé suggérer qu'un filtre ou une étape supplémentaire serait pertinente, puisque la liste ne contenait pas de valeurs aberrantes ou sortant visiblement du lot.

Les filtres et paramètres généraux établis au cours des tests avec MZmine se sont révélés globalement efficaces. Ils ont permis d'optimiser la détection des composés cibles tout en réduisant efficacement les candidats inconnus, aboutissant à une quantité de *features* plus exploitable pour poursuivre l'investigation des données en non ciblé. Lors de l'analyse de données résultant d'une expérience de métabolisme *in vitro*, il semble préférable d'utiliser un nombre de scans consécutifs de 3 pour la formation des *features* si la méthode analytique présentée à la section 2.2 est utilisée. Une valeur de hauteur médiane sélectionnée selon le niveau de bruit de fond des échantillons observés se révèle être un bon compromis pour détecter des métabolites et tout en diminuant une grande proportion des candidats totaux à investiguer. Les tests réalisés dans cette partie du projet ont cependant révélé que bien que la détermination de valeurs générales représente une étape pertinente et importante, un ajustement spécifique peut parfois s'avérer nécessaire selon le cas et les échantillons analysés.

L'ensemble des paramètres constituant la méthode complète de traitement de données effectuée avec MZmine, ainsi que les valeurs définies pour chacun, sont présentés en Annexe A à titre informatif. Comme mentionné dans la section 2.4, le logiciel recommandait des valeurs en fonction de la méthode analytique utilisée, soit UPLC-QToF-DIA dans le cadre de ce projet. Ces valeurs ont toutes été testées et la très grande majorité de celles-ci s'est révélée bien adaptée pour les analyses visées, n'ayant pas d'incidence visible sur le nombre de composés cibles et de candidats inconnus détectés.

Les objectifs visés dans cette section ont globalement été atteints. Autant les tests en solution pure que ceux en matrice plus complexe ont permis de détecter les composés attendus. Les paramètres et étapes choisis pour la démonstration dans cette section ont effectivement une incidence sur l'efficacité du tri des données, autant dans la détection ou non des composés cibles que dans l'efficacité de la réduction des candidats inconnus.

Des ajustements ont pu être faits plus aisément dans ce cas-ci puisque les composés attendus étaient connus, ce qui a influencé les étapes effectuées. Dans un cas où la nature des métabolites serait inconnue, le risque de ne pas les détecter dû à des filtres ou des étapes spécifiques ne peut pas être complètement évité. La prise de décisions est tout de même primordiale pour obtenir une liste de *features* exploitable. L'observation des données et la considération du cas étudié peut optimiser la filtration efficace de la liste de *features*, permettant de diminuer le nombre total de composés à investiguer tout en minimisant le risque de perte de métabolites.

Le retrait des *features* ayant un temps de rétention égal ou inférieur à 1 minute qui a été fait dans cette section, en considérant le temps de rétention élevé de la molécule mère, est un bon exemple du type d'ajustement qui peut être effectué selon la tendance des données observées. Le type d'expérience de métabolisme *in vitro* visé par ce projet nécessite un étalon pour la molécule mère, et le temps de rétention de cette dernière pourrait tout de même être utilisé pour filtrer les données, même si son métabolisme est inconnu. Il est cependant important de noter que ce type de matrice contiendra probablement souvent une majorité de composés sortant très tôt dans la chromatographie et qu'une molécule mère ayant un temps de rétention très court entraînera probablement une analyse et un tri des données plus complexes.

3.4 Discussion Générale

Ce projet de maîtrise a contribué de façon importante à l'avancement d'une méthode permettant de prévoir la biotransformation de nouvelles substances psychoactives pour faciliter leur identification future dans des échantillons biologiques. Les connaissances acquises et les expérimentations réalisées ont permis d'identifier des outils et méthodes qui, une fois combinés, offrent un grand potentiel pour atteindre le but général visé par le CTQ. Malgré les avancées importantes réalisées, la complexité du sujet laisse plusieurs pistes à explorer en vue d'améliorer et d'optimiser le processus.

Les expériences de métabolisme *in vitro* effectuées ont permis de générer plusieurs métabolites pour chacun des modèles testés. Elles ont également mis en lumière certains paramètres ayant une forte influence sur les résultats, tels que la concentration initiale en substrat et le temps d'incubation. L'effet de la concentration initiale du substrat sur la nature des métabolites générés semble peu documenté dans la littérature. Ce projet constitue donc une avancée à ce niveau, puisque les résultats démontrent que la formation de certains métabolites est favorisée par certaines proportions de substrat par rapport à la quantité d'enzymes utilisée. Le protocole utilisé a un grand potentiel pour être adopté dans le futur par le CTQ. Il est cependant important de considérer que les tests ont été réalisés dans des conditions qui pourraient être considérées comme optimales, où le métabolisme presque entier d'une drogue était réalisé par une seule isoenzyme, soit la CYP3A4. Il ne s'agit pas d'une situation qui est représentative de toutes les NSP, puisque plusieurs isoenzymes peuvent être responsables du métabolisme d'une substance. Le protocole vise ultimement à être utilisé sur des NSP dont le métabolisme et les enzymes qui en sont responsables n'ont pas été élucidés. Dans ce cas, il pourrait être nécessaire de réaliser l'expérience avec plusieurs sources de microsomes dont le contenu en enzymes varie.

Ce projet se concentrait également sur un cas où une drogue pure aurait été consommée, il ne tenait pas en compte la polyconsommation ou la prise d'une drogue mélangée à d'autres. La consommation simultanée de plusieurs substances psychoactives peut influencer les métabolites observés, notamment dans le cas d'une compétition entre composés pour les mêmes enzymes métaboliques. Il est donc possible que les métabolites attendus pour une NSP ne soient pas visibles dans le spécimen d'une personne l'ayant consommée. Ce problème peut malheureusement être difficile à contourner en raison de sa complexité due à la multitude de réactions métaboliques et de mélanges de substances possibles. Il pourrait tout de même être intéressant de réaliser des tests avec plusieurs substrats dans une même incubation, afin d'observer les effets d'une potentielle compétition enzymatique.

L'adaptation de la méthode chromatographique initiale s'est avérée efficace pour atteindre le but visé, qui était d'améliorer la résolution entre les composés plus hydrophiles. Cette meilleure séparation pourrait constituer un avantage notable pour l'analyse de métabolites inconnus, en permettant une meilleure discrimination de ceux-ci lors du traitement des données non ciblées. Les résultats ont cependant démontré que l'allongement de la chromatographie engendrait une importante baisse de signal due à l'élargissement des pics. L'hypothèse que cette baisse de signal pourrait nuire à la détection de certains composés d'intérêt lors du traitement des données non ciblées a été posée. Une perspective future serait de tester l'impact de cette diminution de signal avec la méthode de traitement et de tri des données qui a été déterminée au cours de ce projet, avec des échantillons de composition connue et d'autres découlant d'expériences *in vitro*.

La méthode qui a été établie au cours de ce projet pour le prétraitement et le tri des données de haute résolution a démontré son efficacité, et présente un grand potentiel pour être intégrée à une démarche plus complète qui inclurait des stratégies d'annotation et d'identification des *features*. La méthode envisagée, soit la soustraction d'un échantillon pré-incubation, combinée aux différentes étapes et aux paramètres du processus de prétraitement, a permis de détecter efficacement les métabolites et de les isoler de manière satisfaisante. L'établissement d'une méthode efficace de tri des *features* permet de se tourner vers une prochaine étape, soit la tentative d'identification de ceux-ci. Une perspective intéressante serait d'explorer plus concrètement le potentiel du logiciel SIRIUS et des outils en accès libre pour l'identification des métabolites créés *in vitro*.

Ce projet visait à la base réaliser certains tests expérimentaux supplémentaires. Plusieurs raisons expliquent pourquoi davantage de tests n'ont pas été effectués. Tout d'abord, il est important de considérer que ce projet d'une complexité importante, qui était sans précédent au laboratoire et en émergence au Québec en général, nécessitait une quantité de recherches très élevée pour en établir les bases, et ce, sur tous les volets impliqués.

L'adoption d'une méthode de métabolisme *in vitro* au laboratoire a nécessité d'étudier et de comprendre les différents modèles disponibles et ce qu'ils impliquent, et de réviser un grand nombre de protocoles pour identifier les réactifs et conditions essentiels au bon fonctionnement du processus. Comme il a été mentionné dans ce mémoire, la source de microsomes qui a été choisie présentait un contenu en enzymes assez faible, à l'exception de la CYP3A4. Ce type de situation peut se produire avec les connaissances

initiales restreintes associées à un projet en émergence. Elle a toutefois limité les substrats disponibles à ceux qui sont majoritairement métabolisés par l'enzyme CYP3A4. Nous avons commandé différentes sources de microsomes pour tester leur effet sur des substrats au métabolisme plus complexe, dirigé par plusieurs enzymes du CYP450, mais des circonstances hors de notre contrôle ont empêché leur réception dans les délais prévus. Il serait donc intéressant, lorsque les ressources nécessaires seront disponibles, d'appliquer la méthode développée au cours de ce projet sur des substrats au métabolisme plus complexe.

Établir un processus pour prétraiter les données de haute résolution et permettre l'émergence des métabolites créés *in vitro* a aussi exigé beaucoup de travail. L'analyse non ciblée était initialement très peu utilisée au laboratoire et les recherches effectuées ont permis de trouver des outils et des façons de procéder pour arriver au but visé. Comme il a été mentionné, beaucoup d'efforts ont été mis sur presque l'entièreté de la durée du projet pour tenter de traiter les données de façon efficace et de procéder à une soustraction des composés entre deux échantillons, sans succès. Ces difficultés peuvent être attribuées à la version de MZmine qui était utilisée, qui engendrait des obstacles qui ont été discutés à la section 2.4. Les versions de MZmine ont évolué au cours du projet, et celle permettant de procéder à une soustraction entre deux échantillons, et donc d'atteindre les résultats souhaités, a été déployée seulement vers la fin de celui-ci. Il n'a donc été possible de générer des résultats concluants pour le traitement des données qu'à la fin du projet. De façon globale, le type d'expériences et de tests réalisés dans ce projet demande une quantité de travail élevée pour l'analyse et l'interprétation des résultats, ce qui contribue directement à limiter le nombre d'essais pouvant être menés.

Malgré les obstacles rencontrés, ce projet de maîtrise a mené à des résultats pertinents et à des apprentissages significatifs qui instaurent une base solide sur laquelle poursuivre. Une des perspectives majeure de ce projet est son potentiel à exploiter les données issues des expériences de métabolisme *in vitro* pour générer des biomarqueurs susceptibles d'orienter les hypothèses concernant la présence d'une NSP dans un spécimen. La méthode actuelle permet déjà d'atteindre cet objectif, puisque l'identification précise d'un signal n'est pas obligatoire pour que ce dernier puisse servir de marqueur appuyant une hypothèse de présence d'une substance. La méthode représente donc déjà un très grand atout à ce stade du processus, mais une optimisation plus poussée et la réalisation de tests supplémentaires, notamment pour améliorer la performance d'identification des *features* générés, permettraient de renforcer sa capacité à produire des marqueurs d'une fiabilité supérieure.

CONCLUSION

Ce projet de maîtrise avait pour but général d'évaluer le potentiel de l'analyse non ciblée et du métabolisme *in vitro* pour la détection des nouvelles substances psychoactives. Il a été réalisé selon une approche exploratoire, qui visait à amorcer le développement d'une protocole répondant aux besoins du Centre de toxicologie du Québec pour la détection des métabolites de NSP dans de futurs spécimens biologiques de personnes victimes d'intoxications. Pour y arriver, plusieurs objectifs plus spécifiques ont été établis.

Le premier consistait à réaliser une recherche théorique détaillée qui avait pour but de se familiariser avec certains concepts centraux du projet et de déterminer les meilleures techniques et outils à utiliser selon les besoins de l'étude et ceux du CTQ. Les recherches portant sur le métabolisme *in vitro* et les modèles permettant son application ont permis de déterminer que les microsomes de foie humain constituaient le meilleur choix pour le laboratoire, en raison de leur contenu optimal en enzymes de phase I, mais aussi de leur simplicité et leur rapidité d'utilisation. Celles sur le processus de traitement des données issues de l'analyse non ciblée ont quant à elles permis d'accéder à une meilleure compréhension de celui-ci et ont permis de découvrir plusieurs logiciels et outils informatiques puissants, tels que MZmine et SIRIUS, qui permettent de traiter ces données de façon efficace et d'en retirer des informations pertinentes.

Le second objectif spécifique de ce projet était de tester un protocole de génération de métabolites à l'aide de microsomes de foie humain. Deux modèles au métabolisme bien connu et documenté dans la littérature ont été choisis, soit le midazolam et le fentanyl. Deux paramètres ont subi des variations au cours de ces expériences, soit la concentration initiale de substrat au moment de l'incubation et le temps d'incubation. Le but derrière ces variations était de tester leur impact sur le nombre de métabolites générés et leur abondance approximative. Chacune des expériences a permis de produire au minimum un métabolite principal, ce qui a pu être confirmé à l'aide d'étalons analytiques. Les tests ont vraisemblablement généré d'autres métabolites et l'identification de chacun d'entre eux a été assignée à un certain niveau de confiance. Il a été observé que l'utilisation de différentes concentrations initiales de substrat lors d'une expérience pouvait favoriser la formation de métabolites distincts, et ainsi offrir une perspective élargie sur le métabolisme d'une substance, mais qu'une concentration trop élevée par rapport à la quantité d'enzymes utilisée pouvait s'avérer désavantageuse. L'utilisation d'un temps d'incubation prolongé peut permettre d'observer certains métabolites mineurs. Un temps plus court,

d'environ 30 minutes, peut cependant être suffisant pour bien détecter un métabolite principal dans les conditions utilisées.

Le troisième objectif de ce travail était de procéder à l'adaptation d'une méthode chromatographique déjà utilisée au laboratoire pour le dépistage d'un grand nombre de drogues et médicaments divers. Elle inclut également quelques métabolites, mais en proportion minime comparativement à l'ensemble des composés. Le but visé derrière cette adaptation était d'obtenir une chromatographie allongée, qui permettrait de mieux discriminer les composés et ainsi faciliter leur identification à la suite d'une analyse non ciblée. Une priorité a été établie pour la séparation de composés hydrophiles ayant un court temps de rétention, notamment pour des métabolites qui répondraient à ces conditions. Des chromatographies de 15, 20 et 25 minutes, réalisées avec un gradient linéaire, ont été testées et comparées avec la chromatographie initiale. Dix composés présents à différents moments de la méthode de dépistage initiale ont été sélectionnés pour évaluer l'efficacité de la séparation obtenue avec chacune des chromatographies testées. Les trois nouvelles chromatographies se sont avérées efficaces pour séparer les composés présents au début de la méthode initiale, mais n'ont pas engendré d'effet marquant sur la séparation de ceux ayant des temps de rétention plus élevés. Comme il était attendu, l'allongement de la chromatographie a eu pour conséquence d'élargir la plupart des pics, et par le fait-même de diminuer leur hauteur maximale. Ce phénomène a été pris en considération puisqu'il peut avoir un impact négatif lors du traitement de données issues de l'analyse non ciblée. Les résultats ont permis de conclure que la chromatographie de 15 minutes est celle qui offre le meilleur compromis entre la séparation des composés hydrophiles et la perte de signal des composés.

Le dernier objectif spécifique de ce projet de maîtrise consistait à développer une méthode de tri des données résultant de l'analyse non ciblée pour permettre l'émergence des métabolites créés *in vitro*. Pour y arriver, le logiciel MZmine v.4.1.0 a été utilisé. Des tests ont été réalisés en solution pure et avec des échantillons issus de l'expérience de métabolisme *in vitro* du midazolam. Tous les paramètres suggérés par ce logiciel pour la création d'une liste de *features* suite à une analyse par UPLC-QToF-MS ont été testés. Le nombre de scans minimal formant le pic et la hauteur minimale du *feature* sont les deux paramètres qui ont eu un impact notable sur le nombre de *features* créés. L'effet de leur variation a donc été démontrée dans ce travail, en choisissant trois niveaux pour chacun. La soustraction d'un blanc, dans le cas du test en solution pure et d'un contrôle négatif, pour le test avec le midazolam, a été réalisée pour tester son effet sur l'isolation des composés ajoutés ou des métabolites formés. Les résultats ont permis

de conclure qu'avec la méthode analytique utilisée dans ce projet, un nombre de scans minimal de 3 est nécessaire pour optimiser la détection des métabolites créés *in vitro*. Un seuil de hauteur médian, basé sur la distribution des hauteurs de l'ensemble des *features* valides pour un échantillon, s'est avéré être un bon compromis pour la réduction du bruit de fond et la détection de métabolites mineurs. Enfin, la soustraction s'est révélée efficace pour isoler les composés ajoutés en solution pure et les métabolites créés *in vitro*.

Ce projet a permis d'établir des bases solides sur lesquelles le Centre de toxicologie du Québec pourra s'appuyer pour poursuivre les travaux. Le modèle *in vitro* et le protocole qui ont été testés représentent des options favorables pour une utilisation sur le long terme au laboratoire, vu leur simplicité d'utilisation et leur efficacité. Le logiciel utilisé pour le prétraitement et le tri des données issues de l'analyse non ciblée ainsi que le processus général qui a été élaboré pour permettre l'émergence des composés d'intérêt ont également démontré leur performance. L'ampleur du projet laisse place à une vaste possibilité de tests supplémentaires à effectuer. Il sera par exemple pertinent d'appliquer le protocole *in vitro* établi sur des substrats au métabolisme plus complexe, géré par un plus grand nombre d'enzymes distinctes. Une autre perspective du projet consistera à poursuivre le traitement des données de haute résolution à partir de son stade actuel, avec des tests se concentrant d'avantage sur le potentiel d'outils comme SIRIUS ou CFM-ID pour l'identification des *features*.

L'avancement du projet dévoile déjà un grand potentiel pour la génération de biomarqueurs de NSP qui permettront d'appuyer l'hypothèse de leur présence dans un spécimen. Ce tournant permettrait de contourner partiellement les défis actuels liés aux méthodes d'analyse ciblées utilisées par les laboratoires pour la détection de ces substances et constituerait donc une avancée significative pour le laboratoire et pour la toxicologie clinique au Québec.

ANNEXE A

Paramètres finaux de la méthode de tri des données avec le logiciel MZmine v.4.1.0

Smoothing	<input checked="" type="checkbox"/>
Stable ionization across samples	<input checked="" type="checkbox"/>
Crop retention time	<input type="text" value="0.05"/> - <input type="text" value="10.00"/> min.
Max peaks in chromatogram	<input type="text" value="15"/>
Minimum consecutive scans	<input type="text" value="3"/>
Approximate feature FWHM	<input type="text" value="0.06"/> <input type="text" value="minutes"/>
RT tolerance (intra-sample)	<input type="text" value="0.04"/> <input type="text" value="minutes"/>
RT tolerance (sample-to-sample)	<input type="text" value="0.10"/> <input type="text" value="minutes"/>

Ion mode	<input type="text" value="Positive"/>
	<input type="text" value="Absolute intensity"/>
Noise threshold	MS1 <input type="text" value="5.0E2"/>
	MS2..MSn <input type="text" value="5.0E1"/>
Minimum feature height	<input type="text" value="2.5E4"/>
m/z tolerance (scan-to-scan)	<input type="text" value="0.0050"/> m/z or <input type="text" value="20.0000"/> ppm
m/z tolerance (intra-sample)	<input type="text" value="0.0015"/> m/z or <input type="text" value="3.0000"/> ppm
m/z tolerance (sample-to-sample)	<input type="text" value="0.0040"/> m/z or <input type="text" value="8.0000"/> ppm

Minimum DIA correlation coefficient	<input type="text" value="0.80"/>
Minimum DIA correlated points	<input type="text" value="3"/>

BIBLIOGRAPHIE

1. Office des Nations Unies contre la drogue et le crime. *Nouvelles substances psychoactives* [Internet]. Vienne : ONUDC ; 2013 [cité 18 juin 2025]. Disponible sur : https://www.unodc.org/documents/drugs/printmaterials2013/NPS_leaflet/WDC13_NPS_leaflet_FR_LORES.pdf
2. Shafi A, Berry AJ, Sumnall H, Wood DM, Tracy DK. New psychoactive substances: a review and updates. *Ther Adv Psychopharmacol*. 17 déc 2020;10:2045125320967197.
3. Canadian Centre on Substance Use and Addiction. Adulterants, contaminants and co-occurring substances in drugs in Canada [Internet]. Ottawa (ON): Canadian Centre on Substance Use and Addiction; 2020 [cité le 6 novembre 2025]. Disponible sur: <https://www.ccsa.ca/sites/default/files/2020-04/CCSA-CCENDU-Adulterants-Contaminants-Co-occurring-Substances-in-Drugs-Canada-Report-2020-en.pdf>
4. King LA, Kicman AT. A brief history of ‘new psychoactive substances’. *Drug Test Anal*. 2011;3(7-8):401-3.
5. Office des Nations Unies contre la drogue et le crime. *Early Warning Advisory on New Psychoactive Substances – Summary Dashboard* [Internet]. [cité 26 juin 2025]. Disponible sur : <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiY2FINDgxMDgtM2M3YS00YmM1LTk1MWEtYjZyY4Mjc1MjgziwidCl6jBmOWUzNWRiLTU0NGYtNGY2MC1iZGNjLTVIYlY0QxNmU2ZGM3MCIslmMiOjh9&pageName=ReportSectionf66171bf21da5e3e459c>
6. Santé Canada. *Rapport sur les drogues analysées – Service d’analyse des drogues* [Internet]. Ottawa : Gouvernement du Canada ; 2025 [cité 25 juin 2025]. Disponible sur : <https://sante-infobase.canada.ca/service-analyse-drogues/rapport-drogues-analyses.html>
7. Wang F, Pasin D, Skinnider MA, Liigand J, Kleis JN, Brown D, et al. Deep Learning-Enabled MS/MS Spectrum Prediction Facilitates Automated Identification Of Novel Psychoactive Substances. *Anal Chem*. 4 déc 2023;95(50):18326-34.
8. Garneau B, Desharnais B, Laquerre J, Côté C, Taillon MP, Martin PY, et al. A comprehensive analytical process, from NPS threat identification to systematic screening: Method validation and one-year prevalence study. *Forensic Sci Int*. janv 2021;318:110595.
9. Pelletier R, Nahle D, Sarr M, Bourdais A, Morel I, Le Daré B, et al. Identifying metabolites of new psychoactive substances using in silico prediction tools. *Arch Toxicol*. 1 juill 2025;99(7):2953-73.
10. Klingberg J, Keen B, Cawley A, Pasin D, Fu S. Developments in high-resolution mass spectrometric analyses of new psychoactive substances. *Arch Toxicol*. avr 2022;96(4):949-67.
11. CNESST. *Notions – Quel est le cheminement d’un toxique dans l’organisme?* [Internet]. Québec : CNESST ; [cité le 19 novembre 2025]. Disponible sur : <https://reptox.cnesst.gouv.qc.ca/toxicologie/notions-toxicologie/Pages/04-quel-est-cheminement-toxique-dans-organisme.aspx>

12. Kintz P. *Traité de toxicologie médico-judiciaire*. 2^e éd. Elsevier Masson; 2012. 767 p.
13. Brandon EFA, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JHM. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol*. 15 juin 2003;189(3):233-46.
14. Krueger SK, Williams DE. Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacol Ther*. juin 2005;106(3):357-87.
15. Liston HL, Markowitz JS, DeVane CL. Drug glucuronidation in clinical psychopharmacology. *J Clin Psychopharmacol*. oct 2001;21(5):500-15.
16. Michaud V, Turgeon J. Les cytochromes P450 et leur rôle clinique. *Le Médecin du Québec*. 2002 août;37(8):73–84.
17. Zhao M, Ma J, Li M, Zhang Y, Jiang B, Zhao X, et al. Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. *Int J Mol Sci*. 26 nov 2021;22(23):12808.
18. Asha S, Vidyavathi M. Role of human liver microsomes in in vitro metabolism of drugs-a review. *Appl Biochem Biotechnol*. mars 2010;160(6):1699-722.
19. Richardson SJ, Bai A, Kulkarni AA, Moghaddam MF. Efficiency in Drug Discovery: Liver S9 Fraction Assay As a Screen for Metabolic Stability. *Drug Metab Lett*. 2016;10(2):83-90.
20. Kanebratt KP, Andersson TB. Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. juill 2008;36(7):1444-52.
21. Thermo Fisher Scientific. *HPLC basics – Chromatography Learning Center* [Internet]. [cité 19 mars 2025]. Disponible sur : <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/industrial/chromatography/chromatography-learning-center/liquid-chromatography-information/hplc-basics.html>
22. Cross T. HPLC or UHPLC? [Internet]. Waltham (MA) : Thermo Fisher Scientific ; 2019 [cité 3 août 2025]. Disponible sur : <https://www.thermofisher.com/blog/analyteguru/hplc-or-uhplc/>
23. Shimadzu Corporation. *About Resolution, Part 1* [Internet]. [cité 19 mars 2025]. Disponible sur : <https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/resol-1.html>
24. Hoffmann E de, Stroobant V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. John Wiley & Sons; 2007. 502 p.
25. Glish GL, Vachet RW. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov*. févr 2003;2(2):140-50.
26. Ho C, Lam C, Chan M, Cheung R, Law L, Lit L, et al. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin Biochem Rev*. févr 2003;24(1):3-12.
27. Waters Corporation. *About the Types of Instruments Used in Mass Spectrometry* [Internet]. [cité 2025 mars 19]. Disponible sur : <https://www.waters.com/nextgen/ca/fr/education/primers/the-mass-spectrometry-primer/what-types-of-instruments-are-used.html>

28. Cichocki A. Relative Response Factor: Accurate Quantification in Chromatography [Internet]. Separation Science ; 2024 oct 15 [cité 25 juin 2025]. Disponible sur : <https://www.sepscience.com/relative-response-factor-accurate-quantification-in-chromatography-10823>
29. Yinon J. Chapter 2 - Detection of Explosives by Mass Spectrometry. In: Yinon J, éditeur. Counterterrorist Detection Techniques of Explosives [Internet]. Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 2007 [cité 25 juin 2025]. p. 41-59. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444522047500213>
30. Allen DR, McWhinney BC. Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications. Clin Biochem Rev. août 2019;40(3):135-46.
31. Murray KK. Resolution and Resolving Power in Mass Spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom. 7 déc 2022;33(12):2342-7.
32. Volmer DA, Leslie AD. Dealing With the Masses: A Tutorial on Accurate Masses, Mass 32 Uncertainties, and Mass Defects [Internet]. Spectroscopy. 2007 juin 1 [cité 26 juin 2025]. Disponible sur : <https://www.spectroscopyonline.com/view/dealing-masses-tutorial-accurate-masses-mass-32-uncertainties-and-mass-defects>
33. Mollerup CB, Dalsgaard PW, Mardal M, Linnet K. Targeted and non-targeted drug screening in whole blood by UHPLC-TOF-MS with data-independent acquisition. Drug Test Anal. 2017;9(7):1052-61.
34. Schrimpe-Rutledge AC, Codreanu SG, Sherrod SD, McLean JA. Untargeted metabolomics strategies – Challenges and Emerging Directions. J Am Soc Mass Spectrom. déc 2016;27(12):1897-905.
35. Malm L, Palm E, Souihi A, Plassmann M, Liigand J, Kruve A. Guide to Semi-Quantitative Non-Targeted Screening Using LC/ESI/HRMS. Molecules. janv 2021;26(12):3524.
36. Wood M. The Utility of MSE for Toxicological Screening [Internet]. Milford (MA) : Waters Corporation ; 2014 [cité 3 août 2025]. Disponible sur : <https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2014/utility-of-mse-toxicological-screening.html>
37. Agilent Technologies. Matching UHPLC resolution and speed with Agilent Ultra High Definition Q-TOF technology [Internet]. Santa Clara (CA): Agilent Technologies; [cité le 6 août 2025]. Disponible sur: <https://www.agilent.com>
38. Heuckeroth S, Damiani T, Smirnov A, Mokshyna O, Brungs C, Korf A, et al. Reproducible mass spectrometry data processing and compound annotation in MZmine 3. Nat Protoc. sept 2024;19(9):2597-641.
39. Dührkop K, Fleischauer M, Ludwig M, Aksenov AA, Melnik AV, Meusel M, et al. SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. Nat Methods. 2019;16(4):299–302. doi:10.1038/s41592-019-0344-8
40. ChemCalc: molecular formula information [Internet]. [cité 27 juill 2025]. Disponible sur: <https://www.chemcalc.org/>

41. MOLGEN online [Internet]. [cité 27 juill 2025]. Disponible sur: <https://www.molgen.de/online.html>
42. CFM-ID [Internet]. [cité 27 juill 2025]. Disponible sur: <https://cfmid.wishartlab.com/>
43. Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics Off J Metabolomic Soc.* sept 2007;3(3):211-21.
44. Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, et al. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. *Environ Sci Technol.* 18 févr 2014;48(4):2097-8.
45. Knights KM, Stresser DM, Miners JO, Crespi CL. In Vitro Drug Metabolism Using Liver Microsomes. *Curr Protoc Pharmacol.* 16 sept 2016;74:7.8.1-7.8.24.
46. Nguyen H, Kimoto E, Callegari E, Obach R. Mechanistic Modeling to Predict Midazolam Metabolite Exposure from In Vitro Data. *Drug Metab Dispos.* 8 mars 2016;44.
47. DrugBank Online. Midazolam (DB00683) [Internet]. [cité 29 avril 2025]. Disponible sur : <https://go.drugbank.com/drugs/DB00683>
48. Grześkowiak T, Zgoła-Grześkowiak A, Rusińska-Roszak D, Zaporowska-Stachowiak I, Jeszka-Skowron M. Fragmentation studies of selected drugs utilized in palliative care. *Eur J Mass Spectrom Chichester Engl.* déc 2018;24(6):420-36.
49. Sano T, Sato K, Kurihara R, Mizuno Y, Kojima T, Yamakawa Y, et al. Sensitive determination of midazolam and identification of its two metabolites in human body fluids by column-switching capillary high-performance liquid chromatography/fast atom bombardment-mass spectrometry. *Leg Med Tokyo Jpn.* sept 2001;3(3):149-56.
50. Kuś K, Zakrzewska A, Szafarz M, Walczak M, Gonciarz A, Kij A, et al. Validation of LC/MS/MS method for assessment of the in vitro activity of selected rat cytochrome P450 isoenzymes – Application to early drug metabolism screening. *Acta Pol Pharm – Drug Res.* 2015;72(6):1089–99.
51. Patocka J, Wu W, Oleksak P, Jelinkova R, Nepovimova E, Spicanova L, et al. Fentanyl and its derivatives: Pain-killers or man-killers? *Heliyon* [Internet]. 30 avr 2024 [cité 12 mars 2025];10(8). Disponible sur: [https://www.cell.com/heliyon/abstract/S2405-8440\(24\)04826-6](https://www.cell.com/heliyon/abstract/S2405-8440(24)04826-6)
52. Day J, Slawson M, Lugo RA, Wilkins D. Analysis of fentanyl and norfentanyl in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using electrospray ionization. *J Anal Toxicol.* oct 2003;27(7):513-6.
53. Gundersen POM, Broecker S, Slørdal L, Spigset O, Josefsson M. Retrospective screening of synthetic cannabinoids, synthetic opioids and designer benzodiazepines in data files from forensic post mortem samples analysed by UHPLC-QTOF-MS from 2014 to 2018. *Forensic Sci Int.* 2020;311:110274. doi:10.1016/j.forsciint.2020.110274