

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

DÉVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU TEST DIAGNOSTIQUE POUR LA
DÉTECTION DU GHB EXOGÈNE DANS LES CHEVEUX HUMAINS

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE EXTENSIONNÉ DE
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PAR

ANNY-FRANCE HUDON

JUIN 2018

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier tous ceux qui ont participé, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire. Je remercie tout d'abord Normand Fleury de m'avoir accueillie et m'avoir permise de faire mes expérimentations au Centre de toxicologie du Québec. J'aimerais également remercier les chimistes René Bérubé et Patrick Bélanger pour leur grande aide et leur support tout au long de mon projet. Ils ont beaucoup contribué à ma réussite, autant par leur grande expérience professionnelle que par leur encouragement.

Je tiens également à remercier tous les autres chimistes du Centre de toxicologie qui ont rendu mon parcours beaucoup plus facile et agréable. Je les remercie de m'avoir accueillie comme ils l'ont fait.

Je souhaite remercier Cyril Muehlethaler pour m'avoir aidée avec le traitement statistique et l'interprétation de mes données. Sa collaboration est vraiment appréciée. Je veux aussi remercier mon directeur de maîtrise André Lajeunesse pour ses conseils et son appui tout au long de ma maîtrise.

Finalement, je tiens à remercier mon conjoint Mathieu qui m'a appuyée et soutenue moralement pendant ces deux années importantes de ma vie. Il a été présent pour moi du début à la fin.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xi
LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS	xiii
RÉSUMÉ	xiv
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
REVUE DE LA LITTÉRATURE	3
1.1 Prévalence de la soumission chimique	3
1.2 L'acide gamma-hydroxybutyrique	4
1.2.1 Historique	4
1.2.2 GHB endogène	5
1.2.3 GHB exogène	8
1.3 Méthodes de dépistage dans les cheveux	12
1.3.1 Développement et structure du cheveu	12
1.3.2 Mécanisme d'incorporation des molécules dans les cheveux	17
1.3.3 Procédures analytiques	20
1.4 Problématique	33
1.5 Hypothèse de recherche	34
1.6 Objectifs de recherche	34

CHAPITRE II	
MATÉRIELS ET MÉTHODE	36
2.1 Matériels	36
2.2 Spécimens de cheveux	37
2.3 Développement de la méthode analytique	37
2.3.1 Optimisation de la chromatographie liquide	37
2.3.2 Optimisation de la préparation des échantillons	39
2.3.3 Optimisation de la spectrométrie de masse	49
2.4 Méthode analytique	50
2.4.1 Préparation des échantillons de cheveux	50
2.4.2 Paramètres de la chromatographie liquide	53
2.4.3 Paramètres du spectromètre de masse	54
2.5 Validation de la méthode	55
2.5.1 Linéarité	56
2.5.2 Répétabilité	59
2.5.3 Limites de détection et de quantification	60
2.5.4 Effet matrice instrumental et récupération	61
2.5.5 Reproductibilité	64
2.5.6 Spécificité	64
CHAPITRE III	
RÉSULTATS ET DISCUSSION	65
3.1 Description	65
3.2 Validation de la méthode	65
3.2.1 Linéarité	65
3.2.2 Répétabilité	69
3.2.3 Limites de détection et de quantification	71
3.2.4 Effet matrice instrumental et récupération	73
3.2.5 Reproductibilité	75

3.2.6	Spécificité	78
3.3	Effet de la masse de cheveux	81
3.4	Résultats des segments	87
3.5	Résultats des cas potentiellement positifs	93
3.5.1	Analyse des ratios	93
3.5.2	Analyse des valeurs aberrantes	101
CHAPITRE IV		
CONCLUSION		104
ANNEXE I		
Exemple de calcul de la concentration de GHB dans les cheveux (en ng/mg) à partir de la concentration en µg/L des dilutions		110
ANNEXE II		
Table de Grubbs		111
BIBLIOGRAPHIE		112

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Métabolisme du GHB endogène dans un neurone	7
1.2	Métabolisme du GHB exogène	9
1.3	Structures du follicule pileux et du cheveu	13
1.4	Assemblage des filaments de kératine	14
1.5	Étapes de croissance du cheveu	16
1.6	Mécanismes d'incorporation et d'élimination des molécules dans les cheveux	20
2.1	Phase stationnaire de la colonne iHILIC® Fusion (P) PEEK	38
2.2	Cinétique d'hydrolyse de 7 jours pour le GHB	44
2.3	Cinétique d'hydrolyse de 7 jours pour le GABA	44
2.4	Cinétique d'hydrolyse de 7 jours pour l'AS	45
2.5	Mèche de cheveux brochée sur un morceau de carton	51
2.6	Pics chromatographiques de l'interférence provenant du filtre, avec et sans lavage	56
2.7	Gradient chromatographique pour l'analyse du GHB	53
2.8	Gradient chromatographique pour l'analyse du GABA et de l'AS	54
2.9	Illustration des six séries de tests	62
3.1	Courbes d'étalonnage du GHB préparées dans différentes matrices de cheveux	66
3.2	Courbes d'étalonnage du GABA préparées dans différentes matrices de cheveux	67
3.3	Courbes d'étalonnage de l'AS préparées dans différentes matrices de cheveux	68
3.4	Concentration en GHB du MR mesurée sur 20 séquences	76
3.5	Concentration en GABA du MR mesurée sur 20 séquences	77
3.6	Concentration en AS du MR mesurée sur 20 séquences	77

3.7	Séparation chromatographique par colonne HILIC du GHB et de ses principaux isomères ajoutés à un digestat de cheveux	80
3.8	Séparation chromatographique par colonne HILIC du GABA et de ses principaux isomères ajoutés à un digestat de cheveux	80
3.9	Séparation chromatographique par colonne HILIC de l'AS et de son principal isomère ajoutés à un digestat de cheveux	81
3.10	Concentration en GHB mesurée par CL-SM/SM en fonction de la masse de cheveux hydrolysés	82
3.11	Concentration en GABA mesurée par CL-SM/SM en fonction de la masse de cheveux hydrolysés	83
3.12	Concentration en AS mesurée par CL-SM/SM en fonction de la masse de cheveux hydrolysés	83
3.13	Concentrations en GHB mesurées par CL-SM/SM en fonction de la masse de cheveux hydrolysés	86
3.14	Concentrations en GABA mesurées par CL-SM/SM en fonction de la masse de cheveux hydrolysés	86
3.15	Concentrations en AS mesurées par CL-SM/SM en fonction de la masse de cheveux hydrolysés	87
3.16	Graphique des concentrations en GHB et en AS mesurée par CL-SM/SM dans différents segments d'une même mèche de cheveux	90
3.17	Distribution des concentrations de GHB retrouvées dans les cheveux normaux de volontaires (N = 73 personnes).....	91
3.18	Diagrammes à boîte des concentrations en GHB de chacun des spécimens de cheveux analysés	92
3.19	Corrélation entre la concentration moyenne en GHB des segments d'un échantillon de cheveux et de sa déviation standard	92
3.20	Graphique de la concentration des trois molécules dans les différents segments de cheveux de la mèche P-Br-126	95

3.21	Graphique de la comparaison des deux ratios versus la concentration de GHB dans les différents segments de la mèche P-Br-126	96
3.22	Graphique de la comparaison des deux ratios versus la concentration de GHB dans les différents segments de la mèche de P-Br-76	97
3.23	Graphique de la concentration des trois molécules dans les différents segments de la mèche P-Br-71	99
3.24	Graphique de la comparaison des deux ratios versus la concentration de GHB dans les différents segments de la mèche P-Br-71	100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1	Concentrations en GHB dans les différents segments de cheveux selon la méthode de lavage utilisée et ratios de comparaison 41
2.2	Concentrations en AS dans les différents segments de cheveux selon la méthode de lavage utilisée et ratios de comparaison 41
2.3	Concentrations en GABA dans les différents segments de cheveux selon la méthode de lavage utilisée et ratios de comparaison 42
2.4	Rapports d'aires entre les molécules à 4 et 5 deutériums et celles à 6 deutériums, pour le GABA-d6 et le GHB-d6 47
2.5	Optimisation des transitions MRM des trois molécules par CL-SM/SM par le logiciel <i>IntelliStart™</i> 55
2.6	Préparation des solutions d'ajout pour la courbe d'étalonnage du GHB 57
2.7	Préparation combinée des solutions d'ajout pour les courbes d'étalonnage du GABA et de l'AS 57
2.8	Préparation de la courbe d'étalonnage du GHB dans les cheveux 58
2.9	Préparation des dilutions 1/40 pour les courbes d'étalonnage du GABA et de l'AS dans les cheveux 59
3.1	Pentes et coefficients de détermination des courbes d'étalonnage du GHB 66
3.2	Pentes et coefficients de détermination des courbes d'étalonnage du GABA 67
3.3	Pentes et coefficients de détermination des courbes d'étalonnage de l'AS 69
3.4	Répétabilité des résultats d'analyse pour le GHB, l'AS et le GABA .. 70
3.5	LD et LQ calculées sur la base de la répétabilité pour le GHB et l'AS 72
3.6	Effet matrice instrumental pour le GHB, le GABA et l'AS 74
3.7	Récupération du GHB, du GABA et de l'AS 75

3.8	Données statistiques sur les concentrations mesurées de GHB, de GABA et d'AS dans les MR	76
3.9	Optimisation par CL-SM/SM des transitions MRM des isomères par le logiciel <i>Intellistart</i> TM	78
3.10	Mesures statistiques des concentrations en GHB, GABA et AS selon la masse de cheveux digérés	84
3.11	Paramètres des courbes d'étalonnage du GHB, du GABA et de l'AS selon la masse de cheveux digérée, avec les concentrations endogènes correspondantes	85
3.12	Données pour le test de Grubbs pour les spécimens P-Br-76 et P-Br-71	102

LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AABA :	Acide alpha-aminobutyrique
ACN :	Acétonitrile
AHB :	Acide alpha-hydroxybutyrique
AS :	Acide succinique
AS ¹³ C ₄ :	Acide succinique comportant 4 carbones 13
BABA :	Acide bêta-aminobutyrique
BHB :	Acide bêta-hydroxybutyrique
BSTFA :	N,O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
CG :	Chromatographie gazeuse
CL :	Chromatographie liquide
CV :	Coefficient de variation
DCL :	Dichlorométhane
DFC :	<i>Drug-facilitated crime</i>
DFSA :	<i>Drug-facilitated sexual assault</i>
EM :	Effet matrice
ESI :	<i>Electrospray ionisation</i>
GABA :	Acide gamma-aminobutyrique
GABA-d6 :	Acide gamma-aminobutyrique comportant 6 deutériums
GHB :	Acide gamma-hydroxybutyrique
GHB-d6 :	Acide gamma-hydroxybutyrique comportant 6 deutériums
H ₂ O :	Eau
HILIC :	<i>Hydrophilic interaction liquid chromatography</i>
LD :	Limite de détection
LQ :	Limite de quantification
<i>m/z</i> :	Rapport masse sur charge
MeOH :	Méthanol
MMA :	Acide méthylmalonique
MR :	Matériau de référence
MRM :	<i>Multiple reaction monitoring</i>
NaOH :	Hydroxyde de sodium
pH :	Potentiel hydrogène
pK _a :	Indication de la constante d'acidité
S-S :	Liaison disulfure
SH :	Groupe sulfhydryle
SI :	Standard interne
S/N :	Ratio signal sur bruit (signal to noise)
SM :	Spectrométrie de masse
SoHT :	<i>Society of Hair Testing</i>
SSA :	<i>Succinic semialdehyde</i>

SSADH : *Succinic semialdehyde dehydrogenase*
U : Courant continu
UNODC : United Nations Office on Drugs and Crime
V : Courant alternatif

LISTE DES SYMBOLES UNITÉS

[] :	Concentration
g	Gramme
cm	Centimètre
°C	Degré celsius
M	Molaire
ng/mg	Nanogramme par milligramme
mg/kg	Milligramme par kilogramme
mL	Millilitre
µm	Micromètre
mM	Millimolaire
h	Heure
ng/mL	Nanogramme par millilitre
mm	Millimètre
µL	Microlitre
rpm	Rotation par minute
Å	Ångström
mL/min	Millilitre par minute
psi	<i>Pound per square inch</i> (livre-force par pouce carré)
L/h	Litre par heure
kV	Kilovolt
V	Volt
ppm	Partie par million

RÉSUMÉ

Le GHB est une drogue qui peut être utilisée pour commettre des crimes à caractère sexuel étant donné son effet dépresseur sur le système nerveux central. La fenêtre de détection de cette molécule dans le sang et l'urine est très courte, donc il est difficile de prouver qu'elle a été ingérée notamment dans des cas de viols. Les cheveux se sont avérés une bonne alternative pour tenter de détecter une exposition unique au GHB. Étant donné la présence naturelle du GHB chez les mammifères, il faut être capable de discriminer le niveau endogène à celui associé à un apport exogène. L'objectif de cette étude est de développer une méthode en CL-SM/SM pour analyser le GHB, son précurseur le GABA et son métabolite l'acide succinique (AS) dans les cheveux. La méthode analytique développée implique un lavage des mèches de cheveux dans des conditions appropriées et une digestion dans une solution de NaOH à 110°C pendant 24 heures. Par la suite, le digestat est simplement dilué et neutralisé avant d'être analysé par chromatographie liquide à interaction hydrophile (HILIC) et spectrométrie de masse en tandem.

Les concentrations endogènes de GHB retrouvées dans les spécimens de cheveux de personnes n'ayant pas consommé de GHB variaient entre 5 et 60 ng/mg, avec une moyenne de 16,2 ng/mg (N = 73). Il a été remarqué que la masse de cheveux digérés avait une influence sur la concentration obtenue : des masses plus élevées de cheveux ont données des concentrations plus faibles en analytes, probablement dû à une digestion moins efficace étant donné un même volume utilisé pour la digestion peu importe la masse. Les ratios de concentrations [GHB] / [GABA] et [GHB] / [AS] ont été calculés chez plusieurs volontaires pour plusieurs segments d'une même mèche de cheveux pour vérifier s'ils étaient davantage constants d'un segment à l'autre que la concentration en GHB seule : les résultats obtenus n'ont pas pu supporter cette hypothèse de travail.

Seize spécimens de cheveux suspectés positifs en GHB exogène ont également été analysés. L'application du ratio [GHB] / [GABA] a permis cette fois d'améliorer légèrement le facteur d'augmentation de la concentration en GHB d'un segment présumé positif vs d'autres segments avec des concentrations de GHB endogènes normales. Une approche statistique avec analyse de valeurs aberrantes (test de Grubbs) a aussi été tentée pour vérifier s'il y avait un autre moyen de déterminer un segment de cheveux suspect en GHB. L'application du test de Grubbs a donné des résultats prometteurs en permettant l'identification probante de deux spécimens de cheveux positifs testés avec des niveaux de confiance variant de 99,0 % à 99,9 %. Ce même test appliqué aux divers échantillons de notre population sans apport de GHB exogène (N

= 73) a donné respectivement trois faux-positif(s) sous un niveau de confiance de 99,5 % et un seul à 99,9 %. Afin de confirmer l'utilité de ces outils diagnostics de prise de GHB, une étude clinique avec volontaires ayant ingéré différentes doses de GHB serait souhaitable dans un proche avenir.

MOTS-CLÉS : GHB, drogue du viol, cheveux, agression sexuelle, CL-SM/SM

INTRODUCTION

Le terme soumission chimique, souvent rapportée sous l'appellation DFC ou *drug-facilitated crime* dans la littérature, comprend tous les crimes où une substance psychoactive est administrée à la victime pour faciliter l'acte délictuel, que ce soit un vol, une extorsion d'argent ou une agression sexuelle. Dans le dernier cas, on parle précisément de DFSA pour *drug-facilitated sexual assault*. Dans de telles situations, la victime a perdu sa capacité à consentir à un acte sexuel suite à une prise de drogue et/ou d'alcool. Plusieurs drogues agissant comme dépresseur du système nerveux central peuvent être utilisées pour commettre ce genre de crime. Parmi celles-ci se trouve l'acide gamma-hydroxybutyrique (GHB) communément appelée drogue du viol. Étant donné son élimination très rapide dans le corps humain, il ne reste plus de trace de son passage après en moyenne 12h dans le sang et l'urine. C'est pourquoi des méthodes ont été développées pour analyser cette substance dans les cheveux. Or, étant donné le niveau endogène de GHB retrouvé chez les humains pouvant varier selon une période donnée pour un même individu, il peut parfois être difficile de distinguer un niveau de GHB correspondant à un apport exogène plutôt qu'à un niveau endogène. De nouvelles méthodologies analytiques sont donc requises pour améliorer la discrimination entre le GHB synthétique et celui naturel. Dans cette présente étude, nous avons tenté de développer un nouvel outil permettant d'y arriver. Afin de mieux comprendre la démarche choisie, le métabolisme du GHB, la structure et le développement du cheveu, ainsi qu'une recension des écrits traitant de l'analyse du GHB dans les cheveux sont présentés dans une revue de la littérature, suivis des hypothèses et des objectifs de recherche. Ensuite, le matériel utilisé est présenté et la méthode développée et son optimisation sont expliquées. S'ensuit un chapitre Résultats et discussion couvrant la validation de la méthode, la présentation de nos résultats analytiques du GHB dans plusieurs spécimens de cheveux (normaux et potentiellement positifs) et finalement

une interprétation des données à l'aide de tests statistiques. Nous terminons avec une conclusion qui regroupe les résultats importants de l'étude, les limites de la recherche et les perspectives d'avenir.

CHAPITRE I

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Prévalence de la soumission chimique

Selon Gee et *al.* (2006), il y aurait 2 types de *drug-facilitated sexual assault* ou DFSA : le type proactif et le type opportuniste. Dans le premier cas, la victime se fait administrer à son insu ou de force la substance psychoactive alors que dans le second cas, l'agresseur profite du fait que la victime ait consommé par elle-même une substance la rendant inconsciente et/ou incapable de consentir ni de réagir. Les molécules prisées pour commettre ce genre de crime sont habituellement des déprimeurs du système nerveux central qui agissent rapidement et qui ont une courte demi-vie permettant d'éviter leur détection. Les effets recherchés sont une sédation et si possible une perte de mémoire. Le fait que la molécule soit incolore et inodore permet que celle-ci passe inaperçue lorsqu'elle est ajoutée dans une boisson. De ce fait, l'acide gamma-hydroxybutyrique (le GHB) est une molécule de choix, étant donné qu'elle possède toutes ces caractéristiques.

Dans un livre sur les *drug-facilitated crime* (DFC) paru en 2014, Djeddar rapporte des données épidémiologiques internationales sur les drogues utilisées lors de cas de DFSA. Aux États-Unis, une étude a démontré que le GHB a été détecté dans seulement 3% des cas de DFSA. D'autres études faites au Canada et aux Pays-Bas ont quant à elles démontré la présence de GHB dans respectivement 1% et 1,5% des cas seulement. Au Royaume-Uni, la présence de GHB a également été démontrée dans un très faible pourcentage des cas de DFSA, soit dans seulement 0,2%. Quelques cas ont également été rapportés en Italie. Selon ces statistiques, il semblerait que le nombre de cas où le GHB a été utilisé pour commettre des agressions sexuelles soit assez faible. Cependant,

il est important de mentionner que dans ces études, le prélèvement de sang et d'urine se faisait majoritairement en moins de 24h après l'acte criminel présumé, sans toutefois préciser le temps exact écoulé. Or, le GHB a un métabolisme très rapide. La présence de GHB exogène dans le sang est détectable jusqu'à 6h après l'ingestion et jusqu'à 12h dans l'urine (Madea et Mußhoff, 2009). Par conséquent, une sous-estimation du nombre de cas réels de DFSA où le GHB est impliqué demeure possible puisqu'il n'est pas toujours détecté à temps. De plus, bon nombre d'agressions contre la personne ne sont pas toujours rapportées par les victimes pour diverses raisons personnelles.

Malgré des statistiques relativement faibles, le GHB est encore utilisé pour commettre des crimes à caractère sexuel. De plus, cette molécule est facilement disponible (Ferrara *et al.*, 2001). En effet, il est facile de la produire à partir de la gamma-butyrolactone ou du 1,4-butanediol, 2 produits couramment retrouvés dans le milieu industriel, dans différents solvants ou comme produit de départ pour la synthèse de plastifiants, entre autres (Confédération suisse, 2009). Il est aussi très facile de s'en procurer via des marchés noirs sur Internet ou simplement de façon illicite sur la rue (Ferrara *et al.*, 2001). Pour toutes ces raisons, le GHB reste donc une substance de choix pour les violeurs.

1.2 L'acide gamma-hydroxybutyrique

1.2.1 Historique

L'acide gamma-hydroxybutyrique, mieux connu sous le nom de GHB ou « drogue du viol », est une molécule produite au niveau du cerveau chez les mammifères. Elle fut synthétisée pour la première fois en laboratoire au début des années 1960 par Henri Laborit, un chercheur français qui travaillait sur le développement de nouveaux

analgésiques (Lefebvre, 1997; Németh *et al.*, 2010). Le GHB fut alors utilisé comme analgésique intraveineux, mais il fut vite remplacé par d'autres anesthésiants (Confédération Suisse, 2009) étant donné qu'il pouvait causer des convulsions ou des vomissements (Busardò, Francesco P. et W. Jones, 2015). Cette molécule active s'est avérée avoir d'autres effets que celui d'anesthésiant. Cela mena plusieurs autres chercheurs à s'intéresser au GHB. Entre autre, on lui trouva plusieurs autres utilités comme traitement de l'insomnie, de la cataplexie causée par la narcolepsie et de l'alcoolisme. Dans les années 1980, les culturistes se sont également intéressés à cette drogue, car il était rapporté qu'elle stimulait l'hormone de croissance, entraînant une augmentation de la masse musculaire (Lefebvre, 1997; Németh *et al.*, 2010). Ce n'est que dans les années 1990 qu'une importante augmentation de la consommation de GHB à des fins récréatives a été constatée. Cette drogue est devenue populaire à cause de ses effets euphorisant, désinhibiteur et sociabilisant (Németh *et al.*, 2010). Suite à sa grande popularité et au danger qu'il comporte comme puissant dépressur du système nerveux central, le GHB a été interdit de vente et de fabrication dans divers pays dont le Canada et les États-Unis (Lefebvre, 1997). Malgré les interdictions en vigueur, le GHB est toujours bien présent sur le marché noir.

1.2.2 GHB endogène

Chez l'humain, le GHB est une molécule endogène retrouvée à des concentrations micromolaires dans le sang. Son précurseur au niveau du cerveau est l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). Selon les cascades métaboliques établies, le GABA est désaminé par la GABA transaminase dans la mitochondrie pour former l'acide succinique semi-aldéhyde (SSA) qui est ensuite oxydé en grande partie en acide succinique par l'acide succinique semi-aldéhyde déshydrogénase (SSADH). L'acide succinique entre ensuite dans le cycle de Krebs pour y être converti en dioxyde de

carbone et en eau. Une faible partie de la SSA, soit environ 1 à 2% (Maitre *et al.*, 2000), traverse au niveau du cytosol et est réduite en GHB par l'acide succinique semi-aldéhyde réductase (Ferrara *et al.*, 2001; Maitre *et al.*, 2005). Le métabolisme du GHB endogène est schématisé sur la Figure 1.1. Les neurones libérant du GABA, et par le fait même dans lesquels on retrouve du GHB, se situent principalement au niveau de l'hippocampe, du cortex et de l'amygdale du cerveau (Busardò, Francesco P. et W. Jones, 2015).

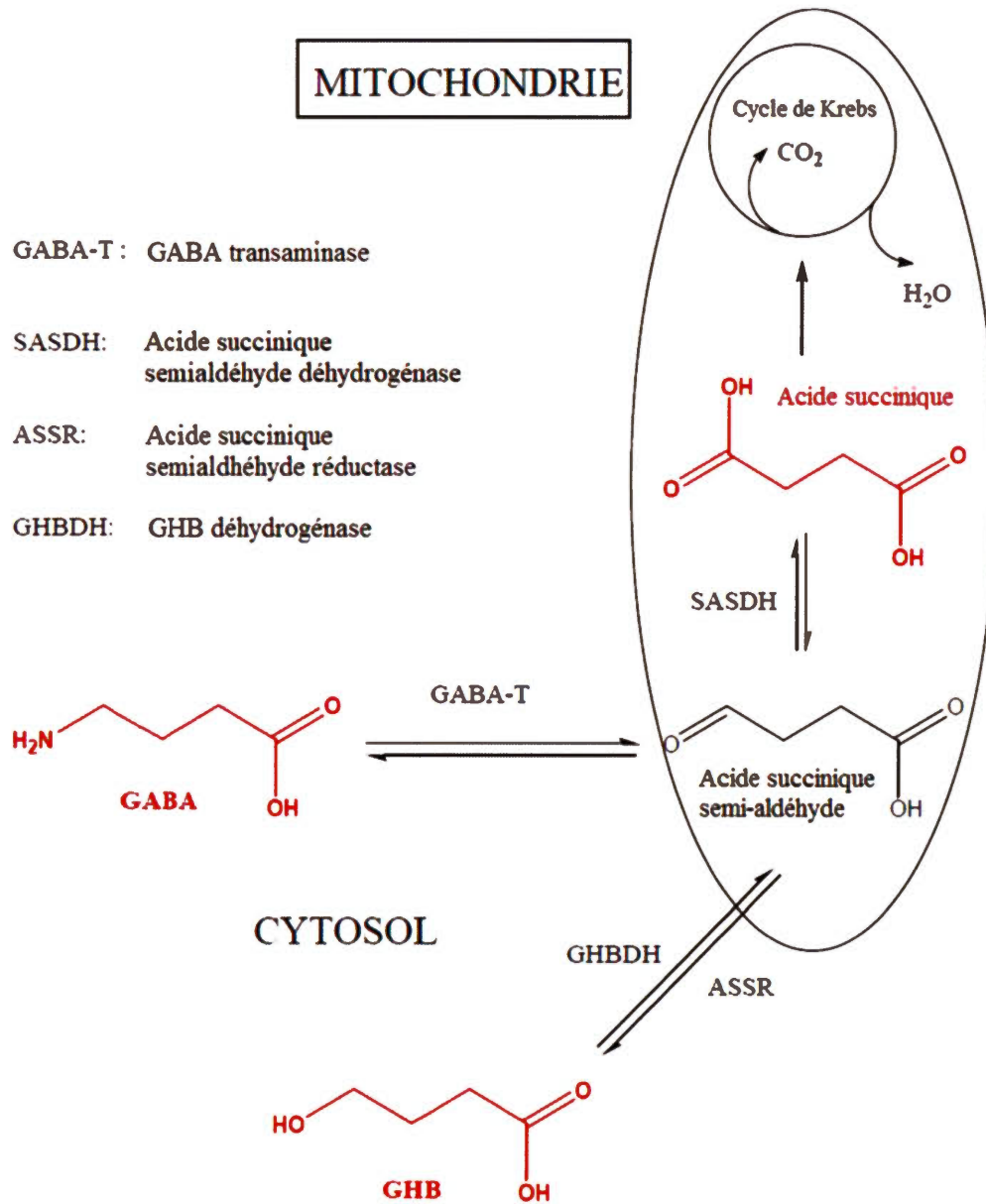


Figure 1.1: Métabolisme du GHB endogène dans un neurone (Maitre et al., 2000).

Le GHB possède ses propres récepteurs. À des concentrations endogènes de GHB, seuls ces récepteurs sont sollicités. Cependant, le rôle exact du GHB endogène est encore mal connu. Une hypothèse évoque un possible rôle dans la régulation de

l'activité GABAergique en sollicitant un récepteur GHB présynaptique. De cette façon, il induit une hyperpolarisation neuronale, inhibant ainsi la libération du GABA, du glutamate et de la dopamine (Maitre *et al.*, 2005).

1.2.3 GHB exogène

Pour les consommateurs récréationnels, le GHB est principalement vendu sous forme liquide. Il est communément appelé « *liquid ecstasy* » car tout comme cette drogue, le GHB procure un effet de socialisation (Lefebvre, 1997). Deux autres substances sont également consommées à titre de GHB, la gamma-butyrolactone et le 1,4-butanediol, puisqu'une fois ingérées, ces molécules se transforment rapidement en GHB, que ce soit grâce à une lactonase sérique pour la première ou par l'alcool déshydrogénase et l'aldéhyde déshydrogénase pour la seconde (Confédération suisse, 2009). Cela est représenté dans le schéma 1.2.

1.2.3.1 Métabolisme

Le GHB ingéré est principalement métabolisé en acide succinique semi-aldéhyde (SSA) au niveau du foie via la voie d'oxydation impliquant la GHB déshydrogénase. L'acide succinique semi-aldéhyde est à son tour oxydé pour former l'acide succinique (AS) qui entre dans le cycle de Krebs, tout comme lors du métabolisme du GHB endogène. Il est à noter que le GHB peut être considéré à la fois comme un précurseur et un métabolite du GABA (Busardò, Francesco P. et W. Jones, 2015). En effet, il semblerait qu'une infime partie du GHB pénétrant dans les neurones se transformerait

en SSA qui à son tour se transformerait en GABA plutôt qu'en acide succinique (Maitre *et al.*, 2005). Ce métabolisme est représenté dans la Figure 1.2 suivante.

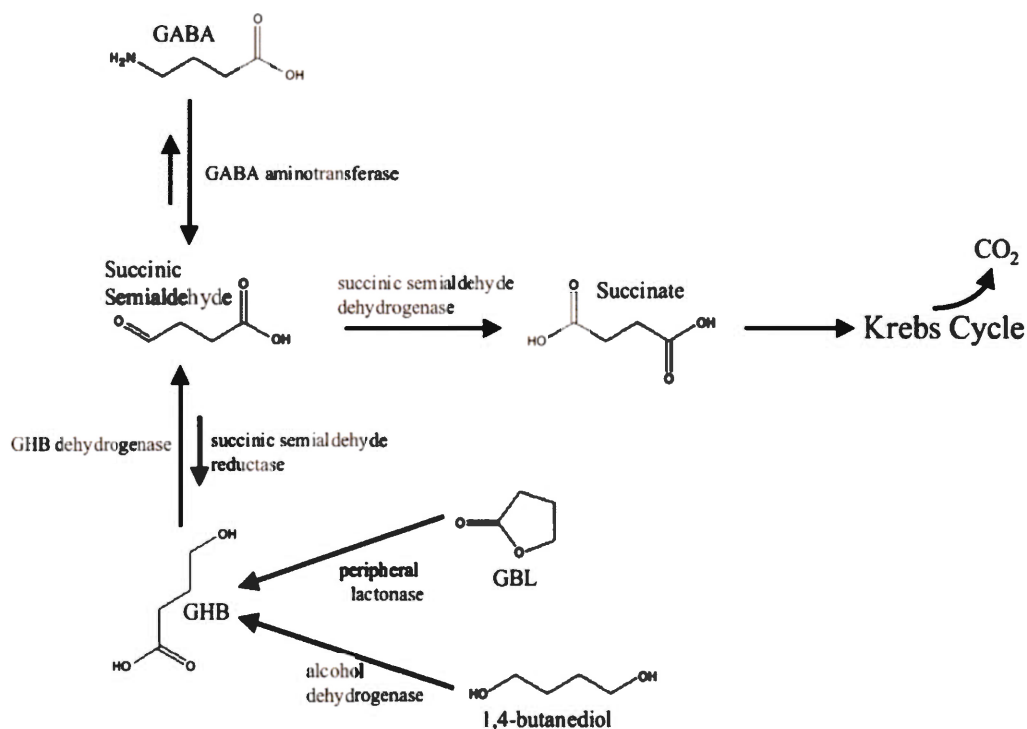


Figure 1.2 : Métabolisme du GHB exogène (Mason et Kerns, 2002).

1.2.3.2 Pharmacodynamique

Étant liposoluble, le GHB traverse facilement la barrière hémato-encéphalique (Mason et Kerns, 2002). Pour induire un effet, il doit être consommé en grande quantité. Or, les récepteurs GHB deviennent saturés à hautes concentrations. Des études sur le rat suggèrent qu'il pourrait exister 3 phénomènes différents pour expliquer l'effet produit par de hautes concentrations en GHB. Il semblerait que ces 3 phénomènes pourraient jouer un rôle dans le mécanisme d'action du GHB (Maitre *et al.*, 2005). Tout d'abord,

l'augmentation de GHB solliciterait, comme expliqué précédemment, les récepteurs GHB présynaptiques, inhibant ainsi la libération de GABA et de dopamine pour une période de 10 à 20 minutes. Par la suite se produirait une période de désensibilisation des récepteurs GHB, entraînant une dépolarisation du neurone et une augmentation anormalement élevée de la libération des deux mêmes neurotransmetteurs. Ceux-ci seraient responsables des effets pharmacologiques rencontrés. Le deuxième phénomène est qu'à forte dose, le GHB deviendrait un agoniste des récepteurs GABA-B et créerait les mêmes effets que le GABA. Finalement, la 3^e hypothèse reposerait sur le fait que le GHB pourrait être oxydé en SSA dans les neurones et qu'une partie serait transformée en GABA par la GABA transaminase. Ainsi, cette augmentation de GABA stimulerait une fois de plus les récepteurs GABA-B (Maitre *et al.*, 2005). Cependant, il semblerait que cette transformation du GHB en GABA soit minime et que, par le fait même, cela ne contribuerait pratiquement pas aux effets de cette drogue (Mason et Kerns, 2002). Chose certaine, la libération de GABA entraîne la dépression du système nerveux central, ce qui explique certains des effets rencontrés lors de la prise de GHB. Fait important à mentionner, lorsque le GHB est combiné à l'alcool ou à un autre déprimeur du SNC, il y a un effet de synergie qui augmente les effets neurologiques du GHB et qui entraîne donc des symptômes plus sévères (Ferrara *et al.*, 2001). C'est ce qui cause souvent la perte de conscience chez une personne ayant ingéré du GHB alors qu'elle a déjà consommé de l'alcool. Malgré toutes les recherches complétées sur le sujet, il reste encore de nombreux éléments à éclaircir quant au principe d'action du GHB, qui est en effet fort complexe.

1.2.3.3 Pharmacocinétique

Du fait que le GHB est une petite molécule (p.m. 104,1045 g/mol) très soluble dans l'eau ne se liant pratiquement pas aux protéines du plasma, il est rapidement absorbé

au niveau de l'intestin. Sa concentration maximale est atteinte entre 20 et 40 minutes après l'ingestion et dépend de la dose initiale ingérée. La cinétique du GHB est non-linéaire. Une faible augmentation de la dose augmente de façon disproportionnée les effets de cette substance (Lefebvre, 1997). À faible dose (entre 0,5 et 2 g), le GHB présente un effet euphorisant, anxiolytique et augmente la socialisation, tout en occasionnant une légère difficulté motrice. À une dose entre 2,5 et 3 g, il entraîne des vomissements, de la bradycardie et de l'amnésie. Entre 3 et 4 g, il provoque une perte de conscience et à des doses encore plus élevées, il cause une dépression respiratoire, le coma ou même la mort (Madea et Mußhoff, 2009).

Le temps de demi-vie du GHB est très court, soit entre 30 et 50 minutes, ce qui indique que le GHB est rapidement métabolisé. Cela explique la courte fenêtre de détection du GHB dans le sang et l'urine. Ces matrices biologiques usuelles sont donc limitées pour prouver une ingestion de GHB exogène. En contrepartie, le cheveu s'avère une matrice alternative intéressante du fait que plusieurs drogues en circulation dans le corps, dont le GHB, sont incorporées dans les cheveux au fur et à mesure de leur croissance (Pragst et Balikova, 2006). Cela permet une détection du GHB sur une période de temps beaucoup plus grande : des mois voire des années.

Seulement environ 2,5 % du GHB est excrété directement dans l'urine sans être modifié (Busardò, Francesco P. et W. Jones, 2015). Parmi les métabolites du GHB formés dans le corps se trouvent le GHB-glucuronide et le GHB-sulfonate. En effet, ces deux métabolites ont été retrouvés dans l'urine suite à une consommation de GHB (Hanisch *et al.*, 2016; Petersen *et al.*, 2013)

1.3 Méthodes de dépistage dans les cheveux

1.3.1 Développement et structure du cheveu

Pour comprendre le processus de pénétration des drogues dans les cheveux et savoir comment il est possible de les extraire, il faut d'abord bien connaître la constitution des cheveux humains.

1.3.1.1 Structure du follicule pileux

Le cheveu prend naissance dans le follicule pileux constitué de différentes couches de cellules. La couche la plus externe du follicule pileux est la gaine externe qui est en fait un prolongement de l'épiderme de la peau. Juste à l'intérieur de la gaine externe se trouve la gaine interne qui entoure la fibre de cheveu qui pousse (Tracqui, 1996). Cette fibre est elle-même constituée de 3 parties distinctes. La cuticule, composée de cellules aplaties superposées donnant un aspect d'écailles, forme la couche externe du cheveu (Tracqui, 1996). Son rôle est de protéger les fibres internes du cheveu. Il peut toutefois être endommagé par la chaleur, par la lumière ou par un procédé chimique comme une teinture ou une décoloration (Harkey, 1993). À l'intérieur de la cuticule se trouve le cortex, partie la plus importante du cheveu. Il est composé de longues cellules kératinisées formant des filaments. Finalement, au centre du cortex se trouve la médulla. Cependant, chez les humains, la médulla ne représente qu'un très faible pourcentage des cellules du cheveu et peut même être complètement absente (Harkey, 1993). Toutes les cellules formant la cuticule, le cortex et la médulla du cheveu proviennent des cellules germinatives du bulbe de type kératinocyte, situées à la base du follicule pileux (Pragst et Balikova, 2006). Au centre du bulbe, une saillie de cellules

forme le derme papillaire. Une membrane basale sépare ces cellules des cellules germinatives du bulbe. Un autre type de cellules, les mélanocytes, se trouvent au niveau de cette membrane basale. Celles-ci produisent la mélanine qui est responsable de la pigmentation des cheveux. Un réseau de vaisseaux sanguins entoure les follicules pileux et permet un apport constant des nutriments nécessaires à la croissance du cheveu. (Pragst et Balikova, 2006)

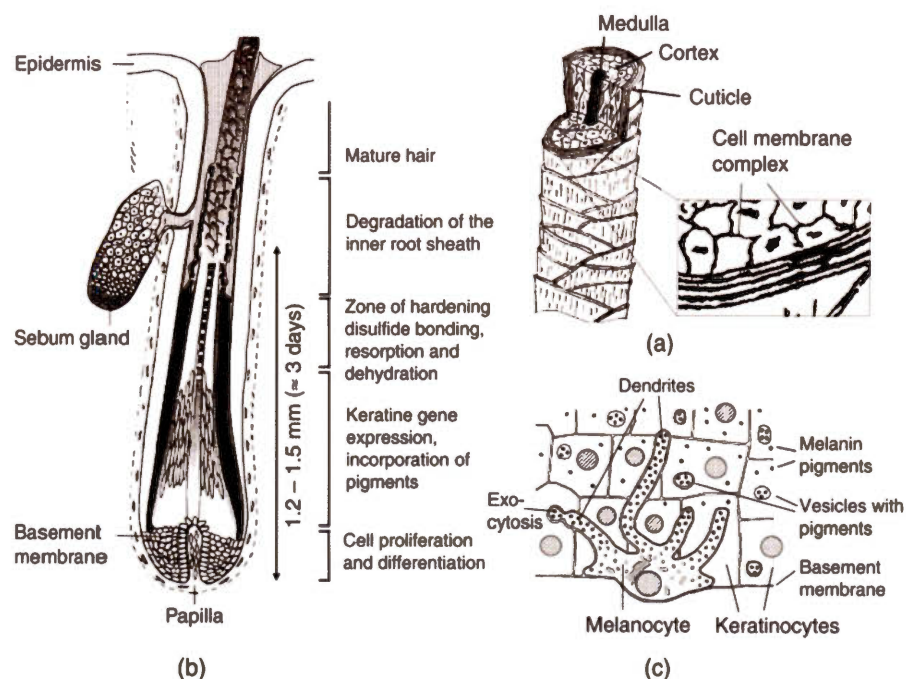


Figure 1.3 : Structures du follicule pileux et du cheveu (Pragst et Balikova, 2006).

1.3.1.2 Composition chimique

Le cheveu est composé majoritairement de kératine, une protéine contenant une grande proportion de cystéines. Cet acide aminé contient un groupement sulfhydrile (SH) qui peut former un pont disulfure avec le groupement SH d'une autre cystéine se trouvant

dans un filament de kératine voisin. Le réseau de filaments de kératine ainsi formé est très solide et très stable, principalement grâce à ces liaisons S-S. Cet assemblage de kératine est schématisé dans la Figure 1.4 suivante. La kératine du cheveu contient également plusieurs autres groupements fonctionnels tels des groupements acides, basiques et amides qui peuvent lier de petites molécules. Une très faible proportion du cheveu (entre 1 et 9%) est constituée de lipides qui proviennent du sébum. (Harkey, 1993)

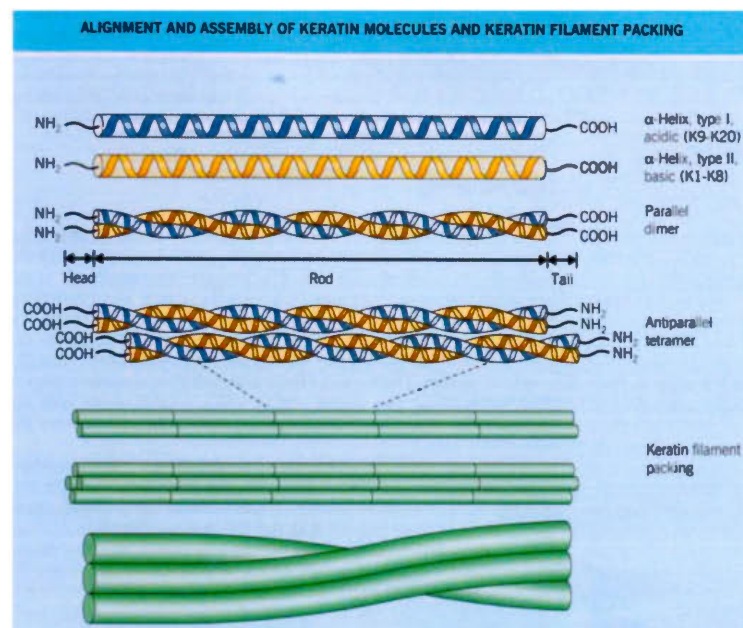


Figure 1.4 : Assemblage des filaments de kératine (White, 2017).

1.3.1.3 Croissance du cheveu

La pousse du cheveu n'est pas constante. Elle se fait par cycles à 3 phases schématisés à la Figure 1.5. La première phase est la phase anagène ou d'élongation du cheveu. Environ 85% des cheveux se trouvent dans cette phase (Cooper, 2011), qui dure entre

2 et 6 ans (White, 2017). Lors de cette phase, l'activité mitotique des cellules germinatives et leur différenciation sont importantes. Les cellules produites, les kératinocytes, augmentent de volume et leur forme s'allonge. Cela se fait de manière continue, entraînant le follicule plus profondément dans le derme. Les cellules passent ensuite de la zone de prolifération vers la zone de kératinisation. C'est dans cette zone que les kératinocytes synthétisent les filaments de kératine qui remplissent les cellules. (Harkey, 1993) Pendant ce temps, les mélanocytes produisent la mélanine, le pigment responsable de la couleur des cheveux, qui est transportée par des vésicules dans les kératinocytes. Les membranes des vésicules y sont alors phagocytées, libérant la mélanine. Les filaments de kératine fusionnent entre eux et solidifient le cheveu en formant les ponts disulfures entre leurs cystéines. C'est lors de cette étape de solidification que les cellules meurent, se déshydratent et se décomposent (Pragst et Balikova, 2006). Les zones décrites sont représentées dans la Figure 1.5.

Après la période de croissance active du cheveu, les cellules cessent de se diviser et la base du cheveu se kératinise au complet. Il s'agit de la phase catagène ou de cessation d'activité, période durant laquelle il y a également régression du bulbe. Les vaisseaux sanguins du derme papillaire sont également dégénérés (Harkey, 1993). Cette phase dure entre 2 et 3 semaines (White, 2017).

La dernière phase est la phase télogène ou d'élimination du cheveu. Environ 15% des cheveux sont dans cet état. Pendant cette période qui perdure entre 2 et 3 mois, il n'y a plus aucune croissance. À ce moment, le follicule est plus court et la racine du cheveu y est moins rattachée. Le cheveu est alors plus fragile et plus susceptible d'être arraché de la tête. Suite à la phase télogène, un nouveau follicule se forme et un nouveau cheveu commence à pousser, faisant éventuellement tomber l'ancien cheveu, s'il n'est pas déjà tombé. (Harkey, 1993)

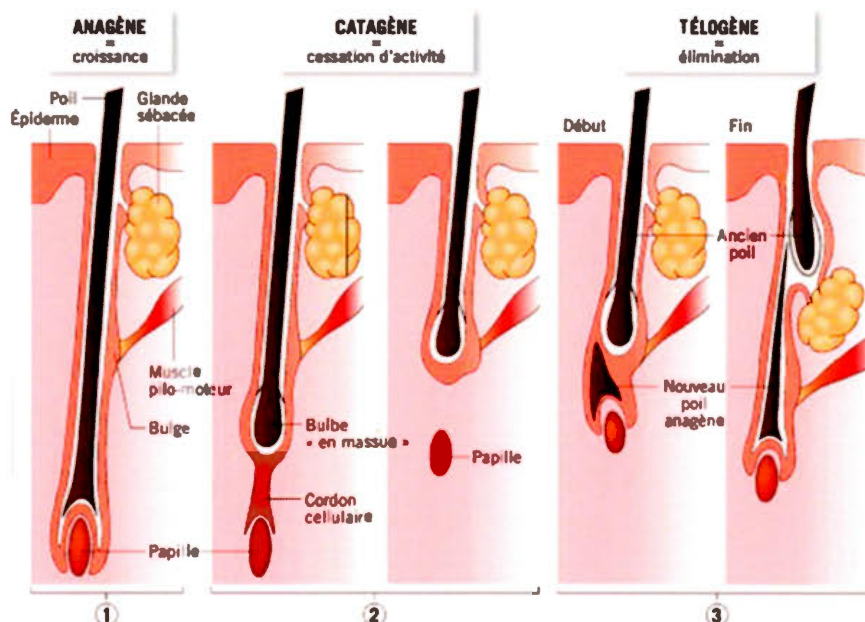


Figure 1.5 : Étapes de croissance du cheveu (<http://www.medecine-esthetique-costa.com/micro-greffe/cycle-et-origine-de-la-perde-des-cheveux/>).

Le taux de croissance moyen des cheveux est de 1,1 cm par mois. Or, il s'agit seulement d'une moyenne. Lors de l'analyse d'un spécimen de cheveux, il est important de valider le taux de croissance pour cette personne étant donné que des taux de pousse variant entre 0,6 et 3,36 cm par mois ont déjà été observés. De plus, lors du prélèvement qui se fait au niveau du cuir chevelu, une petite partie du cheveu reste à l'intérieur. L'extrémité coupée ne correspond pas au temps présent, mais à la pousse d'il y a 7 à 10 jours, puisque c'est le temps nécessaire pour que le cheveu fraîchement produit sorte du cuir chevelu. (Cooper, 2011)

1.3.1.4 Glandes associées aux cheveux

Chez l'humain, il existe trois types de glandes associées aux follicules pileux : les glandes sébacées, sudoripares eccrines et celles apocrines. Cependant, les glandes

apocrines ne se retrouvent pas au niveau des cheveux. Les glandes sébacées produisent une substance grasse appelée sébum. Elles sont directement reliées aux follicules des cheveux par leur conduit qui se termine dans le tiers supérieur du follicule. Cela fait en sorte que juste avant de sortir du cuir chevelu, tous les cheveux sont en présence de sébum. Tout comme le derme papillaire, la glande sébacée est hautement vascularisée. Les glandes eccrines sont quant à elles adjacentes aux follicules pileux, mais leur conduit se termine directement à l'extérieur de la tête. Ces glandes produisent une sécrétion aqueuse contenant principalement des sels comme le sodium et le potassium. Il s'est déjà avéré que des drogues soient excrétées par ces 2 types de glandes. (Harkey, 1993)

1.3.2 Mécanisme d'incorporation des molécules dans les cheveux

Lors de l'interprétation des résultats, il est primordial de bien connaître les mécanismes d'incorporation des drogues dans les cheveux et les facteurs qui influencent ce processus. À ce jour, les mécanismes exacts ne sont pas clairs, mais il en existe 3 principaux proposés et acceptés par la communauté scientifique.

Le premier modèle d'incorporation proposé consiste en la diffusion passive des molécules de la circulation sanguine vers les cellules germinatives en prolifération au niveau du bulbe du cheveu (Henderson, 1993). Comme expliqué dans la sous-section 1.3.1.3, les kératinocytes migrent vers la zone où il y a kératinisation puis meurent, libérant ainsi les drogues qui vont rester emprisonnées dans la kératine. Cette méthode de diffusion est possible, car le bulbe est entouré d'un vaste réseau de capillaires. Pour y parvenir, la molécule doit soit traverser la membrane lipidique ou passer entre les cellules. La facilité d'une molécule à traverser la membrane lipidique va dépendre de son coefficient de partition octanol-eau (P), donc de sa lipophilie. Plus P est élevé, plus

le passage sera facile et plus il y aura de diffusion à travers la membrane cellulaire (White, 2017). Les drogues acides ou basiques fortement ionisées au pH physiologique peuvent réussir à traverser la membrane cellulaire en devenant neutre suite à une déprotonation ou une protonation, selon le cas. Le pKa de la molécule et le pH cellulaire sont donc des facteurs importants. Le pH des kératinocytes et des mélanocytes est plus faible que celui du plasma. Les molécules basiques non protonnées vont traverser la membrane cellulaire et devenir protonnées, empêchant ainsi leur retour dans le plasma. Les molécules acides seront quant à elles davantage protonnées dans le plasma beaucoup plus basique et n'auront donc pas tendance à traverser la membrane cellulaire. Un autre facteur qui favorise le passage des molécules basiques est leur liaison à la mélanine, le pigment des cheveux. En effet, une étude a montré que les drogues basiques étaient retrouvées à une concentration 10 fois plus élevée dans les cheveux pigmentés que dans les cheveux blancs. Il a également été démontré que cette différence n'était pas observée pour les composés neutres (Pragst et Balikova, 2006). Une étude sur l'analyse du GHB (qui est une molécule acide) dans les cheveux a démontré que la concentration en GHB obtenue était indépendante de la couleur des cheveux, ce qui montre une fois de plus que seules les molécules basiques se lieraient à la mélanine (Xiang *et al.*, 2015). Pour les petites molécules organiques hydrophiles, le passage peut se faire via des pores aqueux présents dans la membrane cellulaire. Les petites molécules organiques peuvent également traverser vers la couche de cellules du bulbe via le liquide interstitiel entourant ces cellules, sans même pénétrer dans ces cellules. En résumé, les principales propriétés d'une molécule qui affecte sa diffusion passive sont son hydrophobicité, son pKa, sa grosseur et sa forme, son affinité pour la mélanine et son pourcentage de liaison aux protéines plasmatiques (White, 2017). Dans le cas du GHB, c'est le très faible taux de liaison aux protéines plasmatiques, le faible poids moléculaire et l'hydrophilie qui favorisent le passage de cette molécule vers les cellules du bulbe du cheveu.

Le deuxième mécanisme d'incorporation implique les sécrétions des glandes sébacées et eccrines, après la formation des cheveux. Des études ont démontré que plusieurs drogues d'abus étaient retrouvées dans la sueur et ce, en plus grande concentration que dans le sang. Comme mentionné dans la section précédente, les cheveux baignent dans le sébum juste avant leur sortie du cuir chevelu et les sécrétions sudoripares sont en contact avec le cheveu à sa sortie. Il semblerait qu'il y ait donc un transfert des drogues contenues dans ces sécrétions vers les cheveux. Cependant, étant donné qu'à ce moment le cheveu est déjà formé, les molécules sont probablement liées moins fortement au cheveu et peuvent donc être enlevées lors de l'étape de lavage. Le même processus peut se produire, mais avec des contaminations venant de l'environnement. Par exemple, les drogues qui sont absorbées par inhalation de la fumée comme la marijuana se retrouvent dans l'air et peuvent contaminer les cheveux en allant s'adsorber en surface (Henderson, 1993).

Un dernier mécanisme pouvant contribuer à l'incorporation des drogues dans les cheveux serait un apport retardé par les compartiments profonds de la peau. En effet, il s'est avéré que l'épiderme et l'hypoderme de la peau étaient un réservoir pour les drogues lipophiles, que celles-ci venaient de l'environnement ou de la circulation sanguine. Les drogues emmagasinées sont relâchées lentement dans le milieu environnant. Or, le follicule pileux se trouve dans cet environnement et peut donc recevoir la drogue de cette façon, de manière retardée (Henderson, 1993). Pour le GHB qui est très polaire, ce mécanisme ne devrait pas être très important.

Tous ces mécanismes d'incorporation sont schématisés sur la Figure 1.6. Ce schéma montre également qu'il peut y avoir une perte des molécules se trouvant dans les cheveux. En effet, certaines drogues voient leur concentration diminuer de la racine vers l'extrémité du cheveu, lors d'une consommation constante de la drogue. Cette diminution est influencée par la structure chimique de la drogue en question. Une étude

a démontré que plus la molécule est polaire, plus elle est stable dans le cheveu et donc moins la diminution avec le temps est importante. Lorsque les cheveux subissent de simples traitements comme des lavages au shampoing, il n'y a pratiquement pas d'impact sur la détection des drogues dans les cheveux. Cependant, les traitements qui endommagent les cheveux comme les teintures, les décolorations ou les permanentes engendrent parfois une élimination des drogues, car celles-ci deviennent alors plus accessibles. Le soleil, la pluie et le vent peuvent aussi causer des dommages aux cheveux et causer une légère perte des molécules qui s'y trouvent (Pragst et Balikova, 2006).

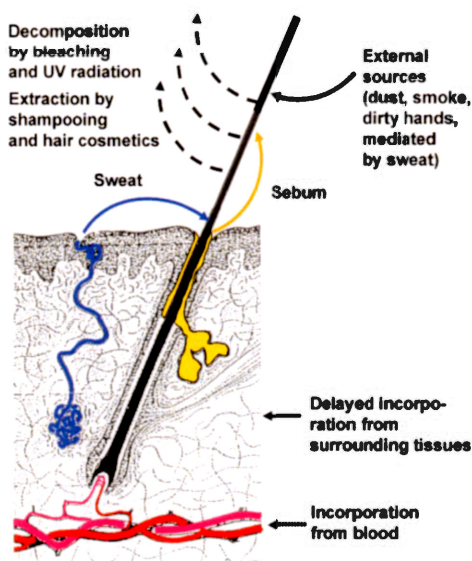


Figure 1.6 : Mécanismes d'incorporation et d'élimination des molécules dans les cheveux (Pragst et Balikova, 2006).

1.3.3 Procédures analytiques

Le cheveu est une matrice plus complexe que le sang ou l'urine car, il est sous forme solide et non liquide. Pour utiliser cette matrice lors d'un dépistage de drogues, il y a

plusieurs étapes à suivre. Ces étapes sont expliquées dans le guide de la *Society of Hair Testing* (SoHT) qui a établi une procédure à ce sujet (Cooper *et al.*, 2012). Les étapes sont résumées ci-après.

1.3.3.1 Prélèvement des cheveux

Le guide de la SoHT décrit les procédures à suivre pour prélever le spécimen de cheveux. Tout d'abord, la zone de prélèvement privilégiée se situe au niveau du vertex postérieur car à cet endroit, moins de fluctuations sont observées dans le taux de croissance des cheveux. La grosseur de la mèche doit être d'environ 5 mm de diamètre afin de s'assurer d'avoir suffisamment de cheveux pour compléter toutes les expertises nécessaires, incluant une possible analyse de confirmation. La mèche est attachée à l'aide d'une ficelle près de la tête, puis coupée le plus près possible du cuir chevelu à l'aide de ciseaux affilés. L'extrémité coupée doit être bien identifiée. Elle est ensuite enveloppée dans du papier d'aluminium puis placée dans une enveloppe identifiée. L'enveloppe doit être rangée dans un endroit sec à température pièce à l'abri de la lumière. Quelques détails sont pris en note, comme la couleur des cheveux, leur longueur et les traitements (teinture ou autre) qu'ils ont subis. Dans un cas où un crime a été commis, il faut noter la date présumée de l'événement. Le prélèvement doit être fait minimalement 4 semaines après l'incident pour laisser le temps aux cheveux de pousser et de sortir de l'épiderme. Si un spécimen de cheveu s'avère positif pour la drogue testée, un 2^e prélèvement devrait être fait pour confirmer à la fois le taux de pousse et la présence de la drogue (Cooper, 2011; Cooper *et al.*, 2012).

1.3.3.2 Préparation des échantillons

La préparation des échantillons comprend le lavage et la segmentation des cheveux. L'étape du lavage est très importante, d'abord pour enlever tout ce qui se trouve en surface du cheveu comme le sébum, la sueur, les résidus de produits pour les cheveux ou encore les saletés. Cela permet d'éviter que ces éléments créent de l'interférence ou diminuent l'efficacité de l'extraction des molécules d'intérêt. Le 2^e objectif du lavage est d'éliminer toute trace des molécules d'intérêt qui pourraient se trouver en surface suite à une contamination environnementale, comme entre autres le sébum. Il n'existe pas de méthode de lavage universelle, car les drogues ne se comportent pas toutes de la même façon aux différents lavages. Pour chaque drogue, il faut effectuer des tests pour savoir quelle procédure de lavage est efficace. Afin d'être considérée efficace, le lavage doit éliminer toutes sources de contaminations extérieures sans toutefois extraire les drogues incorporées dans les cheveux (Cooper *et al.*, 2012). La littérature rapporte que le solvant le plus utilisé pour le lavage des cheveux lors de l'analyse de GHB est le dichlorométhane. La plupart l'utilise seul (Bertol *et al.*, 2012; Bertol *et al.*, 2015; Busardò, Francesco P. *et al.*, 2016; Cirimele *et al.*, 2010; Kintz *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2009; Vaiano *et al.*, 2016). D'autres ajoutent à ce lavage un lavage à l'eau et un au méthanol ou à l'acétone (Goullé *et al.*, 2003; Hari *et al.*, 2013; Jagerdeo *et al.*, 2014). De cette façon, la recommandation de la SoHT d'effectuer à la fois un lavage avec un solvant organique et avec une solution aqueuse est respectée (Cooper *et al.*, 2012).

Après le lavage, les mèches peuvent être coupées en segments de longueur déterminée afin d'établir l'historique de consommation de la drogue analysée. Cependant, il faut d'abord aligner l'extrémité coupée à la racine de tous les cheveux de la mèche pour éviter qu'un décalage des cheveux cause un biais dans les concentrations sur une période de temps donnée. Dans les méthodes publiées pour l'analyse du GHB, la majorité des chercheurs ont utilisé des segments de 3 mm, mais d'autres ont utilisé des

segments allant jusqu'à 10 mm, ce qui donne des informations moins précises quant au moment de la prise de drogue (Bertol *et al.*, 2015; Busardò, Francesco P. *et al.*, 2016; Cirimele *et al.*, 2010; Goullé *et al.*, 2003; Kintz *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2009; Vaiano *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016).

1.3.3.3 Extraction des molécules

Avant de pouvoir les analyser, il faut libérer les drogues emprisonnées dans la kératine du cheveu. Pour ce faire, il existe plusieurs méthodes : la digestion alcaline, la digestion acide, la digestion enzymatique et l'extraction par différents solvants. Lors de cette étape, il est important que la molécule soit libérée de la matrice sans être modifiée chimiquement. Il n'existe pas de protocole d'extraction universel qui soit optimal pour toutes les molécules. Lorsque vient le temps de choisir une méthode, il faut tenir compte de la structure de la molécule à extraire et de sa sensibilité face aux différents agents d'extraction. L'extraction par un solvant implique de récupérer les analytes sans digérer les cheveux. Ces derniers sont placés dans le solvant, par exemple le méthanol ou l'acétonitrile, puis le mélange est placé dans un bain ultrason. Le solvant pénètre alors dans le cheveu et le fait gonfler, libérant par diffusion les molécules piégées. Il existe des méthodes plus avancées pour extraire les molécules, l'extraction assistée par micro-ondes et l'extraction micro-pulvérisée lors desquelles les cheveux sont pulvérisés pendant l'extraction pour augmenter la surface de contact des cheveux au solvant. La digestion enzymatique s'effectue à l'aide d'enzymes comme la β -glucuronidase/arylsulfatase ou la protéinase E. (Vogliardi *et al.*, 2015). Ces enzymes clivent certaines liaisons peptidiques spécifiques de la kératine. La digestion basique permet quant à elle de briser les liens disulfures entre les cystéines de la kératine (Horvath, 2009), occasionnant ainsi la désintégration du cheveu et la libération des molécules y étant emprisonnées.

Dans le cas de l'analyse du GHB, la méthode principalement utilisée est la digestion basique avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH). Toutefois, la concentration, la température et la durée de la digestion peuvent varier d'une méthode à l'autre. Par exemple, Goullé (2003), Stout (2010), Bertol (2014), Jagerdeo (2014), Shi (2016), Vaiano (2016) et Busardo (2016) ont tous opté pour une digestion rapide entre 10 et 30 minutes dans du NaOH 1 M à une température variant entre 90 et 100°C. Kintz (2003), Rossi (2009), Cirimele (2010) et Bertol (2012) ont quant à eux opté pour une concentration de NaOH de 0,01 M et une température de 56°C. Toutefois, ils ont dû augmenter le temps d'hydrolyse à 16 heures. Dans leur étude faite en 2003, Goullé *et al.* ont testé différents milieux de digestion pour analyser le GHB dont le NaOH à 3 différentes concentrations, l'acide sulfurique, l'acide chlorhydrique, le méthanol et l'eau. Ils ont déterminé que la meilleure extraction était obtenue avec le NaOH 1 M 15 minutes à 95°C et ont ensuite comparé les autres méthodes avec celle-ci. Il s'est avéré que la digestion avec le NaOH 0,1 M pendant 16 heures donnait le même rendement de digestion alors que les digestions acides donnaient des rendements d'environ 75%. Les extractions dans le méthanol ou l'eau ont donné de faibles rendements (< 50%). Cela semble appuyer le choix de digestion des autres chercheurs d'opter pour une digestion basique. Il est à noter que dans le cas du GHB, une digestion acide n'est pas souhaitable, car cette molécule se cyclise pour former du GBL en milieu acide (LeBeau *et al.*, 2000).

1.3.3.4 Analyses par CG-SM/SM et CL-SM/SM

Pour analyser les drogues et leurs métabolites dans les cheveux, les principales méthodes utilisées sont la chromatographie liquide (CL) et la chromatographie gazeuse (CG), toutes deux couplées à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM et CG-SM/SM, respectivement) (Baciu *et al.*, 2015). Cela s'explique par la grande sensibilité

et la grande spécificité de ces instruments. La spécificité est cruciale pour s'assurer de détecter les bonnes molécules. La sensibilité est également importante puisque certaines drogues sont retrouvées en faibles concentrations, voire jusqu'à l'état de trace (ng/mg) dans les cheveux (Pragst, 2005).

1.3.3.4.1 Principe de la CG

La chromatographie en phase gazeuse (CG) est une technique de séparation au cours de laquelle les molécules sont vaporisées à l'injecteur puis transportées à travers la colonne chromatographique par un gaz vecteur inerte. Les molécules sont séparées selon leur point d'ébullition et leur affinité pour la phase stationnaire de la colonne. Dans ce type de chromatographie, il n'y a pas d'interaction entre les analytes et le gaz vecteur de la phase mobile, ce dernier servant seulement pour le transport. Pour pouvoir utiliser ce type de chromatographie, les molécules à analyser doivent être volatiles (Skoog *et al.*, 1997).

1.3.3.4.2 Principe de la CL

La chromatographie en phase liquide (CL) utilisée pour l'analyse de molécules dans les cheveux est de type chromatographie de partage. Elle sépare les analytes selon leur affinité avec la phase stationnaire et la phase mobile. En phase normale, la phase stationnaire est polaire et la phase mobile est non polaire. Les molécules polaires sont donc davantage retenues que les molécules non polaires. En phase inverse, c'est le contraire. Les molécules non polaires sont davantage retenues par la colonne qui possède une phase stationnaire non polaire. La phase mobile initiale est fortement

aqueuse, puis sa polarité est diminuée pour faire éluer les composés non polaires. La chromatographie HILIC (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) est un autre type de chromatographie liquide parfois utilisé pour l'analyse de molécules dans les cheveux (Quintela *et al.*, 2010; Yaldiz *et al.*, 2013). Le principe de la HILIC ressemble davantage à celui de la chromatographie en phase normale, car la phase stationnaire est polaire et souvent chargée. La phase mobile est quant à elle un solvant organique avec une teneur en eau. Cette partie aqueuse de la phase mobile participe à la constitution de la phase stationnaire en s'adsorbant à la surface de celle-ci qui est polaire. Plusieurs mécanismes influencent la rétention des molécules polaires. Ces dernières sont d'une part retenues grâce au partitionnement hydrophile. Plus elles sont hydrophiles, plus elles font des échanges dynamiques de l'éluant vers la couche aqueuse, le tout résultant en une meilleure rétention chromatographique. Les molécules polaires peuvent également former des liens ponts hydrogène avec la couche aqueuse, mais également des liens ioniques avec la phase stationnaire si celle-ci est chargée. Ces possibilités augmentent grandement la rétention des composés sur ce type de colonne. En HILIC, la présence de sels dans les phases mobiles est aussi importante pour augmenter la rétention des molécules. Cela s'explique par le fait que les sels, qui sont plus solubles dans l'eau que dans le solvant organique, vont se placer dans la couche aqueuse se trouvant à la surface de la phase stationnaire et vont ainsi soit augmenter l'hydrophilie de cette couche aqueuse ou augmenter son volume (Chirita, 2009). Les deux principaux sels utilisés en chromatographie HILIC sont l'acétate et le formate d'ammonium, car ce sont des sels assez solubles dans des solutions à haute teneur en solvant organique. De plus, ils sont volatiles et compatibles avec l'ionisation à pression atmosphérique par nébulisation électrostatique rencontrée en spectrométrie de masse.

1.3.3.4.3 Principe de la SM

La spectrométrie de masse est une méthode de détection qui comprend quatre étapes : l'ionisation, l'analyse, la détection et le traitement du signal (Watson et Sparkman, 2007). Les molécules provenant soit de la CG ou de la CL pénètrent dans la source du spectromètre pour y être ionisées et amenées à l'état gazeux, si ce n'est pas déjà le cas. Il existe plusieurs méthodes d'ionisation, mais les principales utilisées pour l'analyse du GHB dans les cheveux sont par impact électronique (EI) lorsque le spectromètre est couplé à la CG et par nébulisation électrostatique en mode négatif (ESI⁻) lorsqu'il est couplé à la CL. Après cette première étape, les molécules ionisées sont séparées par l'analyseur de masse selon leur rapport masse / charge (m/z). Il existe différents types d'analyseurs de masse, mais celui couramment utilisé pour les analyses de drogues dans les cheveux est l'analyseur quadripolaire. Ce-dernier est composé de quatre électrodes parallèles. Les électrodes opposées sont de même potentiel et celles adjacentes sont de potentiel opposé. Elles sont soumises à un courant continu (U) et à un courant alternatif (V). Les ions qui sortent de la source d'ionisation sont accélérés dans l'espace entre les 4 électrodes. Pour chaque combinaison spécifique de U et V, seuls les ions d'un ratio m/z particulier vont avoir une trajectoire stable et vont ainsi pouvoir traverser le quadripôle pour atteindre le détecteur. Les autres ions vont entrer en collision avec les électrodes.

La spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) couple deux quadripôles un à la suite de l'autre, séparés par une cellule de collision. Le premier quadripôle sélectionne un ion précurseur qui va ensuite être accéléré dans une cellule de collision où il va subir une fragmentation. Puis les ions filles ou résultants ainsi formés vont être à leur tour séparés dans le 2^e quadripôle selon leur ratio m/z . Cela permet d'être beaucoup plus spécifique quant aux molécules détectées étant donné que différentes molécules ayant le même ratio m/z vont former des ions filles différents.

1.3.3.4.4 Méthodes d'analyse pour le GHB

Suite à la digestion des cheveux, la majorité des auteurs ayant travaillé sur la détection du GHB exogène dans les cheveux ont utilisé une extraction liquide-liquide avec de l'acétate d'éthyle pour récupérer le GHB du digestat (Bertol *et al.*, 2012; Bertol *et al.*, 2015; Busardò, Francesco P. *et al.*, 2016; Cirimele *et al.*, 2010; Goullé *et al.*, 2003; Kintz *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2016; Stout *et al.*, 2010; Vaiano *et al.*, 2016). Pour ce faire, ils ont acidifié le digestat avec de l'acide chlorhydrique, de l'acide sulfurique ou de l'acide acétique avant d'ajouter l'acétate d'éthyle, d'agiter puis de centrifuger. Le surnageant organique est ensuite évaporé. Pour les méthodes en CG-SM/SM, le résidu est dérivé avec du BSTFA (N,O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide) pour le rendre volatile (Bertol *et al.*, 2012; Cirimele *et al.*, 2010; Goullé *et al.*, 2003; Kintz *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2016; Vaiano *et al.*, 2016), alors que pour les méthodes en CL-SM/SM, il est reconstitué dans le solvant d'injection (Bertol *et al.*, 2015; Busardò, Francesco P. *et al.*, 2016; Hari *et al.*, 2013; Jagerdeo *et al.*, 2014; Stout *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016). Ces méthodes permettent de concentrer les échantillons. Les colonnes chromatographiques utilisées pour l'analyse du GHB en CG rapportées dans la littérature sont les colonnes capillaires apolaires HP-1 et HP-5 commercialisées par *Agilent*. Pour la CL, le type de colonne est plus diversifié. Plusieurs auteurs ont utilisé des colonnes chromatographiques entre 5 cm et 15 cm de longueur dont la phase stationnaire contenait des chaînes C18 avec quelques petites variantes concernant la base en silice (Stout *et al.*, 2010; Bertol *et al.*, 2012; Bertol *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). Seuls Stout et son équipe ont réussi à obtenir un temps de rétention relativement long avec ce genre de colonne, soit de 2,4 minutes, comparativement aux autres chercheurs qui ont obtenu des temps de rétention très courts (entre 0,45 et 1,01 minute) étant donné la polarité de la molécule. Hari *et al.* ont opté pour la colonne *Hypercarb* qui est une colonne en phase inverse qui retient bien les molécules polaires. La

longueur de la colonne et le temps de rétention du GHB ne sont toutefois pas indiqués. Jagerdeo *et al.* ont quant à eux opté pour la colonne *Acclaim Trinity P1* de 15 cm qui comportait des fonctionnalités de la phase inverse et de l'échange de cations et d'anions. Avec cette colonne, ils ont réussi à obtenir un temps de rétention de 7,7 minutes pour le GHB.

Les niveaux endogènes de GHB obtenus par les différents auteurs se situaient majoritairement entre 0,2 et 2 ng/mg de cheveux, mais deux articles ont présenté des concentrations endogènes allant jusqu'à 12 ng/mg (Cirimele *et al.*, 2010; Kintz *et al.*, 2003).

Pour ces études, les limites de détection rapportées étaient en général plus faibles lorsque l'analyse se faisait par CG-SM/SM (maximum 0,1 ng/mg versus entre 0,2 et 0,5 ng/mg pour la CL-SM/SM). L'avantage principal de la CL-SM/SM est de pouvoir éviter l'étape de dérivation qui doit être optimisée et qui requiert une préparation d'échantillons plus simple.

Wang *et al.* (2016) ont également analysé le GHB-glucuronide (un des métabolites du GHB) dans les cheveux. Ils ont conclu que les niveaux de GHB-glucuronide restaient relativement constant et faibles dans cette matrice, même en cas d'ingestion de GHB. Busardò *et al.* (2017) ont eux aussi analysé le GHB-glucuronide et ont obtenu des résultats similaires à ceux de Wang et son équipe. Cependant, aucun article n'a mentionné l'analyse du métabolite GHB-sulfonate.

1.3.3.5 Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats demeure une étape importante lors de l'analyse de drogues dans les cheveux; que ce soit l'interprétation de la concentration obtenue ou l'interprétation de la date de consommation. Tout d'abord, l'interprétation adéquate de la concentration de l'analyte doit tenir compte d'une possible contamination extérieure, de l'état des cheveux et de leur pigmentation. Tel qu'expliqué précédemment, il y a un risque de contamination externe des molécules d'intérêt. Il faut donc s'assurer par des tests que le lavage effectué déloge bien ces contaminations. De plus, l'aspect des cheveux est important. Si ceux-ci sont abîmés ou s'ils ont été décolorés ou teints, il est probable qu'il y ait eu une certaine perte des molécules qui s'y trouvaient, diminuant ainsi la concentration obtenue. Cependant, il est rare qu'une molécule dans les cheveux ne puisse pas être détectée suite aux traitements subis. La pigmentation influence quant à elle l'incorporation des drogues basiques, comme mentionné précédemment. Des concentrations plus élevées en drogues basiques sont habituellement retrouvées dans les cheveux plus foncés. De plus, il n'y a pas de corrélation directe entre la dose administrée et la concentration obtenue dans les cheveux. En effet, une même dose peut donner des concentrations très différentes dans les cheveux d'un individu à l'autre. Un bon exemple de cela est l'étude rapportée par Bertol *et al.* en 2014 au cours de laquelle une même dose de GHB avait été administrée à 12 personnes. Les augmentations de concentrations observées dans les cheveux n'étaient pas toutes du même ordre. À titre d'exemple, une était passée de 0,6 à 1,4 ng/mg alors qu'une autre beaucoup plus marquée était passée de 1,8 à 7,12 ng/mg, une augmentation beaucoup plus marquée. Pour toutes ces raisons, il est donc impossible de déterminer pour une substance donnée quelle a été la dose administrée à partir de sa concentration dans les cheveux. (Baciu *et al.*, 2015)

Pour ce qui est de l'interprétation de la date d'ingestion, il faut d'abord tenir compte de l'aspect du prélèvement. En effet, il peut arriver que la mèche de cheveux n'ait pas été coupée directement au niveau du cuir chevelu. Dans ce cas, il faut alors prendre en note la longueur des segments restant sur la tête. Il se peut aussi que les cheveux n'aient pas tous été coupés exactement à la même distance de la tête, étant donné sa forme naturelle plutôt arrondie. Pour limiter cette erreur, plusieurs prélèvements plus petits plutôt qu'un seul plus gros peuvent être effectués. De plus, il faut tenir compte du taux de pousse de la personne. Bien qu'une moyenne du taux de croissance ait été estimée à 1,1 cm/mois, ce taux de croissance peut être bien différent d'un individu à l'autre. Lorsqu'une mèche de cheveux s'avère positive pour une drogue quelconque, il est recommandé de procéder à un 2^e prélèvement d'abord pour confirmer la présence de la drogue, mais également pour déterminer le taux de pousse des cheveux de la personne en comparant la distance où se trouve le segment positif pour chaque mèche. Il existe également une incertitude venant du cycle de croissance des cheveux étant donné qu'entre 5 et 20 % des cheveux du crâne sont dans la phase télogène. Cela fait en sorte qu'une drogue pourrait se retrouver dans un segment beaucoup plus près du crâne si dans cette mèche se trouvent des cheveux qui sont dans cette phase de repos. Si la détection d'une drogue se prolonge sur plusieurs segments, cela ne veut pas nécessairement dire qu'il y a eu plusieurs prises de cette drogue. Cependant, étant donné le faible pourcentage de cheveux au stade de repos, la concentration dans le segment plus près de la tête devrait être plus faible que dans le segment suivant (Pragst, 2005). Lorsqu'on se trouve en présence de molécules endogènes comme dans le cas du GHB, l'effet de ce phénomène se traduirait plutôt par la présence d'un segment ayant une légère augmentation de GHB suivi d'un segment ayant une augmentation de GHB beaucoup plus marquée. Il est également possible d'avoir un étalement du pic si les cheveux de la mèche n'ont pas exactement tous le même taux de croissance.

Dans le cas de DFSA, il faut retrouver une dose unique de la drogue dans les cheveux. Or, lorsqu'il s'agit d'une molécule endogène comme le GHB, il n'est pas possible de se fier seulement à la présence ou l'absence de la molécule. Il faut plutôt comparer les concentrations de chaque segment entre eux. Dans son guide sur les analyses forensiques de DFSA publié en 2011, le UNODC (United Nations Office on Drug and Crime) a mentionné que pour déterminer la présence de GHB exogène dans les cheveux, un des segments de la mèche devait avoir une concentration de GHB au moins 10 fois supérieure à la moyenne des concentrations des autres segments. Or, Cirimele *et al.* (2010) ont déterminé que pour leurs 4 cas positifs de GHB, le facteur d'élévation de la concentration en GHB du segment positif était seulement entre 1,7 et 4,3 par rapport aux concentrations endogènes. Pour leur part, Bertol *et al.* (2014) ont analysés différents cas positifs pour lesquels les facteurs d'augmentation étaient assez variables. En effet, lorsque le prélèvement de cheveux a eu lieu un mois après la prise de GHB, les concentrations du segment positif étaient entre 3,52 et 5,63 fois supérieures aux concentrations endogènes. Ce facteur a diminué lorsque le prélèvement de la mèche a eu lieu 2 mois après la consommation. Il était alors entre 2,14 et 5,18. Ces facteurs d'augmentation sont loin du facteur minimum de 10 recommandé par l'UNODC. De plus, l'étude de Bertol *et al.* a démontré que le délai de prélèvement est important, puisqu'une perte de GHB est observable lorsqu'on s'éloigne de la racine probablement dû aux lavages répétés des cheveux. Cela a été démontré lors d'une autre étude effectuée par Busardò *et al* (2016) au cours de laquelle la décroissance du GHB le long du cheveu a été évaluée sur une période de 12 mois. Pour ce faire, ils ont effectué un prélèvement de cheveux à chaque mois pendant 12 mois sur une femme ayant rapporté avoir consommé une dose unique de GHB à une concentration autour de 37 mg/kg. La concentration en GHB du segment positif était de 4,3 ng/mg de cheveux le premier mois, alors qu'elle n'était plus que de 2,1 ng/mg après 12 mois. Lorsque ces concentrations sont comparées aux niveaux de base, cela donne des facteurs d'augmentation de 5,6 pour le premier prélèvement et de seulement 2,8 pour le douzième prélèvement. La diminution du GHB avec le temps fait que plus le délai de

prélèvement après l'incident est long, plus il risque d'être difficile de prouver la prise de GHB. Ces valeurs différentes montrent que chaque cas est unique et qu'il est donc difficile d'établir avec certitude un facteur seuil d'élévation de la concentration en GHB pour lequel un apport de GHB externe a eu lieu.

1.4 Problématique

La problématique majeure d'une analyse de GHB dans les cheveux est grandement liée à sa présence endogène dans le corps humain : ainsi, il faut être capable de discriminer la contribution endogène de celle provenant d'une ingestion externe. Or, il n'existe pas de valeur seuil de GHB au-delà de laquelle une décision peut être prise. Cela s'explique par le fait que les concentrations endogènes en GHB varient d'une personne à l'autre, comme l'ont montré Kintz *et al.* en 2003 en obtenant des concentrations endogènes de GHB variant entre 0,5 et 12 ng/mg, selon l'individu. Il y a également une variation de l'augmentation de concentration entre les individus suite à la prise d'une même dose de GHB (Bertol *et al.*, 2015). De plus, chez une même personne, les niveaux de GHB endogène varient d'un segment à l'autre (Goullé *et al.*, 2003). Une légère augmentation de la concentration peut tout aussi bien être due à un niveau endogène normal qu'à un apport extérieur de GHB, sans qu'il soit possible de faire la différence. Par exemple, dans leur étude en 2003, Goullé *et al.* ont administré à un volontaire 3 doses différentes de GHB (30, 45 et 60 mg/kg) typiquement administrées lors de DFSA. Il s'est avéré que la concentration obtenue dans le segment correspondant à la dose de 30 mg/kg ne se démarquait pas des concentrations des segments normaux. Il est donc encore difficile d'établir avec un certain niveau de certitude s'il y a bien eu consommation de GHB ou non.

1.5 Hypothèse de recherche

Comme expliqué précédemment, le métabolisme endogène du GHB implique le GABA, l'acide succinique semi-aldéhyde et l'acide succinique. Ces quatre molécules sont liées entre elles, ce qui suppose qu'une augmentation de GABA devrait engendrer une augmentation de GHB et d'acide succinique dans les mêmes proportions. Le nouvel outil proposé est de tester si les ratios $[GHB] / [GABA]$ et $[GHB] / [AS]$ restent constants d'un segment de cheveu à l'autre, chez une même personne. Ces ratios seraient donc moins variables d'un segment à l'autre que la concentration en GHB seule, ce qui permettrait de normaliser les concentrations.

Lorsque du GHB est consommé, celui-ci est principalement transformé en acide succinique au niveau du foie. Il semblerait qu'une très faible fraction seulement puisse être transformé en GABA au niveau des neurones. Il devrait donc y avoir augmentation du GHB et de l'acide succinique, mais pas du GABA, entraînant une modification des ratios pour le segment positif qui serait alors mieux détecté. En résumé, en normalisant les concentrations à l'aide des ratios, il serait possible de mieux détecter un apport externe de GHB.

1.6 Objectifs de recherche

L'objectif principal de la recherche effectuée au cours de cette maîtrise est de tenter de développer un nouvel outil d'investigation pouvant être utilisé en chimie criminalistique pour discriminer le GHB exogène dans les cheveux humains lorsque des crimes sont commis sous l'influence de cette drogue.

Pour se faire, il faudra d'abord développer une méthode analytique simple permettant d'extraire des cheveux les 3 molécules d'intérêt, soit le GABA, l'acide succinique et le GHB et de les analyser ensuite par CL-SM/SM. Les conditions chromatographiques seront d'abord optimisées, puis plusieurs paramètres de validation testés, dont la linéarité, la limite de détection et de quantification, l'effet matrice ainsi que la reproductibilité.

Une fois la méthode validée, plusieurs échantillons de cheveux de personnes n'ayant pas consommé de GHB seront prélevés et analysés. Cette démarche permettra de vérifier si l'hypothèse proposée sur les ratios s'avère juste. Finalement, des spécimens de cheveux de personnes ayant consommés du GHB seront analysés afin de vérifier l'effet d'une consommation sur les ratios.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODE

2.1 Matériels

Le GHB et le GHB-d6 ont été achetés chez Cerilliant (Round Rock, TX, États-Unis). Le GABA a été acheté chez Sigma (St-Louis, MO, États-Unis) alors que le GABA-d6 a été acheté chez Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada). L'acide succinique a été acheté chez Fluka Analytical (Buchs, Suisse) et l'acide succinique marqué au carbone 13 a été acheté chez Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA, États-Unis). L'eau utilisée pour les solutions et les dilutions est une eau ultra pure filtrée par un système Milli-Q de Millipore. L'acétonitrile, le dichlorométhane, le méthanol et l'hydroxyde de sodium ont été achetés chez EMD Millipore (Etobicoke, ON, Canada), l'acide formique chez Honeywell-Fluka (Philadelphie, PA, États-Unis) et l'acétate d'ammonium chez Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, États-Unis).

Les bombes de digestion utilisées sont des bombes de digestion en téflon de 6 mL de la compagnie Savillex achetées chez Delta Scientific Laboratory Products (Mississauga, ON, Canada). Les dilutions sont faites dans des tubes en polypropylène de 5 mL à bouchon vissant de la compagnie SARSTEDT (Nümbrecht, Allemagne). Les vials en polypropylène pour la chromatographie d'une capacité de 1,8 mL et les micro-filtres de 0,2 µm en nylon avec tubes pour la centrifugation ont été achetés chez Canadian Life Science (Peterborough, ON, Canada).

2.2 Spécimens de cheveux

À l'Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR), nous avons obtenu un certificat d'éthique dont le numéro est CER-13-192-06.25 pour encadrer notre étude et nos prélèvements de spécimens de cheveux de personnes volontaires. Deux séances de prélèvements de cheveux ont eu lieu sur le campus de l'UQTR au cours desquels 73 échantillons de cheveux de personnes ne consommant pas de GHB ont été recueillis. Une quinzaine de filles pensant avoir été intoxiquées par cette drogue se sont également portées volontaire pour participer à l'étude. Finalement, un homme consommant du GHB à l'occasion nous a fourni un spécimen de cheveux.

2.3 Développement de la méthode analytique

2.3.1 Optimisation de la chromatographie liquide

Afin d'obtenir une méthode simple d'application, notre équipe a préconisé l'utilisation d'une même colonne analytique pour l'analyse des trois composés. Malheureusement, le GABA qui n'est pas retenu sur une colonne en phase inverse à cause de sa grande polarité nous a contraints à réfléchir davantage sur la stratégie analytique que nous devons adopter. Le choix s'est donc arrêté sur une colonne de type HILIC qui est tout à fait appropriée pour analyser de petites molécules polaires comme les trois molécules d'intérêt.

Tang *et al.* (2014) ont utilisé une colonne ZIC-HILIC dont la phase stationnaire est un zwitterion pour analyser le GABA et ont affirmé que cette colonne offrait une bonne sensibilité et une bonne performance chromatographique. Étant donné l'indisponibilité

de cette colonne, nous avons opté pour une colonne similaire de la compagnie HILICON, la iHILIC® Fusion (P) PEEK, qui est également un zwitterion. La phase stationnaire de cette colonne est représentée dans la Figure 2.1.

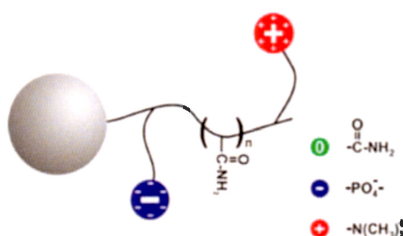


Figure 2.1: Phase stationnaire de la colonne iHILIC® Fusion (P) PEEK (www.hilicon.com/ihilic/ihilic-fusionp/).

La colonne permet la rétention des trois molécules et offre une bonne sensibilité, particulièrement pour le GABA. Une fois la colonne choisie, un premier test a été réalisé pour définir le type et la concentration de sels pouvant être utilisés dans les phases mobiles. L'acétate d'ammonium a d'abord été essayé avec des concentrations de 1, 2 et 3 mM. Le facteur limitant associé à ces concentrations en sels demeure certainement la sensibilité du GHB. En effet, nous observons que plus la concentration en sels augmente, plus le signal du GHB diminue en raison d'une suppression d'ionisation due à une plus grande quantité de sels dans la source du spectromètre de masse. Selon les résultats obtenus, la concentration de 2 mM d'acétate d'ammonium est la concentration qui permet d'obtenir le meilleur signal pour le GHB. Nous avons également testé le formate d'ammonium à 2 mM dans les phases mobiles pour voir s'il y avait une amélioration de la forme des pics. Contre toutes attentes, le formate d'ammonium ne permet pas une séparation satisfaisante entre le GHB et son isomère α -hydroxybutyrique (AHB). L'acétate d'ammonium à 2 mM a donc été choisi pour les phases mobiles. Un gradient de composition de phases mobiles a ensuite été optimisé pour les deux dilutions. Il s'est avéré que pour le GHB, un début de chromatographie avec acétonitrile présentant une teneur de 10% v/v en eau donnait le meilleur profil

chromatographique tout en permettant la séparation du GHB de son isomère AHB. Pour l'analyse du GABA et de l'AS dilués par un facteur 400, un début de chromatographie à 15% v/v en eau a permis d'obtenir un pic plus gaussien et plus intense pour l'AS. Le GABA n'a pas vraiment été affecté par un début de chromatographie plus ou moins aqueux, mis à part son temps de rétention (t_R) qui s'est avéré inférieur lorsque le pourcentage initial d'eau fut plus élevé. La pente du gradient a également été optimisée dans le but d'obtenir le plus beau profil chromatographique.

2.3.2 Optimisation de la préparation des échantillons

2.3.2.1 Lavage des cheveux

Comme mentionné dans la section 1.3.3.2, la majorité des chercheurs ayant analysé le GHB dans les cheveux ont opté pour un double lavage au dichlorométhane (DCL). Nous avons décidé d'ajouter des lavages plus polaires pour permettre l'élimination des interférences et saletés plus polaires se trouvant en surface du cheveu. Cela est d'autant plus pertinent, car il devient impératif d'éliminer toute trace de GABA, molécule polaire analysée dans notre méthode, pouvant provenir de contaminations externes. Nous avons donc opté pour trois lavages consécutifs : le premier au dichlorométhane pour enlever les interférences et saletés non-polaires comme le sébum, le second au méthanol (MeOH) pour les contaminants moyennement polaires et le dernier à l'eau pour les molécules interférentes polaires, par exemple le GABA.

Un test a été fait pour vérifier la pertinence du lavage des cheveux et l'effet du lavage au méthanol. Dans ce test, trois mèches de cheveux ont été prélevées chez une personne volontaire au niveau du vertex postérieur. Ces cheveux ont été lavés environ un jour et demi plus tôt. Selon le protocole établi, une première mèche n'a pas été lavée alors

qu'une seconde a été lavée à la fois au dichlorométhane et à l'eau. La troisième cette fois-ci a été lavée avec les trois différents solvants. Par la suite, les trois mèches ont été analysées. Afin de vérifier la pertinence du lavage, les résultats de la mèche non lavée et ceux de la mèche lavée avec deux solvants ont été comparés entre eux. Étonnamment, il a été observé que des concentrations plus faibles en GHB, GABA et AS ont été obtenues avec la mèche sans lavage qu'avec la mèche avec deux lavages. Cela est montré par le premier ratio présent dans les tableaux 2.1 à 2.3 qui est en général plus grand que 1. Or, s'il y avait des contaminations externes, il aurait été attendu que les concentrations résultantes soient plus élevées et non plus faibles. Une contribution possible à ce résultat surprenant pourrait être que la présence de sébum et autres substances à la surface du cheveu avant le lavage pourrait augmenter le poids du cheveu. En conséquence, pour une même masse pesée, la quantité de cheveux présente dans la bombe deviendrait plus grande pour les cheveux lavés que pour les cheveux non lavés, ce qui pourrait expliquer une quantité plus grande d'analytes. Il est donc important de pratiquer un lavage avant l'analyse de cheveux pour ne pas biaiser les concentrations mesurées.

Tableau 2.1 : Concentrations en GHB dans les différents segments de cheveux selon la méthode de lavage utilisée et ratios de comparaison.

Numéro segment	[GHB] (ng/mg)			$\frac{[GHB]_{2 \text{ lavages}}}{[GHB]_{\text{sans lavage}}}$	$\frac{[GHB]_{3 \text{ lavages}}}{[GHB]_{2 \text{ lavages}}}$
	Sans lavage	Lavages DCl + eau	Lavages DCl + MeOH + eau		
1	28,0	31,0	38,7	1,1	1,2
2	22,2	28,8	22,8	1,3	0,8
3	22,6	26,3	26,5	1,2	1,0
4	23,6	26,3	30,9	1,1	1,2
5	26,8	24,9	24,8	0,9	1,0
6	21,5	24,6	25,1	1,1	1,0
7	22,1	23,6	27,1	1,1	1,1

Tableau 2.2 : Concentrations en AS dans les différents segments de cheveux selon la méthode de lavage utilisée et ratios de comparaison.

Numéro segment	[AS] (ng/mg)			$\frac{[AS]_{2 \text{ lavages}}}{[AS]_{\text{sans lavage}}}$	$\frac{[AS]_{3 \text{ lavages}}}{[AS]_{2 \text{ lavages}}}$
	Sans lavage	Lavages DCl + eau	Lavages DCl + MeOH + eau		
1	4936	5650	5710	1,1	1,0
2	3555	4538	4421	1,3	1,0
3	4417	5101	4292	1,2	0,8
4	3509	4355	4354	1,2	1,0
5	4384	4636	4272	1,1	0,9
6	4153	4047	4265	1,0	1,0
7	4269	4794	4243	1,1	0,9

Tableau 2.3 : Concentrations en GABA dans les différents segments de cheveux selon la méthode de lavage utilisée et ratios de comparaison.

Numéro segment	[GABA] (ng/mg)			$\frac{[GABA]_{2 \text{ lavages}}}{[GABA]_{\text{sans lavage}}}$	$\frac{[GABA]_{3 \text{ lavages}}}{[GABA]_{2 \text{ lavages}}}$
	Sans lavage	Lavages DCI + eau	Lavages DCI + MeOH + eau		
1	2340	2384	2034	1,0	0,9
2	2054	2056	1833	1,0	0,9
3	2002	2273	1760	1,1	0,8
4	2053	2059	1893	1,0	0,9
5	1903	2064	1815	1,1	0,9
6	1900	2003	1776	1,1	0,9
7	1919	2001	1799	1,0	0,9

Pour vérifier l'impact du lavage au méthanol, qui est reconnu pour être un solvant capable de pénétrer et extraire des molécules des cheveux (Vogliardi *et al.*, 2015), les résultats de la mèche lavée avec deux solvants ont été comparés à ceux de la mèche lavée avec le méthanol en extra. Cette comparaison est présentée dans la dernière colonne des tableaux 2.1 à 2.3. Pour le GHB et l'AS, il n'y a pas eu de différence entre les deux méthodes, les concentrations obtenues se sont avérées assez similaires avec des ratios autour de 1. Pour le GABA, il y a eu observation d'une légère diminution de la concentration, cette dernière étant autour de 10%. Au terme de ce test de lavage, il appert qu'un lavage au méthanol peut causer une légère perte de cette molécule. Toutefois, cette diminution semble plutôt faible. Les trois solvants de lavage ont donc été conservés dans le protocole final de notre étude.

2.3.2.2 Digestion des cheveux

Selon les publications disponibles à ce jour, la méthode de prédilection adoptée par l'ensemble de la communauté scientifique consiste en une digestion par hydrolyse basique avec une solution d'hydroxyde de sodium préparée à différentes concentrations. Dans notre approche, nous avons d'abord comparé trois différentes concentrations en se basant sur la littérature. La première concentration testée fut celle ajustée à 1 M sous des conditions expérimentales de 90°C pendant 40 minutes. Les deux autres concentrations testées ont été préparées à 0,1 M et 0,01 M avec une température de 56°C pendant 16 heures. Parmi ces trois hydrolyses, la meilleure fut celle avec du NaOH 0,1 M qui donna une meilleure intensité de pics chromatographiques pour les trois composés. Le plus faible résultat obtenu avec la digestion à 1 M pourrait s'expliquer par une concentration en sels beaucoup trop élevée issue d'une simple dilution complétée avant l'analyse. Cette grande présence de sels occasionnerait une certaine suppression d'ionisation dans la source du spectromètre de masse. Une plus faible intensité obtenue avec la digestion 0,01 M pourrait quant à elle s'expliquer par le fait que cette concentration serait trop faible pour bien hydrolyser les cheveux. Par la suite, une cinétique d'hydrolyse a été effectuée à 110°C avec une solution de NaOH 0,1 M pour établir le temps requis pour obtenir un plateau pour nos trois analytes. De façon surprenante, aucun plateau n'a été atteint pour l'ensemble des composés après un temps d'hydrolyse de 48 heures. D'autres cinétiques d'hydrolyse ont été complétées avec des solutions de NaOH plus concentrées de 0,25 M et 0,5 M afin de vérifier s'il était possible d'atteindre un plateau plus rapidement avec ces concentrations. Il s'est avéré qu'après une digestion allant jusqu'à 7 jours, il n'y avait toujours pas de plateau d'atteint pour les trois molécules, comme le montrent les figures 2.2 à 2.4.

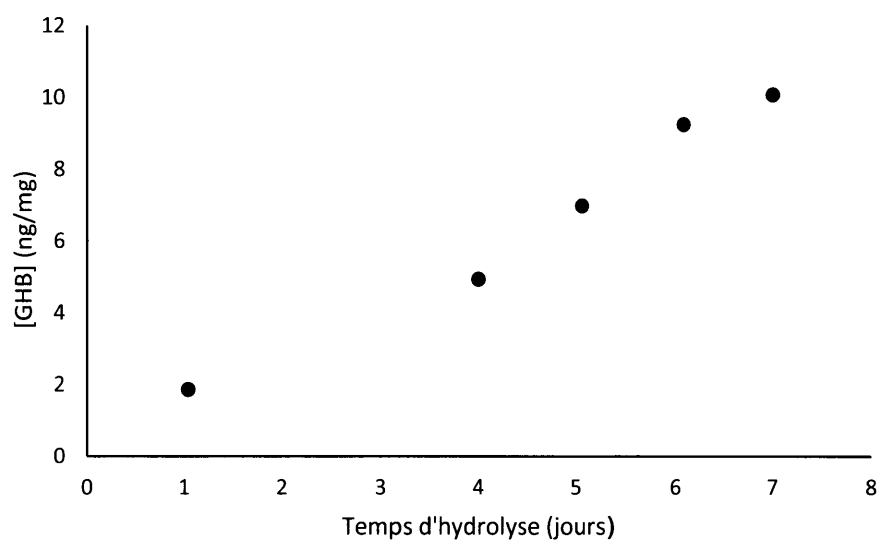


Figure 2.2 : Cinétique d'hydrolyse de 7 jours pour le GHB

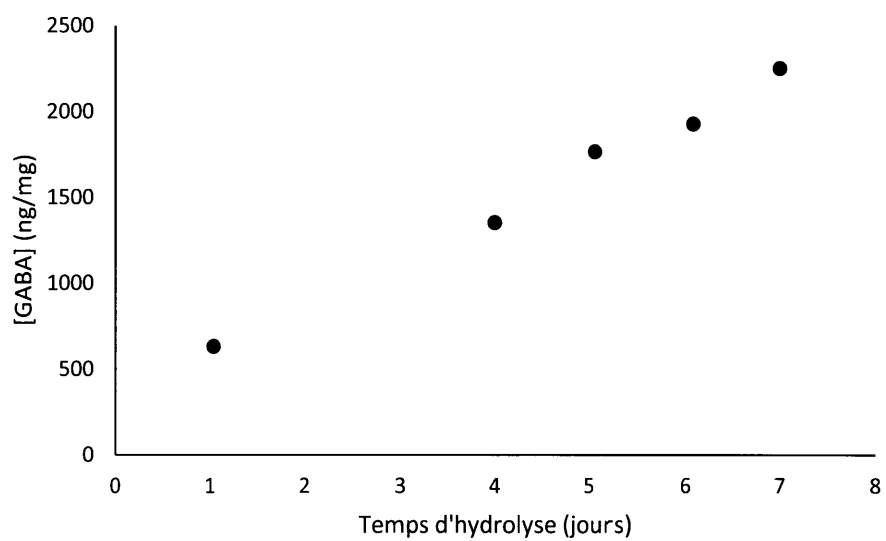


Figure 2.3 : Cinétique d'hydrolyse de 7 jours pour le GABA

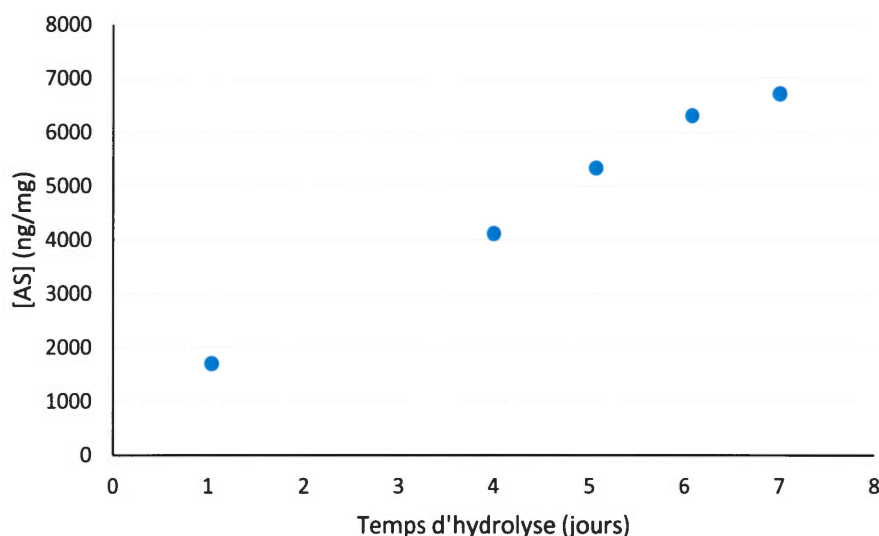


Figure 2.4 : Cinétique d'hydrolyse de 7 jours pour l'AS

Il a donc fallu s'arrêter sur une concentration et un temps d'hydrolyse suffisant pour permettre d'avoir une bonne sensibilité pour nos trois composés. Dans le but de conserver un temps d'extraction raisonnable, une durée de 24 h a été choisie avec une solution de NaOH 0,5 M, concentration pour laquelle l'intensité des pics chromatographiques s'est avérée la plus élevée. À notre connaissance, aucun test de cinétique d'hydrolyse n'avait été décrit auparavant dans la littérature. D'ailleurs, dans leur article de 2003, Goullé *et al.* avaient établi que la meilleure extraction était obtenue avec une solution de NaOH 1 M pendant 15 minutes à 95°C sans toutefois mentionner s'ils avaient vérifié que la quantité de GHB extrait demeurerait constante lorsque le temps d'hydrolyse était augmenté. Il semblerait donc que les concentrations de GHB dans les cheveux rapportées dans les articles pourraient être sous-estimées dans les méthodes de digestion utilisées par les différents auteurs.

Simultanément au test de cinétique d'hydrolyse, un autre test a été complété avec les cheveux pour vérifier de possibles fluctuations de signaux lorsque le standard interne

(SI) deutéré est ajouté avant la digestion plutôt qu'après. Pour ce faire, une première série d'échantillons à différents temps d'hydrolyse a été préparée en duplicata en ajoutant le SI dans le milieu de digestion et une deuxième série n'a reçu le SI que lors de l'étape de dilution, après la digestion. Il a été observé que l'aire des pics chromatographiques du GABA-d6 et du GHB-d6 ajoutés avant hydrolyse était plus faible que celle des pics correspondants lorsque les SI ont été ajoutés après hydrolyse. Il semble donc y avoir un échange de deutériums sur ces SI lors de l'hydrolyse alcaline, entraînant alors une diminution du signal détecté et une augmentation de la réponse (aire analyte / aire SI) par le fait même. Ces résultats concorderaient avec le fait que ce problème n'a pas été observé avec l'acide succinique dont le SI est une molécule comportant des carbones 13 et non des deutériums. Les réplicats d'un temps d'hydrolyse donné pour le GABA et le GHB varient davantage lorsque les SI sont ajoutés avant l'hydrolyse qu'après. Ces observations ont été vérifiées en ajoutant les SI avant hydrolyse (préparation en triplicata) et en incluant pendant les analyses de spectrométrie de masse les transitions des molécules correspondant à une perte d'un et deux deutériums dans la méthode d'acquisition de l'instrument. Les résultats obtenus ont démontré qu'il y avait bel et bien échange de deutériums lors de l'hydrolyse et qu'une partie du GABA-d6 devenait du GABA-d5 et du GABA-d4 (idem pour le GHB-d6 qui s'est transformé en GHB-d5). Le Tableau 2.4 expose pour le GABA-d6 et le GHB-d6 les proportions transformées en d5 et d4 par rapport à la portion restée sous forme d6, en se basant sur les aires intégrées.

Tableau 2.4 : Rapports d'aires entre les molécules à 4 et 5 deutériums et celles à 6 deutériums, pour le GABA-d6 et le GHB-d6.

Numéro du réplicat	Rapport d'aires	Rapport d'aires
	$\frac{(GABA - d5 + GABA - d4)}{GABA - d6}$	$\frac{GHB - d5}{GHB - d6}$
1	0,58	0,083
2	0,54	0,075
3	0,49	0,074
Moyenne	0,54	0,077
Écart-type	0,05	0,005
CV (%)	8,4	6,4

Le Tableau 2.4 permet de constater qu'il n'y a pas exactement le même taux de conversion d'une digestion à l'autre. Par conséquent, cela peut apporter un certain biais pour la quantification. Pour cette raison, il a donc été décidé d'ajouter les SI seulement lors de l'étape de dilution, soit après la digestion. Dans les méthodes présentées dans la littérature, le standard interne deutéré du GHB est ajouté avant l'hydrolyse, mais personne ne mentionne s'il a vérifié l'impact du milieu basique sur les échanges des deutériums.

2.3.2.3 Dilution

Pour l'optimisation du protocole, nous voulions éviter de faire intervenir une méthode d'extraction telle une extraction liquide-liquide ou en phase solide afin de simplifier la méthode. Nous avons donc décidé d'inclure une simple dilution pour les extraits de digestion avant leur analyse subséquente en CL-SM/SM, dilution qui était impérative afin de diminuer la charge en sels qui pourraient affecter la chromatographie et l'ionisation. Il a fallu obtenir une bonne sensibilité pour les trois analytes. En

chromatographie HILIC, il est important que le solvant de reprise des échantillons n'ait pas une plus grande proportion d'eau que la phase mobile initiale sinon, un risque de dispersion des analytes en tête de colonne est possible et peut causer une déformation des pics chromatographiques. Étant donné un gradient initial de la chromatographie à 10 % en eau pour l'analyse du GHB, nous avons été contraints d'utiliser une portion égale ou inférieure à 10 % d'eau dans notre solution de dilution du GHB. Nous avons donc décidé de mettre 10 % d'eau et 90 % d'acétonitrile dans les dilutions.

Le GHB étant la molécule apportant une moins grande réponse avec notre méthode, plusieurs facteurs de dilution ont été essayés (10, 20 et 40) afin de trouver le meilleur signal pour cette molécule. Il s'est avéré qu'une dilution 1 / 40 donnait encore assez de signal pour le GHB, tout en diminuant l'effet de matrice. Cela a été constaté en comparant les aires obtenues entre la dilution d'un facteur 20 et celle d'un facteur 40. Les aires du GHB et du GHB-d6 pour la dilution 1 / 40 étaient plus grandes que la moitié des aires de la dilution 1 / 20, tout en conservant les mêmes réponses GHB / GHB-d6 pour les 2 dilutions. Étant donné des concentrations plus importantes de GABA et d'AS dans les cheveux, une dilution 1 / 400 (dilution 1 / 10 de la dilution 1 / 40) a été testée pour ces deux molécules. Les pics obtenus avaient encore une grande intensité.

En CL-SM/SM, il est important que le solvant de reprise soit le plus compatible possible avec la phase mobile présente en début de chromatographie. Nous avons donc mesuré le pH d'une solution d'acétate d'ammonium 2 mM, qui est d'environ 6,5, et avons tenté d'obtenir ce même pH dans les dilutions. Pour ce faire, il a fallu acidifier notre dilution pour neutraliser le NaOH du digestat. Deux acides ont été testés : l'acide formique et l'acide acétique. Des tests ont été faits au préalable pour déterminer la concentration d'acide à ajouter pour atteindre un pH près de 6,5. Notre choix s'est arrêté sur l'acide formique qui s'est avéré le meilleur acide pour la neutralisation,

puisque les pics obtenus étaient beaucoup plus gaussiens qu'en utilisant l'acide acétique. Étant donné que les phases mobiles contiennent de l'acétate d'ammonium, nous avons vérifié si l'ajout de ce sel dans les dilutions allait améliorer la forme des pics chromatographiques. Pour le GHB, l'ajout de sel n'a pas amélioré les pics et a causé une suppression d'ionisation supplémentaire. Il n'y a donc pas de sel ajouté dans la dilution 1 / 40. Pour l'AS, l'ajout de 20 mM d'acétate d'ammonium dans la dilution a amélioré la forme du pic en le rendant moins large. Pour le GABA, il n'y a pas eu de différence avec ou sans sel. Il a donc été décidé d'ajouter l'acétate d'ammonium à 20 mM dans la dilution 1 / 400.

2.3.3 Optimisation de la spectrométrie de masse

Pour l'optimisation des paramètres de tension de cône et de fragmentation des trois molécules, le logiciel *IntelliStartTM* a été utilisé. Pour ce faire, une solution d'infusion à 500 ng/mL de l'analyte dans un mélange méthanol / eau (50 / 50) a été préparée pour chaque molécule analysée. Chaque molécule a été optimisée séparément en utilisant une infusion en mode « combined » qui permet une optimisation adéquate en présence des solvants utilisés lors de l'analyse. Le débit d'infusion était de 10 µL/min. Pour chaque molécule, le logiciel a déterminé la tension de cône à appliquer pour obtenir la meilleure ionisation et donc le meilleur signal. Il a également déterminé les fragments (ions filles) obtenus pour chacune des molécules, ainsi que l'énergie de collision à appliquer pour que la fragmentation soit optimale avec le signal le plus intense possible.

2.4 Méthode analytique

2.4.1 Préparation des échantillons de cheveux

Les mèches de cheveux sont prélevées au niveau du vertex postérieur à l'aide d'une ficelle et de ciseaux, comme la procédure de la SoHT l'indique. Chaque mèche est ensuite enveloppée dans du papier en aluminium, puis rangée dans une enveloppe en papier jusqu'au jour de l'analyse.

Avant une analyse, les mèches sont lavées de la façon décrite dans la section 2.3.2.1, soit avec un lavage au dichlorométhane, un autre dans le méthanol et un dernier dans l'eau. Pour chaque lavage, la mèche est trempée dans le solvant et est légèrement agitée pendant 2 minutes à l'aide d'une pince. Après les étapes de lavage, la mèche est laissée à sécher sous la hotte. Une fois séchée, elle est brochée sur un carton quadrillé de 5 mm. À l'aide d'une pince, les cheveux sont soigneusement alignés à l'extrémité coupée près du crâne. Ensuite, comme il est montré sur la Figure 2.5, chaque segment de 5 mm est agrafé en son centre sur le carton avant d'être coupé avec des ciseaux en suivant les lignes du quadrillé.

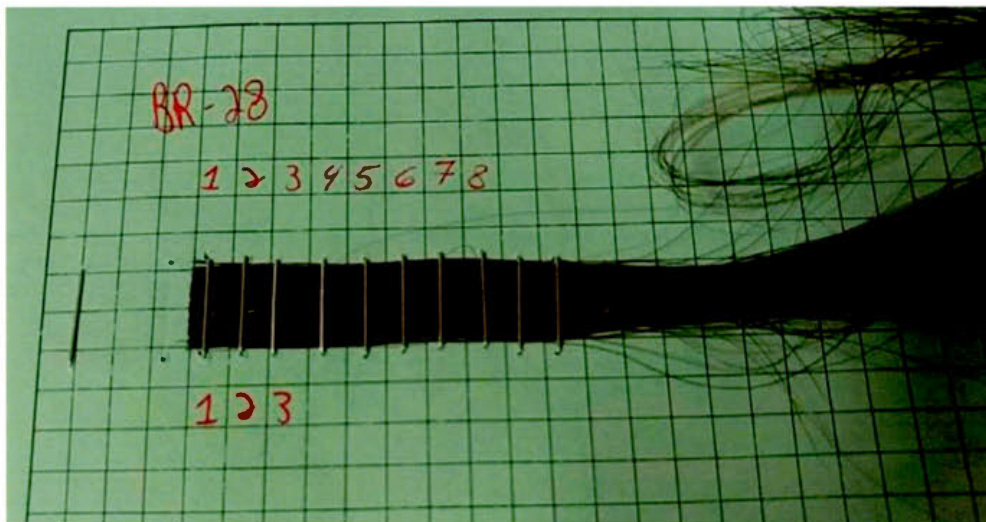


Figure 2.5 : Mèche de cheveux brochée sur un morceau de carton.

Les cheveux sont pesés dans les bombes à digestion, puis 500 μL de NaOH 0,5 M sont ajoutés dans chaque contenant. Les bombes sont ensuite vissées hermétiquement avant d'être placées dans une étuve à 110°C pour 24 h. Une fois la digestion terminée, elles sont placées pendant au moins 30 minutes à 4°C pour les refroidir. Étant donné que pour l'analyse du GHB dans les cheveux, chaque échantillon est sa propre référence (Kintz *et al.*, 2003), il est important de conserver la même masse de cheveux pour les différents segments d'une même mèche. La masse des segments peut cependant varier d'une mèche à l'autre, dépendamment de la grosseur de la mèche. Dans notre cas, elle varie majoritairement entre 2 mg et 15 mg par segment.

Une fois les cheveux digérés, une simple étape de dilution est effectuée avant l'analyse par CL-SM/SM. Une première dilution d'un facteur 40 est effectuée pour l'analyse du GHB alors qu'une dilution subséquente d'un facteur 10 est complétée pour analyser le GABA et l'AS. Cette différence de facteur de dilution s'explique par le fait que le GHB est moins sensible que les deux autres analytes. Pour la dilution 1 / 40, 50 μL du digestat sont ajoutés à 50 μL de solution de standards internes et 100 μL d'eau dans des tubes

en polypropylène à bouchon vissant. Par la suite, 800 μL d'acétonitrile acidifié à 0,1 % v/v avec de l'acide formique sont ajoutés, suivis de 1 mL d'acétonitrile. Après avoir bouché les tubes, le support est placé dans l'agitateur latéral de marque Eberbach pendant 2 minutes. Une fois les tubes bien agités, 600 μL de la solution sont placés dans les filtres de 0,2 μm à l'aide d'une pipette automatique. Les tubes Eppendorfs sont fermés et centrifugés à 10 000 rpm pendant 2 minutes dans une micro-centrifugeuse. Il est à noter que les filtres doivent être lavés au préalable avec deux portions de 500 μL d'une solution ACN / eau (90 / 10), car il a été observé une interférence au temps de rétention du GHB provenant de ces filtres. La Figure 2.6 présente une comparaison des pics chromatographiques obtenus pour la transition de quantification du GHB lorsque le filtre n'est pas lavé et lorsqu'il est lavé. Après centrifugation, le filtrat est transvidé dans un vial en polypropylène pour l'analyse du GHB.

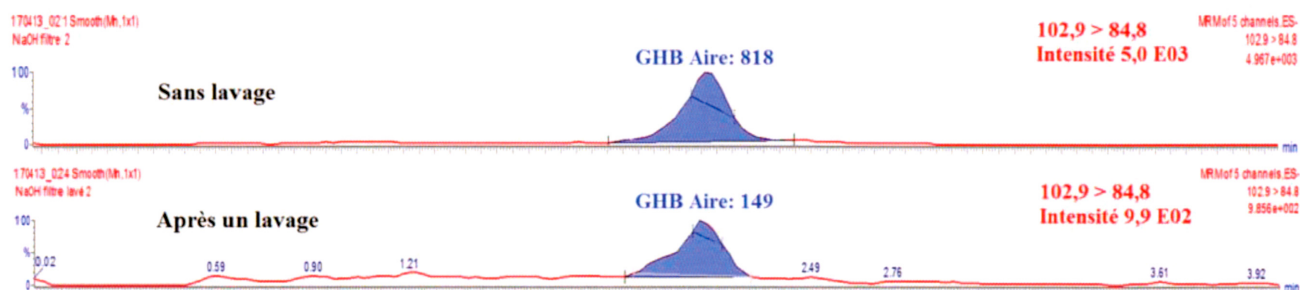


Figure 2.6 : Pics chromatographiques de l'interférence provenant du filtre, avec et sans lavage.

Pour la dilution 1 / 400, une étape de plus est nécessaire. Directement dans un vial sont ajoutés 60 μL d'une solution d'acétate d'ammonium 167 mM et 390 μL d'acétonitrile. Puis, 50 μL de la dilution 1 / 40 correspondante sont ajoutés au vial qui est ensuite mélangé au vortex pendant 15 secondes. La solution diluée 1 / 400 est alors prête pour l'analyse du GABA et de l'AS.

2.4.2 Paramètres de la chromatographie liquide

Le chromatographe en phase liquide utilisé est un ACQUITY UPLC I-Class de Waters. La colonne utilisée est une colonne iHILIC® Fusion (P) PEEK de HILICON avec un diamètre de 2,1 mm, une longueur de 5 cm, une granulométrie de 5 μm et un diamètre de pores de 200 Å. Sa température est réglée à 25°C, tout comme celle de l'échantillonneur. Le volume d'injection est de 10 μL . Les phases mobiles sont composées d'une solution d'acétate d'ammonium 2 mM dans l'eau (phase mobile A) et d'un mélange acétonitrile / eau (95 / 5) contenant également 2 mM d'acétate d'ammonium (phase mobile B). Étant donné qu'il s'agit d'une chromatographie HILIC, le gradient chromatographique commence à forte teneur en phase mobile organique (B). Deux gradients différents sont utilisés pour l'analyse des 2 dilutions. Ils sont représentés sur les Figures 2.7 et 2.8. Le débit est de 0,2 mL/min pour ne pas dépasser la pression maximale de la colonne de 2100 psi. Le SW (*strong wash*) et le WW (*weak wash*) utilisés pour rincer l'injecteur sont respectivement de même composition que la phase mobile A et la phase mobile B.

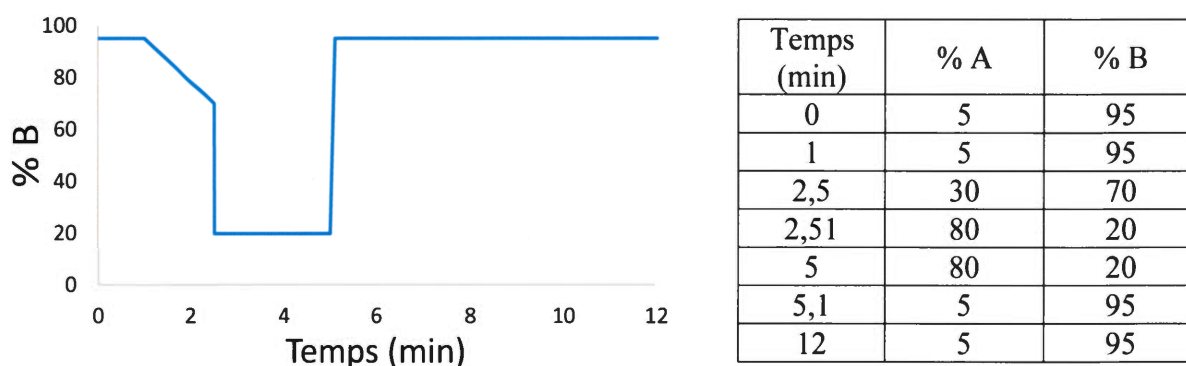


Figure 2.7 : Gradient chromatographique pour l'analyse du GHB.

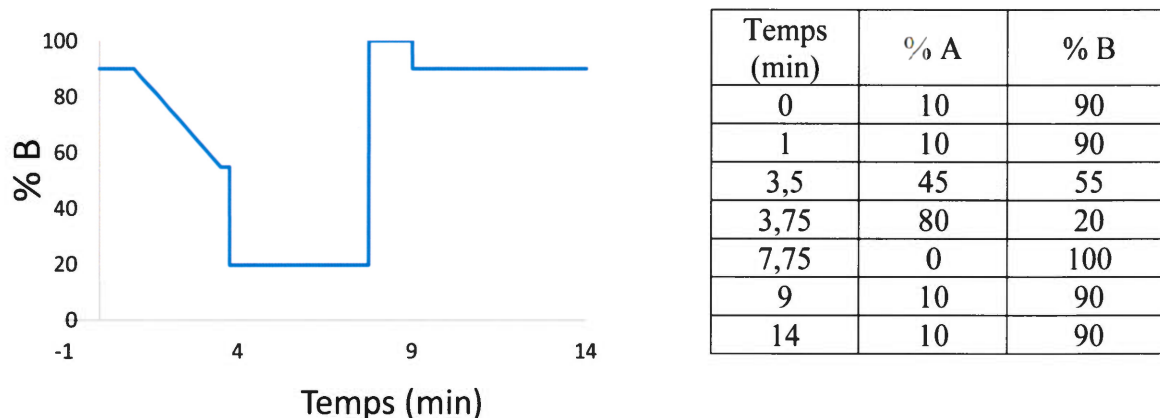


Figure 2.8 : Gradient chromatographique pour l'analyse du GABA et de l'AS.

2.4.3 Paramètres du spectromètre de masse

Le spectromètre de masse utilisé est un Xevo TQ-S micro de Waters. L'analyseur de masse de cet appareil est un triple quadripôle. L'ionisation se fait par nébulisation électrostatique (source ESI) en mode négatif pour le GHB et en alternance négatif-positif pour le GABA et l'AS. La température de désolvatation est de 500°C, le débit du gaz de désolvatation est de 1000 L/h et le débit du gaz de nébulisation est de 20 L/h. Le voltage du capillaire est de 2,3 kV en mode positif et de 2,36 kV en mode négatif. Le gaz utilisé dans la cellule de collision est l'azote à un débit de 0,15 mL/min. Les résultats de l'optimisation de la fragmentation des molécules sont regroupés dans le Tableau 2.5. Le traitement des données a été effectué à l'aide de la version 4.1 du logiciel *MassLynx* de Waters.

Tableau 2.5 : Optimisation des transitions MRM des trois molécules par CL-SM/SM par le logiciel *IntelliStartTM*.

Composé	Masse molaire (g/mol)	Ion précurseur m/z	Tension de cône (V)	Ions filles m/z	Énergie de collision (V)	Mode d'ionisation
GHB	104	102,9	2	56,9	14	ESI -
			6	84,8	8	ESI -
GHB-d6	110	108,9	24	61,0	24	ESI -
			24	90,0	24	ESI -
GABA	103	104,1	20	45,44	12	ESI +
			20	86,97	8	ESI +
GABA-d6	109	110,16	24	49,09	16	ESI +
			24	92,97	8	ESI +
AS	118	116,9	26	72,97	10	ESI -
			26	98,94	8	ESI -
AS ¹³ C ₄	122	121,03	4	75,98	10	ESI -
			4	103,00	10	ESI -

2.5 Validation de la méthode

Cette section comprend les principaux tests de validation effectués pour s'assurer de la fiabilité de la méthode développée, méthode de validation mise en place au Centre de toxicologie du Québec (CTQ) basée sur les normes ISO 17025. Cela comprend les tests de linéarité, de limites de détection et de quantification, d'effet de matrice global, de répétabilité et de reproductibilité.

2.5.1 Linéarité

La linéarité est un paramètre important à vérifier lorsqu'on veut quantifier un analyte. En effet, afin de pouvoir quantifier, il faut s'assurer que la réponse d'un analyte, calculée par le rapport de l'aire du pic de l'analyte sur l'aire du pic de son SI, soit directement proportionnelle à la concentration de cet analyte. Ce test a été fait en présence de matrice, en suivant le protocole de digestion et de dilution des échantillons. Étant donné que les cheveux contiennent tous du GABA, de l'AS et du GHB, il n'était pas possible de prendre une matrice exempte de ces composés pour faire le test. Les courbes d'étalonnage ont été préparées avec plusieurs matrices de cheveux de différentes couleurs. Les analytes ont été ajoutés à l'étape de la dilution 1 / 40, à la fois pour la courbe du GHB et pour celles de l'AS et du GABA. Pour ce faire, trois bombes de digestion par matrice ont été préparées. Une fois digéré, le contenu des 3 bombes sont mélangées ensemble pour former un digestat homogène. Les tableaux 2.6 à 2.9 indiquent la procédure de préparation des dilutions 1 / 40 et 1 / 400. Chaque concentration a été préparée en duplicata. Les solutions d'ajout pour le GHB ont été préparées à partir de solutions mères à 10 et 100 ppm. Pour l'AS et le GABA, des solutions combinées d'ajout ont été préparées à partir de solutions mères à 2 ppm et 20 ppm de chacune des molécules.

Tableau 2.6 : Préparation des solutions d'ajout pour la courbe d'étalonnage du GHB.

Étalon	Solution mère utilisée GHB (µg/L)	Volume Solution d'ajout (µL)	Volume H ₂ O (µL)	Concentration finale de la solution d'ajout GHB (µg/L)
C-1	100	-	-	100
C-2	10 000	20	980	200
C-3	10 000	40	960	400
C-4	10 000	100	900	1 000
C-5	10 000	200	800	2 000
C-6	100 000	60	940	6 000
C-7	100 000	120	880	12 000

Tableau 2.7 : Préparation combinée des solutions d'ajout pour les courbes d'étalonnage du GABA et de l'AS.

Tube	Volume Solution GABA* (µL)	Volume Solution AS* (µL)	Volume eau (µL)	Concentration finale de la solution d'ajout du GABA (µg/L)	Concentration finale de la solution d'ajout de l'AS (µg/L)
1	20	75	1000	20 000	75 000
2	50	150	800	50 000	150 000
3	50	250	200	100 000	500 000
4	125	375	-	250 000	750 000

*Concentration de la solution de GABA et de celle de l'AS: 1 000 000 µg/L

Tableau 2.8 : Préparation de la courbe d'étalonnage du GHB dans les cheveux.

Étalon*	Concentration Solution d'ajout GHB (µg/L)	Volume Solution d'ajout (µL)	Volume d'eau (µL)	Concentration résultante GHB (après dilution) (µg/L)
C-0	0	0	100	x**
C-1	100	50	50	x + 2,5
C-2	200	50	50	x + 5
C-3	400	50	50	x + 10
C-4	1 000	50	50	x + 25
C-5	2 000	50	50	x + 50
C-6	6 000	50	50	x + 150
C-7	12 000	50	50	x + 300

*chaque étalon, est complété avec 50 µL de matrice, 50 µL de la solution de SI à 2000 µg/L, 1 mL d'ACN et 800 µL d'ACN à 0,1% d'acide formique

**x = niveau endogène de GHB

Tableau 2.9 : Préparation des dilutions 1/40 pour les courbes d'étalonnage du GABA et de l'AS dans les cheveux.

Étalon*	Concentration Solution d'ajout GABA (µg/L)	Concentration Solution d'ajout AS (µg/L)	Volume Solution d'ajout (µL)	Volume d'eau (µL)	Concentration résultante (après dilution 1/400) (µg/L)	
					GABA	AS
C-0	0	0	0	50	y**	z***
C-1	20 000	75 000	50	0	y + 50	z + 187,5
C-2	50 000	150 000	50	0	y + 125	z + 375
C-3	100 000	500 000	50	0	y + 250	z + 1250
C-4	250 000	750 000	50	0	y + 625	z + 1875

*Chaque étalon est complété avec 50 µL de matrice, 50 µL d'une solution à 2 ppm de GHB-d6, 20 ppm de GABA-d6 et 20 ppm d'AS ¹³C₄, 50 µL d'une solution d'AS ¹³C₄ à 80 ppm, 1 mL d'ACN et 800 µL d'ACN à 0,1% d'acide formique

**y = niveau endogène de GABA

***z = niveau endogène d'AS

2.5.2 Répétabilité

La répétabilité permet de déterminer l'étroitesse des résultats d'analyse des préparations d'un même échantillon effectuées le même jour dans les mêmes conditions. Elle est déterminée en préparant et analysant dix répliques d'un même échantillon de cheveux au cours d'une même série analytique et en calculant le coefficient de variation (CV) des résultats de ces dix répliques. Plus le CV est faible, plus la répétabilité est grande. Pour ce faire, une mèche de cheveux a été coupée en segments de 5 mm et les morceaux ont été bien mélangés pour avoir un échantillon homogène pour le test. Dix échantillons ont été préparés en pesant 5 mg de cheveux dans des bombes de digestion. Ils ont été analysés selon la méthode. Cette masse a été

choisie, car la plupart des échantillons analysés avaient des segments d'une masse d'environ 5 mg.

2.5.3 Limites de détection et de quantification

Une première étape d'estimation des limites de détection (LD) a été effectuée. Cette estimation consiste à évaluer pour quelle concentration nous obtenons un signal sur bruit de fond (S/N) de 3. Par la suite, si cette concentration est inférieure d'au moins un ordre de grandeur aux besoins analytiques, elle est conservée comme étant la LD estimée. La limite de quantification (LQ) estimée correspond alors à environ 3,3 fois la LD. Si ce n'est pas le cas, la limite de détection est déterminée sur la base de la répétabilité. Cela se fait en analysant 10 répliques d'un même échantillon ayant une concentration en analytes environ 5 à 7 fois la LD estimée, au cours d'une même séquence analytique. L'écart-type des concentrations des 10 répliques est multiplié par 3 pour obtenir la LD et par 10 pour obtenir la LQ.

La LD est estimée à partir d'un pic chromatographique dont on connaît la concentration correspondante. Elle est calculée selon l'équation (1).

$$LD \text{ estimée} = 3 \left[\frac{\text{concentration de l'échantillon}}{\text{intensité } \left(\frac{S}{N} \right)} \right] \quad (1)$$

Pour chaque molécule, le chromatogramme choisi pour estimer la LD est celui obtenu lors de l'analyse du niveau endogène de la matrice utilisée pour faire les courbes d'étalonnage. Afin de déterminer la concentration de l'échantillon, la valeur absolue de l'ordonnée à l'origine de la courbe d'étalonnage est calculée. L'intensité du signal sur bruit est mesurée manuellement à partir du logiciel *TargetLynx*TM. Les valeurs de

LD calculées à partir de l'équation précédente sont en $\mu\text{g/L}$. Il faut ensuite les rapporter en ng/mg de cheveux, car les concentrations des trois molécules sont mesurées avec ces unités. Pour ce faire, il faut tenir compte de la dilution subie par les échantillons et de la masse de cheveux par échantillon. Étant donné que la majorité des segments pesés sont autour de 5 mg, cette valeur est utilisée pour le calcul qui est expliqué en détails dans l'annexe 1.

2.5.4 Effet matrice instrumental et récupération

Les tests d'effet matrice instrumental et de récupération se sont inspirés des travaux de Bienvenu et *al.* publiés en 2017. Dans leur article, ils décrivent une méthode utilisant un ensemble de six tests effectués sur six différentes matrices qui permet de déterminer l'effet matrice global incluant entre autres l'effet matrice instrumental et la récupération d'une méthode. Les six séries sont présentées schématiquement dans la Figure 2.9. La série A est l'ajout du SI et des analytes dans le solvant de reconstitution seulement, en absence de matrice. Pour la série B, la méthode de préparation complète est appliquée à l'échantillon puis les SI et les analytes sont ajoutés. Dans la série C, les analytes sont ajoutés à l'échantillon avant le processus de préparation et les SI sont ajoutés après le processus. Pour la série D, les SI et les analytes sont ajoutés à l'échantillon avant que celui-ci subisse la méthode de préparation. Dans la série E, les SI sont ajoutés avant la préparation et aucun analyte n'est ajouté. Finalement, la dernière série consiste à préparer l'échantillon puis à y ajouter les SI à la toute fin, sans ajouter d'analyte. Cette série nous permet de mesurer le niveau endogène des molécules analysées, s'il y en a.

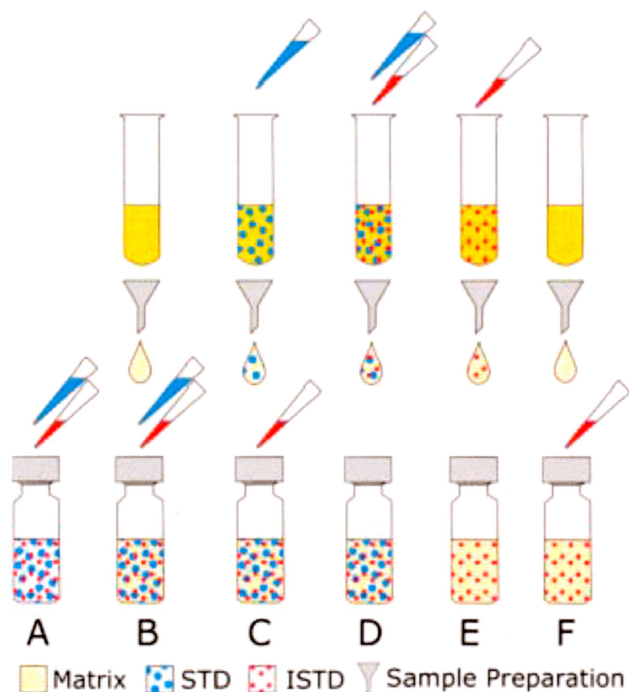


Figure 2.9 : Illustration des six séries de tests (Bienvenu *et al.*, 2017).

Étant donné que pour notre méthode, les SI sont ajoutés seulement à l'étape finale de dilution, il n'était possible d'appliquer les séries D et E. Les 4 autres séries ont été effectuées sur six matrices différentes dont la couleur et la présence ou l'absence de teinture varient pour avoir une meilleure représentativité des différences possibles des matrices de cheveux.

L'effet matrice (EM) instrumental correspond à la suppression ou à l'augmentation de l'ionisation des molécules d'intérêt en présence de la matrice biologique, dans ce cas-ci le digestat de cheveux. Pour mesurer ce paramètre, il faut faire un rapport entre les résultats obtenus lorsque les analytes et les SI sont ajoutés à l'échantillon après que celui-ci ait subi le processus de préparation (série B) et ceux lorsque les analytes et les SI sont ajoutés dans le solvant de reprise en absence de la matrice (série A). Dans notre cas, le solvant de reprise est préparé en faisant les mêmes dilutions 1 / 40 et 1 / 400,

mais en remplaçant le 50 μL de digestat de cheveux par 50 μL de NaOH 0,5 M. Étant donné qu'il y a un niveau endogène, nous devons soustraire cette valeur aux résultats. Il faut donc également analyser les six matrices de cheveux sans ajout des analytes pour établir l'EM (série F). Les résultats sont comparés à la fois en aires (effet matrice absolu) et en réponses (effet matrice absolu normalisé). En résumé, l'effet matrice instrumental est calculé selon l'équation (2).

$$\text{EM instrumental (\%)} = \left[\frac{\text{série B} - \text{série F}}{\text{série A}} \right] \times 100 \quad (2)$$

La récupération correspond à l'efficacité de l'extraction de l'analyte de la matrice. Il s'agit du rapport, en pourcentage, entre les résultats obtenus lorsque l'analyte a été soumis à toutes les étapes du protocole et les résultats obtenus lorsque l'analyte ne subit pas le processus analytique. Dans notre cas, la récupération a été calculée en comparant les résultats obtenus lorsque les molécules ont été ajoutées dans les bombes, avant la digestion des cheveux (série C), et les résultats lorsqu'elles ont été ajoutées aux digestats de cheveux lors de l'étape finale de dilution (série B). Tout comme l'effet matrice instrumental, la récupération est rapportée en aires et en réponses (récupération normalisée). Les niveaux endogènes ont encore une fois été soustraits des résultats (série F). L'équation (3) résume la façon de calculer la récupération.

$$\text{Récupération (\%)} = \left[\frac{\text{série C} - \text{série F}}{\text{série B} - \text{série F}} \right] \times 100 \quad (3)$$

2.5.5 Reproductibilité

La reproductibilité permet de déterminer l'écart des résultats d'analyse des préparations d'un même échantillon effectuées en faisant varier des conditions d'analyse. Dans notre cas, pour déterminer ce paramètre de validation, nous avons fait varier les jours d'analyse. Pour ce faire, nous avons utilisé une matrice comme matériau de référence (MR) et l'avons analysée lors de chaque séquence analytique. La matrice a été réduite en poudre puis homogénéisée par agitation. Elle est analysée en suivant le protocole établi, en pesant 10 mg de cheveux dans la bombe de digestion.

2.5.6 Spécificité

Pour s'assurer de quantifier les bonnes molécules, un test a été fait pour vérifier si les principaux isomères des trois molécules d'intérêt sont bien séparés d'un point de vue chromatographique. Si ce n'est pas le cas, cela pourrait créer des biais analytiques ou interférences isobariques si les isomères se retrouvent également dans les cheveux. Les principaux isomères du GHB sont les acides α et β -hydroxybutyrique (AHB et BHB, respectivement). Les principaux isomères du GABA sont les acides α et β -aminobutyrique (AABA et BABA, respectivement). Finalement, le principal isomère de l'acide succinique est l'acide méthylmalonique (MMA). Pour chacun de ces isomères, une solution à 500 ng/mL dans un mélange méthanol / eau (50 / 50) a été préparée. Leurs transitions MRM ont ensuite été optimisées de la même façon que celles des trois molécules d'intérêt, expliquée dans la section 2.3.3.

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Description

Cette section contient les résultats et observations de l'analyse des segments de cheveux de plusieurs individus par CL-SM/SM. Les résultats des tests de validation de la méthode seront d'abord exposés et comparés à ceux de la littérature. Ensuite, l'effet de la quantité de cheveux hydrolysés sur les concentrations obtenues sera discuté.

3.2 Validation de la méthode

3.2.1 Linéarité

La Figure 3.1 montre les courbes d'étalonnage pour le GHB. Le nom donné aux matrices est créé avec la couleur naturelle des cheveux de l'échantillon (Bl = blond, Br = brun, N = noir, T à la fin = teint) suivie d'un identifiant unique. La matrice Dév-007 est appelée ainsi, car il s'agit d'un échantillon de cheveux utilisé seulement pour le développement de la méthode. Pour les trois matrices, les pentes sont quasi identiques. Elles sont rapportées dans le tableau 3.1. Le coefficient de variation des pentes est de seulement 1% alors il y a peu d'influence de la matrice choisie. La courbe préparée dans une matrice en particulier pourra donc servir à la quantification de toutes les autres matrices. De plus, les coefficients de détermination des trois droites sont très élevés, soient plus grands que 0,99. Les concentrations de GHB mesurées sont à l'intérieur du domaine d'étalonnage.

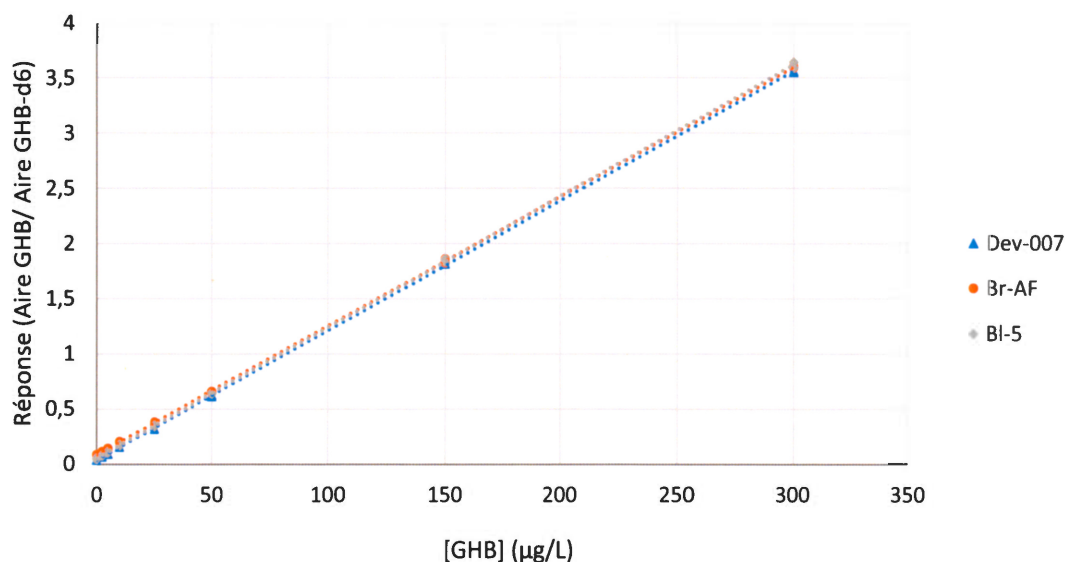


Figure 3.1 : Courbes d'étalonnage du GHB préparées dans différentes matrices de cheveux.

Tableau 3.1 : Pentés et coefficients de détermination des courbes d'étalonnage du GHB.

Matrice	Pente	Coefficient de détermination
Dév-007	0,0117	1,0000
Br-AF	0,0117	0,9999
BI-5	0,0119	0,9999
Moyenne	0,0118	
Écart-type	0,0001	
CV (%)	1,0	

Pour ce qui est du GABA, la Figure 3.2 montre que les courbes d'étalonnage ont des coefficients de détermination r^2 variant entre 0,9985 et 0,9996, ce qui est excellent et démontre une bonne précision de la méthode. Il est également possible de voir dans le Tableau 3.2 que trois des quatre courbes d'étalonnage ont pratiquement la même pente, autour de 0,0275, alors que la 4^e est légèrement plus faible, soit de 0,0257. Cependant, le coefficient de variation de ces 4 pentes est de seulement 3,6 %, ce qui est très faible.

Tout comme le GHB, la courbe d'étalonnage du GABA préparée dans une matrice en particulier servira à quantifier le GABA dans les autres matrices. La linéarité a été vérifiée jusqu'à 625 $\mu\text{g/L}$, ce qui correspond à environ 10 fois le niveau endogène. Cette concentration devrait être largement suffisante pour les besoins analytiques.

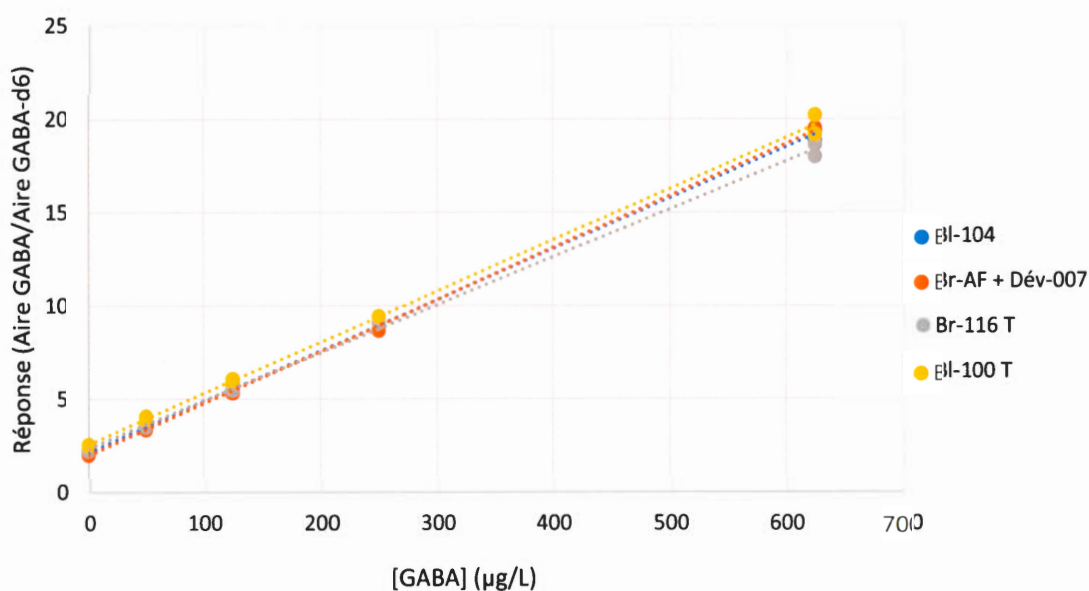


Figure 3.2 : Courbes d'étalonnage du GABA préparées dans différentes matrices de cheveux.

Tableau 3.2 : Pentés et coefficients de détermination des courbes d'étalonnage du GABA.

Matrice	Pente	Coefficient de détermination
BI-104	0,0274	0,9990
Br-AF + Dév-007	0,0279	0,9996
Br-116 T	0,0257	0,9987
BI-100 T	0,0274	0,9985
Moyenne	0,0271	
Écart-type	0,0010	
CV (%)	3,6	

Les résultats du test de linéarité pour l'AS sont rapportés dans la Figure 3.3 et dans le Tableau 3.3. Les quatre courbes d'étalonnage ont également des pentes quasi identiques avec un coefficient de variation très faible de 1,4% et leur coefficient de détermination sont tous très près de 1, ce qui correspond à une linéarité presque parfaite. La concentration maximale de la courbe est de 1875 $\mu\text{g/L}$, soit environ 12 fois le niveau endogène. Cela couvre l'étendue des concentrations présentes dans les cheveux.

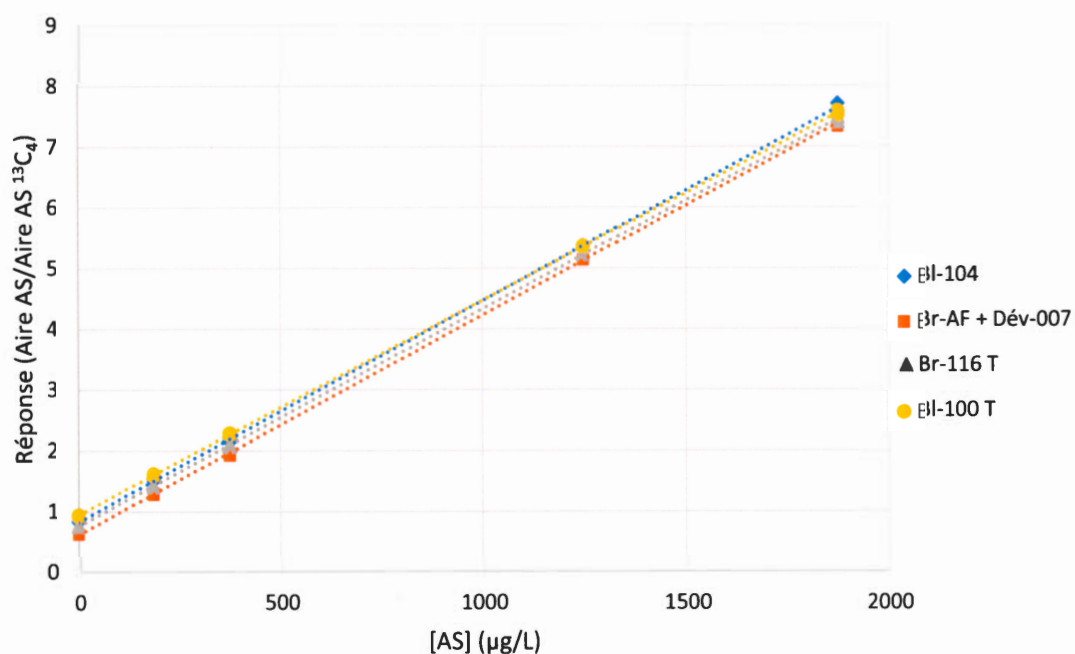


Figure 3.3 : Courbes d'étalonnage de l'AS préparées dans différentes matrices de cheveux.

Tableau 3.3 : Pentes et coefficients de détermination des courbes d'étalonnage de l'AS.

Matrice	Pente	Coefficient de détermination
Bl-104	0,0036	0,9998
Br-AF + Dév-007	0,0036	0,9999
Br-116 T	0,0036	0,9999
Bl-100 T	0,0035	1,0000
Moyenne	0,0036	
Écart-type	0,00005	
CV (%)	1,4	

3.2.2 Répétabilité

Les résultats des dix échantillons pour le test de répétabilité sont rapportés dans le Tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Répétabilité des résultats d'analyse pour le GHB, l'AS et le GABA.

Molécule	GHB	AS	GABA
Essai	Concentration (ng/mg)	Concentration (ng/mg)	Concentration (ng/mg)
1	20,1	3077	1442
2	19,8	3637	1553
3	19,0	3446	1443
4	20,2	3427	1476
5	20,4	3678	1535
6	19,3	3421	1525
7	20,6	3637	1463
8	22,2	3403	1467
9	21,9	3704	1562
10	21,6	3944	1687
Moyenne	20,5	3537	1515
Écart-type	1,1	234,9	75
Répétabilité	5,4 %	6,6 %	5,0 %

Pour les molécules d'intérêt, la répétabilité représentée par le coefficient de variation des 10 répliques est très faible, soit autour de 5 %. Cela signifie que la méthode utilisée pour quantifier les trois molécules dans les cheveux permet d'obtenir des résultats précis et similaires lorsque les analyses sont faites dans les mêmes conditions (même méthode, même personne, même instrument).

3.2.3 Limites de détection et de quantification

La LD estimée pour le GABA est de 10,3 ng/mg alors que les concentrations retrouvées dans les cheveux sont de l'ordre de 1000 ng/mg. Cette valeur de LD peut alors être utilisée pour le GABA. La LQ du GABA est donc d'environ 34 ng/mg, soit 3,3 fois sa LD. Pour le GHB, la LD estimée est de 3,3 ng/mg. Or, les concentrations rencontrées dans les cheveux ne sont pas nécessairement au-dessus de 33 ng/mg. Il faut donc calculer la LD par la méthode de la répétabilité. Il faut également procéder de la sorte pour l'AS, car sa LD estimée est d'environ 460 ng/mg alors que les concentrations retrouvées dans les cheveux commencent à 2000 ng/mg. Étant donné que la répétabilité a déjà été effectuée, les mêmes résultats peuvent être utilisés pour calculer la LD. Ces résultats se trouvent dans le Tableau 3.4 précédent. Le Tableau 3.5 présente les LD et LQ calculées pour le GHB et l'AS ainsi que le ratio de conformité. Ce ratio doit se situer entre 4 et 10 pour que le test soit concluant. Cette méthode utilisant un ratio de conformité est celle utilisée au CTQ qui s'est inspiré du protocole de validation d'une méthode d'analyse en chimie du CEAEQ (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2015). Il est calculé selon l'équation (4), où $\bar{x}$ est la moyenne des concentrations des 10 répliques. Dans les 2 cas, le ratio de conformité est correct, donc la matrice utilisée pour le test a des concentrations adéquates pour les 2 analytes, ce qui valide la LD et la LQ.

$$R = \bar{x}/LD \quad (4)$$

Tableau 3.5 : LD et LQ calculées sur la base de la répétabilité pour le GHB et l'AS.

Molécule	GHB	AS
LD _{estimée} (ng/mg)	3,3	460
Moyenne	20,5	3537
Écart-type	1,1	235
LD (ng/mg)	3,3	705
LQ (ng/mg)	11,0	2349
Ratio de conformité R	6,2	5,0

Dans la littérature, les LD rapportées pour le GHB sont beaucoup plus petites que celle obtenue au cours de ce test. En effet, elles se situent entre 0,01 et 0,5 ng/mg de cheveux (Bertol *et al.*, 2012; Cirimele *et al.*, 2010; Jagerdeo *et al.*, 2014; Kintz *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2016; Stout *et al.*, 2010; Vaiano *et al.*, 2016). Or, les concentrations en GHB qu'ils ont obtenues sont beaucoup plus faibles que celles rencontrées au cours de notre étude, probablement dû à notre méthode d'extraction plus efficace. La LD de 3,3 ng/mg est en deçà des valeurs minimales de GHB rencontrées lors de nos analyses donc cela convient aux besoins.

Pour ce qui est de l'AS, aucune valeur de comparaison de LD n'existe, car aucun article scientifique ne relate l'analyse de cette molécule dans les cheveux. L'analyse du GABA est mentionnée dans un seul article de Busardò et son équipe, en 2017. Au cours de leur recherche, ceux-ci ont tenté d'analyser le GABA dans les cheveux, mais ils n'ont rien détecté au-dessus de leur limite de détection qui était de 0,3 ng/mg. Ce résultat est assez surprenant puisque nous retrouvons des concentrations très élevées de cette molécule dans les cheveux, soit autour de 1500 ng/mg. Cela peut s'expliquer par le fait que la colonne chromatographique qu'ils ont utilisée est une colonne C18 en phase inverse qui ne retient pas les molécules polaires comme le GABA. Celui-ci sort

dans le front de solvant en même temps que toutes les molécules n'ayant pas été retenues par la colonne chromatographique comme les sels, entre autres. Il est donc possible qu'il subisse une énorme suppression d'ionisation. Leur milieu de digestion est également différent de celui que nous avons utilisé. Ils ont digéré les cheveux dans une solution acide. Il se peut que le GABA ne soit pas stable dans ce milieu et qu'il se cyclise comme le fait le GHB en milieu acide. Pour ce qui est de leur LQ, elle est beaucoup plus faible que la nôtre, soit de 1,0 ng/mg comparativement à 34 ng/mg pour notre méthode, mais nous détectons une grande quantité de GABA dans les cheveux, donc cela ne pose pas de problème en ce qui concerne notre étude.

3.2.4 Effet matrice instrumental et récupération

Le Tableau 3.6 présente les résultats de l'effet matrice instrumental des trois composés. Les noms des matrices se rapportent à leur couleur (Br = brun; Bl = blond, N = noir) et à la présence de teinture (T) ou non. Une valeur de 100% indique qu'il n'y a pas d'effet matrice instrumental.

Tableau 3.6 : Effet matrice instrumental pour le GHB, le GABA et l'AS.

Molécule	GHB		GABA		AS	
[] ajoutée	37,5 µg/L		200 µg/L		1019 µg/L	
Matrices	EM absolu	EM absolu normalisé	EM absolu	EM absolu normalisé	EM absolu	EM absolu normalisé
Br-123	74,9 %	100,2 %	74,7 %	100,7 %	155,2 %	95,2 %
Br-115 T	84,0 %	100,7 %	96,9 %	100,7 %	310,3 %	91,7 %
Br-113	80,7 %	102,7 %	84,0 %	99,1 %	224,5 %	95,4 %
Bl-9	84,1 %	101,0 %	77,3 %	98,4 %	162,3 %	96,0 %
Bl-114 T	71,0 %	98,0 %	76,1 %	99,2 %	156,5 %	96,6 %
N-100	69,5 %	98,7 %	75,0 %	98,5 %	149,0 %	97,7 %
Moyenne	-	100,2 %	-	99,4 %	-	95,4%
Écart-type	8,4 %	1,7 %	10,7 %	1,0 %	33,1 %	2,1 %

Les résultats obtenus montrent que pour les trois molécules, il y a un effet matrice instrumental assez important, particulièrement pour l'acide succinique. Pour le GHB et le GABA, la matrice crée une suppression d'ionisation, car les EM absolus sont inférieurs à 100%. Dans le cas de l'acide succinique, la matrice favorise l'ionisation, car les aires des pics chromatographiques sont supérieures en présence de la matrice, ce qui donne des EM supérieurs à 100%. Malgré des EM absolus relativement élevés, les EM absolus normalisés sont excellents, soient tous près de 100%, avec des écarts-type très faibles. Cela signifie que dans chaque cas, l'étalon interne compense bien cet effet matrice instrumental et qu'il y a très peu de variation de la compensation d'une matrice à l'autre. L'utilisation de standards internes est donc nécessaire pour corriger l'effet matrice instrumental afin que ce dernier ne cause pas de biais analytique.

Le Tableau 3.7 expose les résultats de la récupération pour les trois analytes.

Tableau 3.7 : Récupération du GHB, du GABA et de l'AS.

Molécule	GHB		GABA		AS	
Concentration ajoutée	37,5 µg/L		200 µg/L		1019 µg/L	
Matrices	Récup.	Récup. normalisée	Récup.	Récup. normalisée	Récup.	Récup. normalisée
Br-123	111,8%	104,7%	103,1%	99,4%	112,6%	106,5%
Br-115 T	107,9%	105,5%	87,6%	95,6%	58,4%	106,4%
Br-113	109,7%	105,2%	91,7%	101,9%	100,3%	108,8%
Bl-9	106,6%	101,2%	96,6%	98,8%	141,4%	104,9%
Bl-114 T	122,6%	101,7%	95,1%	98,9%	94,4%	107,2%
N-100	122,9%	101,4%	99,7%	97,4%	112,6%	105,1%
Moyenne	-	103,3 %	-	98,7 %	-	106,5 %
Écart-type	6,4 %	2,0 %	5,8 %	2,1 %	26,5 %	1,4 %

Les récupérations normalisées sont tout à fait acceptables pour les trois molécules. Elles sont toutes près de 100 % et leur écart-type sont très faibles. Peu importe la matrice de cheveux, la récupération est similaire d'un échantillon à l'autre. Évidemment, les analytes ajoutés ne subissent pas exactement le même processus que les analytes extraits des cheveux, car ils ne sont pas emprisonnés dans des cheveux lors de l'étape de digestion. Cela permet toutefois de voir qu'il n'y a pas de perte de molécules pendant l'hydrolyse de 24h.

3.2.5 Reproductibilité

Les graphiques suivants rapportent les concentrations obtenues pour cette matrice au cours du temps. Le tableau 3.8 montre quant à lui les données statistiques de ces résultats.

Tableau 3.8 : Données statistiques sur les concentrations mesurées de GHB, de GABA et d'AS dans les MR.

Molécule	GHB	GABA	AS
[] moyenne (ng/mg)	15,56	1393	2947
Écart-type	2,2	112	435
CV (%)	14,3	8,1	14,8

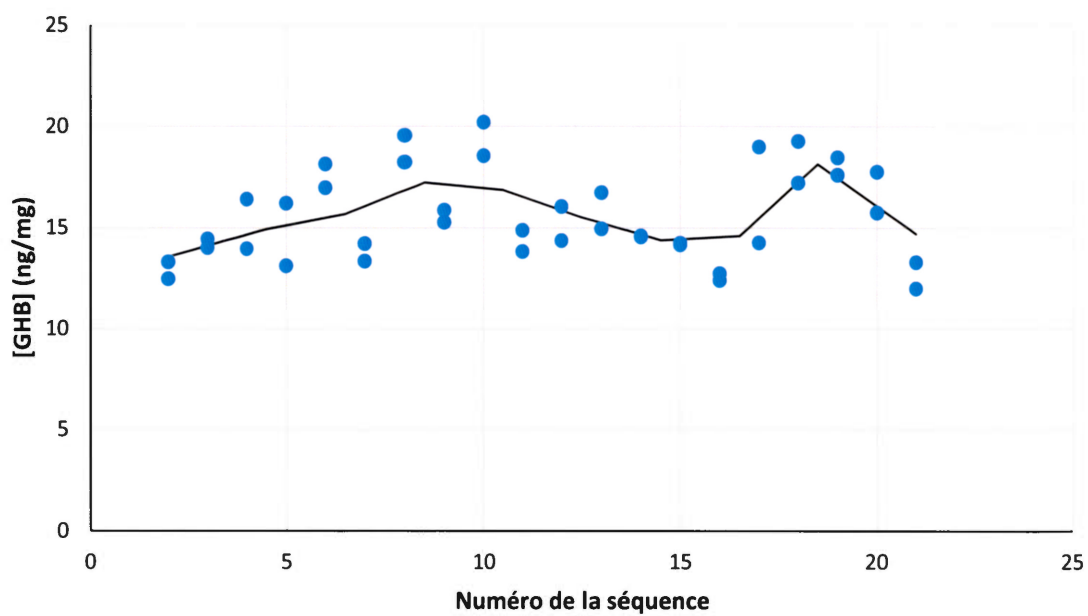


Figure 3.4 : Concentration en GHB du MR mesurée sur 20 séquences.

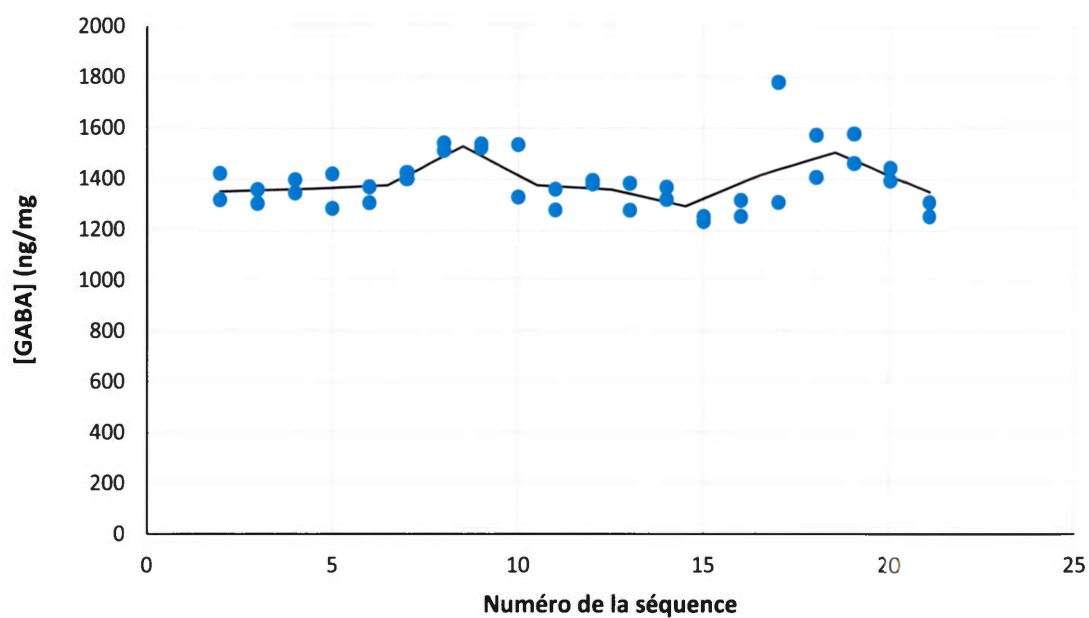


Figure 3.5 : Concentration en GABA du MR mesurée sur 20 séquences.

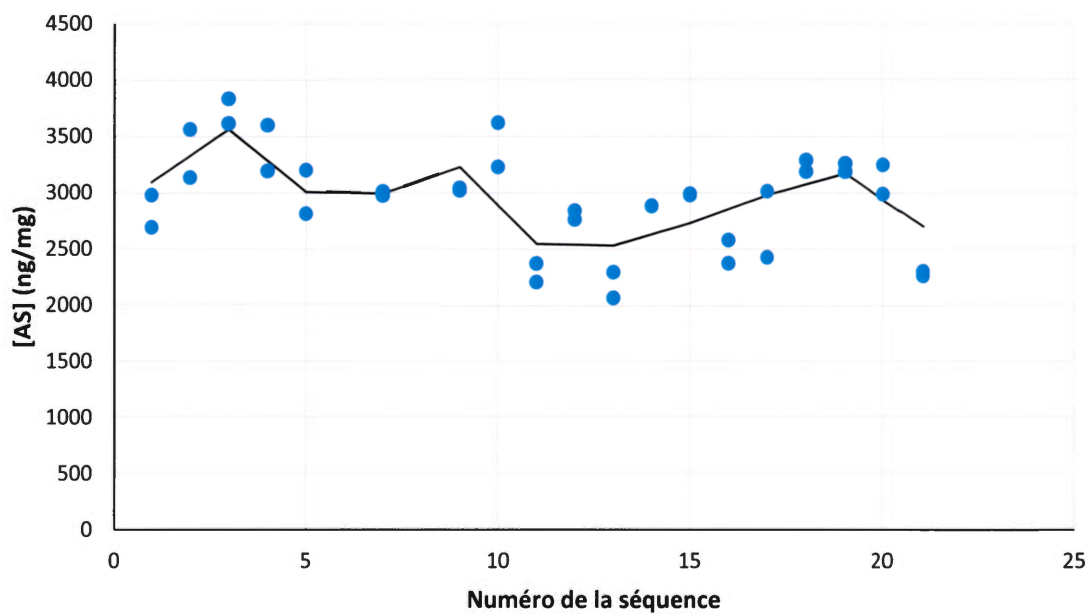


Figure 3.6 : Concentration en AS du MR mesurée sur 20 séquences.

Les graphiques de dispersion des concentrations (Figures 3.4 à 3.6) permettent de voir si une tendance se dégage avec le temps, par exemple une diminution des concentrations dans le temps. Dans le cas présent, il ne semble pas y avoir de tendance particulière pour les trois molécules. Les variations sont plutôt aléatoires. Les coefficients de variation sont tous en dessous de 15%, ce qui est acceptable. La méthode est reproductible d'une séquence à l'autre.

3.2.6 Spécificité

Les résultats d'optimisation des transitions sont présentés dans le Tableau 3.9 suivant.

Tableau 3.9 : Optimisation par CL-SM/SM des transitions MRM des isomères par le logiciel *Intellistart*TM.

Composé	Masse molaire (g/mol)	Ion précurseur (m/z)	Tension de cône (V)	Ions filles (m/z)	Énergie de collision (V)	Mode d'ionisation
AHB	104	103	4	57	10	ESI -
BHB	104	103	8	59	8	ESI -
AABA	103	104	22	41	18	ESI +
			22	58	8	ESI +
BABA	103	104	24	44	8	ESI +
			24	86	6	ESI +
MMA	118	117	8	55	20	ESI -
			8	73	8	ESI -

Le logiciel *Intellistart*TM trouve les transitions MRM les plus intenses, mais il peut y avoir d'autres transitions possibles. Cela a été observé pour l'AHB et le GABA, après leur analyse individuelle en solution pure dans un mélange ACN / eau (90 :10). Chaque

molécule a été analysée en surveillant toutes les transitions MRM d'une même série d'isomères. L'AHB présente un pic pour la transition $103 \rightarrow 57$, mais également pour la transition $103 \rightarrow 85$. Ces 2 transitions sont communes au GHB et à l'AHB. Le GABA a quant à lui obtenu un pic pour la transition $104 \rightarrow 41$, commune avec l'AABA, et pour la transition $104 \rightarrow 86$, commune avec le BABA. Le MMA est également une molécule qui risque d'interférer, car ses 2 transitions MRM sont communes avec celles de son isomère, l'acide succinique. Ces molécules doivent donc être bien séparées par la chromatographie liquide pour éviter une mauvaise quantification. Les 2 transitions utilisées pour analyser le GHB ne sont toutefois pas retrouvées pour le BHB, qui ne risque donc pas d'interférer.

En solution pure, les isomères sont tous séparés. Cependant, les temps de rétention ne sont pas nécessairement les mêmes qu'en présence de matrice. Un second test a été fait, cette fois en présence de la matrice. Pour ce faire, une solution à $10\,000\ \mu\text{g/L}$ est préparée pour chaque isomère. Pour l'AHB et le BHB, $5\ \mu\text{L}$ de cette solution sont ajoutés à $495\ \mu\text{L}$ d'une dilution $1 / 40$ d'un extrait de cheveux, dans un vial pour CL-SM/SM. Pour les trois autres isomères, $5\ \mu\text{L}$ de la solution à $10\,000\ \mu\text{g/L}$ ont été ajoutés à $495\ \mu\text{L}$ de la dilution $1 / 400$ du même échantillon de cheveux. Les isomères sont analysés dans le même solvant de reprise que les échantillons réels, en présence de matrice, pour qu'ils subissent les mêmes conditions chromatographiques.

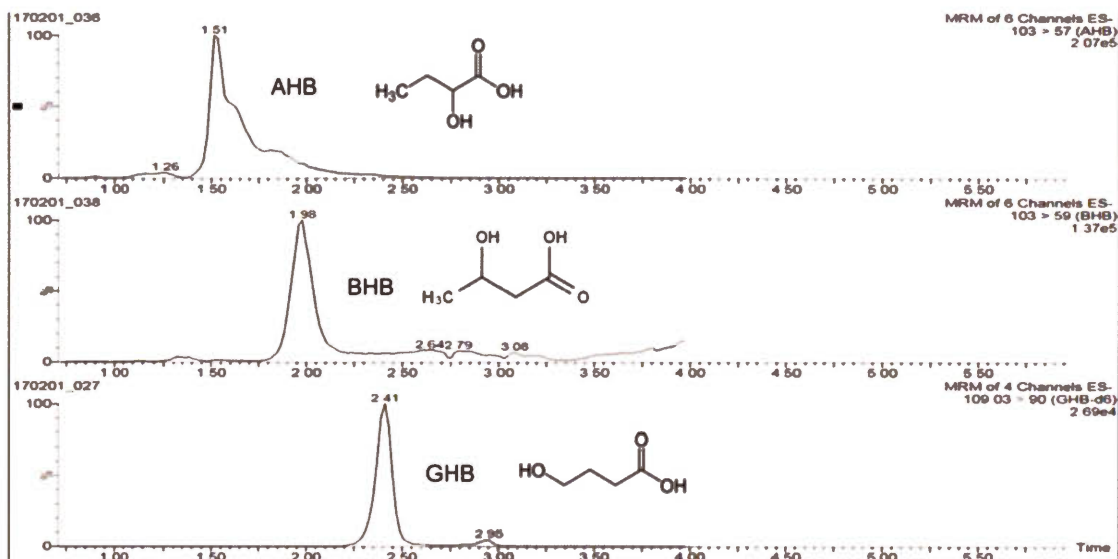


Figure 3.7 : Séparation chromatographique par colonne HILIC du GHB et de ses principaux isomères ajoutés à un digestat de cheveux.

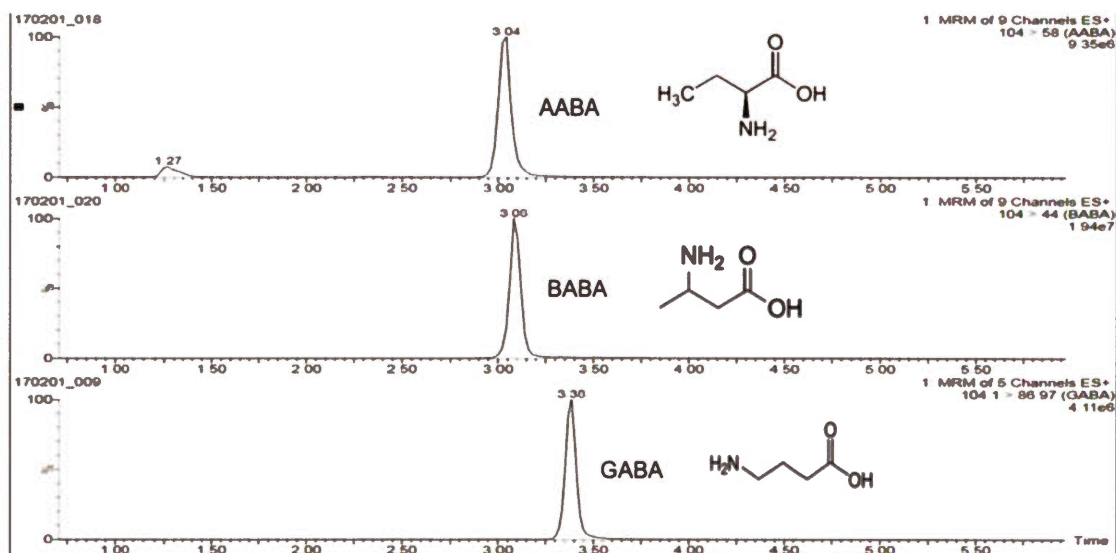


Figure 3.8 : Séparation chromatographique par colonne HILIC du GABA et de ses principaux isomères ajoutés à un digestat de cheveux.

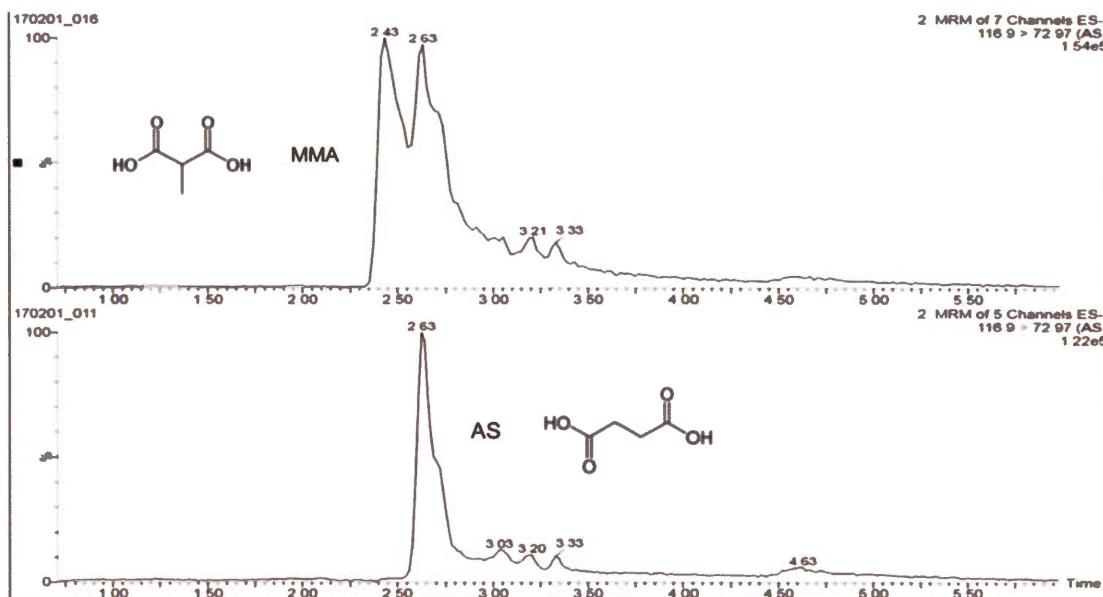


Figure 3.9 : Séparation chromatographique par colonne HILIC de l'AS et de son principal isomère ajoutés à un digestat de cheveux.

La Figure 3.7 montre que le GHB est bien séparé de ses 2 principaux isomères. Dans la Figure 3.8, il est possible de voir que le GABA est également bien séparé des isomères testés. Pour ce qui est de l'acide succinique, sa séparation avec le MMA n'est pas acceptable pour permettre une quantification de l'AS, comme le montre le premier chromatogramme de la Figure 3.9. Cependant, le 2^e chromatogramme de cette figure a été obtenu à partir d'un échantillon réel de cheveux dans lequel de l'AS a été ajouté et il n'y a pas de pic chromatographique observable au temps de rétention du MMA. Celui-ci n'est donc pas présent dans les cheveux et ne devrait pas créer d'interférence.

3.3 Effet de la masse de cheveux

Un test a été effectué pour connaître l'impact de la quantité de cheveux utilisés sur les concentrations obtenues pour les trois analytes. Pour ce faire, un même échantillon de

cheveux a été analysé en faisant varier la masse de cheveux digérés dans la bombe de digestion. L'échantillon a d'abord été coupé en segments de 5 mm qui ont ensuite été homogénéisés par agitation. Cinq différentes masses de cheveux ont été testées en triplicata : 2.5, 5, 10, 15 et 20 mg. Les résultats de ces tests, présentés dans les Figures 3.10, 3.11 et 3.12 montrent que pour une même matrice, les concentrations obtenues sont différentes selon la quantité de cheveux mise dans la bombe de digestion. En effet, plus la quantité de cheveux est élevée, plus la concentration obtenue est faible et ce, pour les trois molécules. Le GHB est particulièrement affecté par des masses plus élevées. En effet, lorsqu'on compare les masses de 5 et 20 mg, la diminution est d'environ 80% pour le GHB alors qu'elle est seulement d'environ 50% pour le GABA et l'AS.

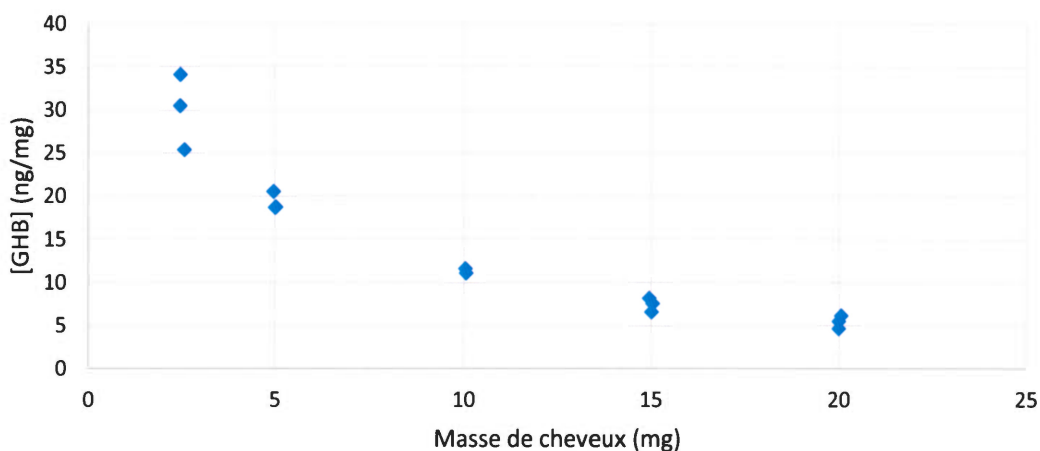


Figure 3.10 : Concentration en GHB mesurée par CL-SM/SM en fonction de la masse de cheveux hydrolysés.

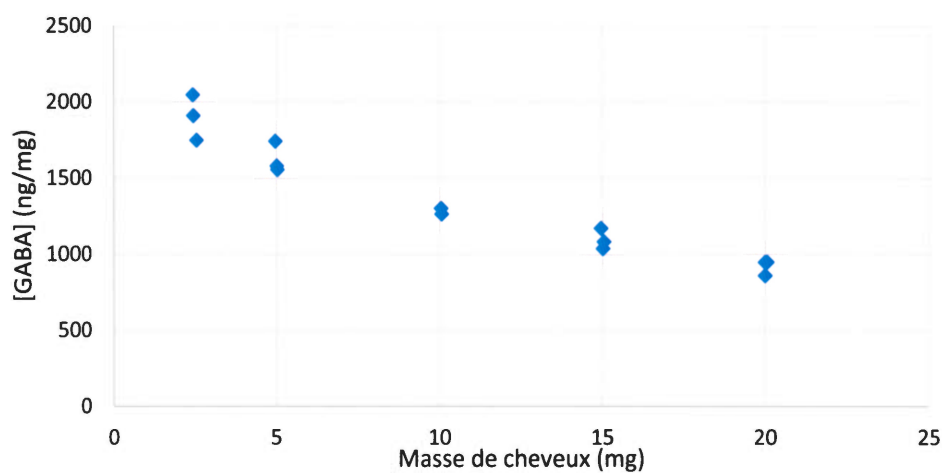


Figure 3.11 : Concentration en GABA mesurée par CL-SM/SM en fonction de la masse de cheveux hydrolysés.

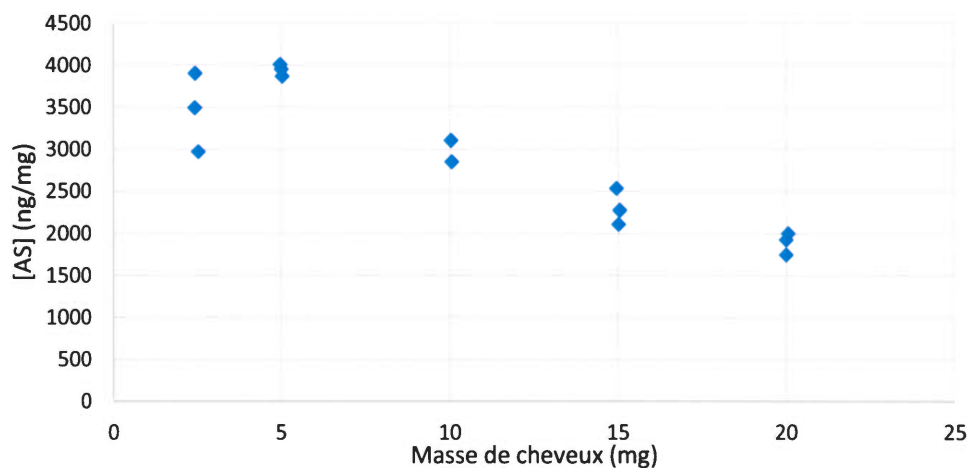


Figure 3.12 : Concentration en AS mesurée par CL-SM/SM en fonction de la masse de cheveux hydrolysés.

Ces graphiques montrent également qu'il y a une variation plus grande des résultats pour une masse de 2,5 mg de cheveux. À l'inverse, ce sont les masses de 5 et 10 mg de cheveux qui ont les coefficients de variation les plus faibles pour les trois molécules. Ces deux masses donnent des résultats plus précis et sont donc les plus appropriées

pour l'analyse. Les données statistiques des trois réplicats pour les trois analytes sont présentées dans le Tableau 3.10.

Tableau 3.10 : Mesures statistiques des concentrations en GHB, GABA et AS selon la masse de cheveux digérés.

Masse cheveux (mg)		[GHB] (ng/mg)	[GABA] (ng/mg)	[AS] (ng/mg)
2,5	Moyenne	30,0	1902	3458
	% variation	14,6	7,7	13,5
5	Moyenne	19,3	1626	3946
	% variation	5,4	6,1	1,8
10	Moyenne	11,4	1283	2981
	% variation	3,2	2,0	5,9
15	Moyenne	7,5	1099	2307
	% variation	10,6	6,1	9,2
20	Moyenne	5,4	920	1894
	% variation	13,7	5,5	6,9

Pour déterminer s'il y a suppression d'ionisation en présence de plus de cheveux, les aires des pics des standards internes ont été comparées. Pour le GHB, il n'y a pas de différence significative entre les aires du GHB-d6 pour les différentes masses de cheveux. Il n'y a donc pas de suppression d'ionisation en présence de plus de matrice. Pour le GABA, une diminution est observée lorsque la masse de cheveux augmente. L'aire du GABA-d6 passe d'environ 400 000 à environ 300 000. L'augmentation de la quantité de cheveux entraîne donc une augmentation de la suppression d'ionisation. Pour l'AS, c'est l'inverse. L'aire du standard interne augmente avec l'augmentation de la masse de cheveux. Davantage de matrice favorise donc l'ionisation de cette molécule. Cela concorde avec le test d'effet matrice instrumental pour lequel une augmentation d'ionisation est remarquée en présence de la matrice.

Afin de s'assurer que la suppression ou l'augmentation d'ionisation est la même pour le SI que pour son analyte correspondant, deux courbes d'étalonnage ont été préparées

à partir d'une même matrice. La première courbe a été préparée à partir d'une digestion contenant 5 mg de cheveux et la deuxième à partir d'une digestion contenant 10 mg de cheveux. Le Tableau 3.11 rapporte les paramètres des équations des courbes d'étalonnage des 3 molécules d'intérêt. Il est possible d'y voir que pour les 3 analytes, les pentes des 2 courbes sont similaires, ce qui indique que la suppression d'ionisation est la même pour les analytes et pour leur SI respectif. Les ordonnées à l'origine des droites sont utilisées pour calculer la concentration endogène de chaque analyte, également rapportées dans le Tableau 3.11. Encore une fois, les concentrations endogènes obtenues pour la digestion avec 5 mg sont plus grandes que celles pour la digestion à 10 mg de cheveux. La digestion semble donc moins efficace lorsqu'il y a plus de cheveux pour un même volume de solution de NaOH utilisé pour l'hydrolyse alcaline.

Tableau 3.11 : Paramètres des courbes d'étalonnage du GHB, du GABA et de l'AS selon la masse de cheveux digérée, avec les concentrations endogènes correspondantes.

Molécule	GHB		GABA		AS	
Masse de cheveux (mg)	5	10	5	10	5	10
Pente	0,0260	0,0268	0,0157	0,0162	0,0032	0,0033
Ordonnée à l'origine	0,087	0,085	0,713	1,021	0,406	0,460
Concentration endogène (ng/mg)	13,4	6,3	1817	1260	5075	2788

Étant donné que les échantillons de cheveux analysés n'ont pas tous la même masse par segment, un graphique de la concentration obtenue en fonction de la masse de cheveux pesée a été fait pour chacune des trois molécules (Figures 3.13 à 3.15). Tous les échantillons analysés au cours de l'étude y sont rapportés. Il s'y dégage la même tendance pour laquelle les masses plus élevées donnent des concentrations plus faibles et ce pour les trois analytes. La masse de cheveux hydrolysés influence l'efficacité de la digestion et donc la concentration obtenue. Pour notre étude, nous tentons d'observer

des variations dans les concentrations de différents segments d'une même mèche de cheveux. Il est donc important d'utiliser toujours la même quantité de cheveux pour un même spécimen.

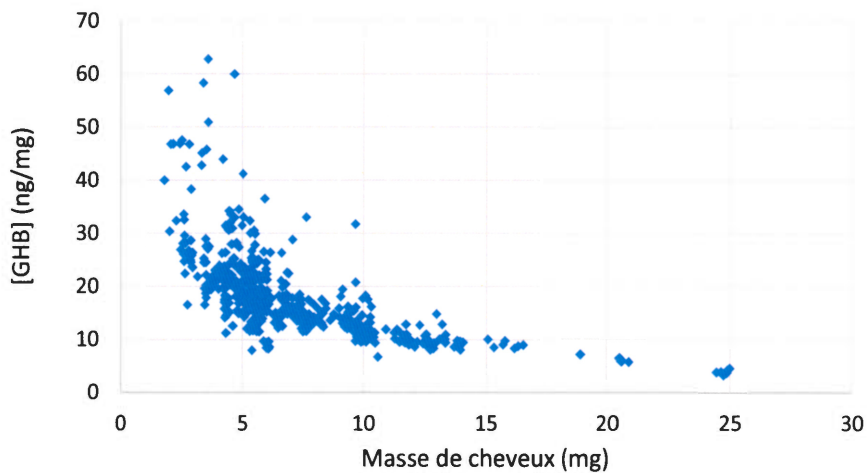


Figure 3.13 : Concentrations en GHB mesurées par CL-SM/SM en fonction de la masse de cheveux hydrolysés.

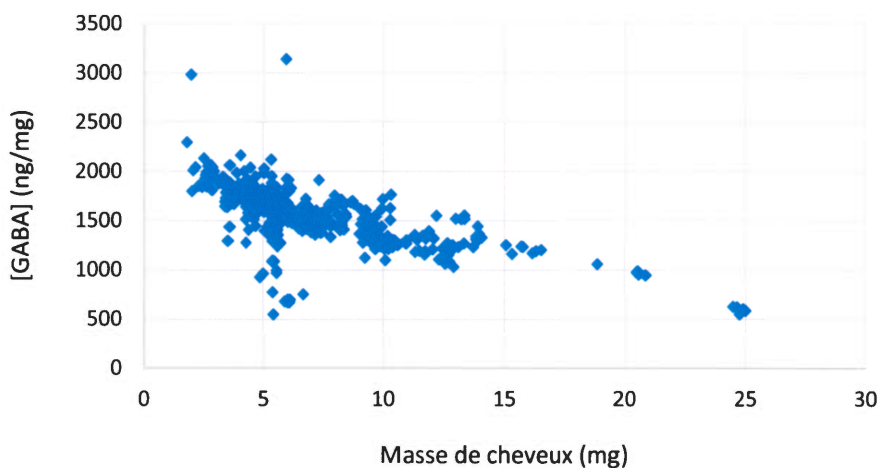


Figure 3.14 : Concentrations en GABA mesurées par CL-SM/SM en fonction de la masse de cheveux hydrolysés.

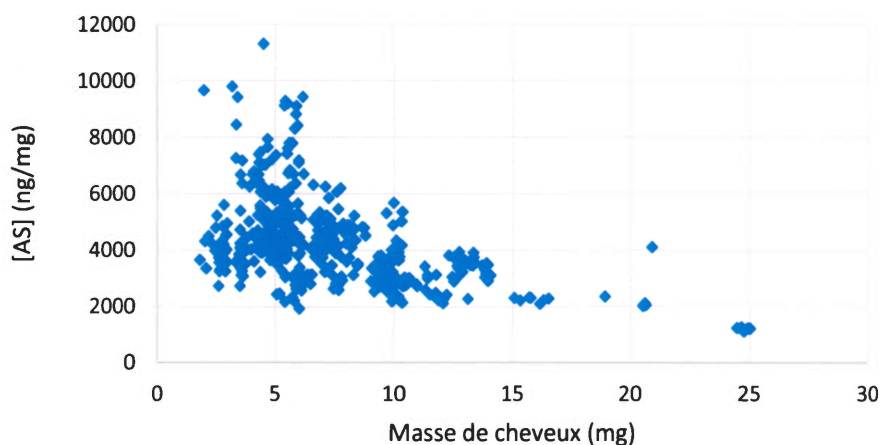


Figure 3.15 : Concentrations en AS mesurées par CL-SM/SM en fonction de la masse de cheveux hydrolysés.

Comme mentionné dans le chapitre 2, les tests de validation ont été faits en ajoutant les standards internes après la digestion seulement pour éviter les variations dues à la perte de deutériums pendant l'hydrolyse. Cependant, le fait de ne pas faire suivre les standards internes avec les analytes du début à la fin peut également apporter un biais analytique. Il aurait été préférable d'utiliser des standards internes marqués au carbone 13 plutôt qu'avec des deutériums, mais nous n'en avons pas de disponible. Les tests de validation de la méthode donnent tout de même des résultats acceptables, ce qui indique que l'étape d'hydrolyse des cheveux n'apporte pas trop de biais.

3.4 Résultats des segments

Pour cette étude, nous avons accès à 73 échantillons de cheveux de personnes n'ayant pas consommé de GHB. Pour ces échantillons, les concentrations en GHB, GABA et AS ont été mesurées et les ratios $[GHB] / [GABA]$ et $[GHB] / [AS]$ calculés pour les 7 premiers segments de la mèche (5 ou 6 lorsque la mèche n'était pas assez longue). Nous

voulions vérifier si les ratios de concentrations obtenus pour les segments d'une même mèche étaient plus constants que la concentration en GHB dans ces segments. Les coefficients de variation des ratios et des concentrations en GHB ont donc été comparés. Les analyses compilées démontrent que les concentrations en GABA et en AS dans les cheveux sont beaucoup plus élevées que celles du GHB. En effet, pour le GHB, les valeurs de concentration se retrouvent entre 5 et 60 ng/mg alors que pour le GABA et l'AS, elles oscillent respectivement entre 1000 et 3000 ng/mg et entre 2000 et 10 000 ng/mg. Les concentrations en GABA et en GHB concordent avec le pourcentage de 1-2 % de GABA transformé en GHB au niveau du cytosol, mentionné précédemment dans l'état de l'art. La concentration élevée d'acide succinique peut s'expliquer par le fait que cette molécule est un métabolite intermédiaire du cycle de Krebs, processus qui permet de fournir l'énergie au corps humain (Voet et Voet, 2016). Il est donc normal de retrouver des concentrations aussi élevées. La similitude entre les trois molécules quant à leur lipophilicité, leur hydrophilicité et leur masse laisse croire qu'aucune d'entre elles n'est favorisée par rapport à l'autre quant à leur incorporation dans les cheveux. Les différences de concentrations ne sont pas dues à cela.

Les concentrations en GHB obtenues pour les différents spécimens sont beaucoup plus élevées que ceux rapportés dans la littérature. En effet, le plus haut niveau de GHB retrouvé (i.e. 12 ng/mg) a été obtenu par Kintz et al. en 2003 et Cirimele et al. en 2010. La concentration moyenne de GHB des échantillons de cheveux analysés lors de notre étude avoisine davantage les 18 ng/mg, avec des valeurs de point atteignant 60 ng/mg. Or, notre méthode de digestion diffère sur plusieurs points par rapport à ce qui a été fait dans le passé. En effet, la température est plus élevée (110°C vs maximum 95°C), le temps d'hydrolyse est plus long (24 h vs maximum 16 h) et le procédé d'extraction s'effectue sous pression dans une bombe de digestion. Ces facteurs contribuent tous à l'augmentation de l'efficacité de la digestion des cheveux, augmentant ainsi la

libération des molécules emprisonnées dans les structures kératinisées du cheveu. Cela pourrait entre autres expliquer les concentrations plus élevées que nous avons obtenues.

Plusieurs auteurs ont rapporté que le premier segment de cheveux en partant de la racine avait une concentration souvent plus élevée en GHB que les autres segments, probablement dû à une contamination par la sueur dans ce segment (Bertol *et al.*, 2015; Kintz *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2016). Ce phénomène n'a pas été observé lors de notre étude. Cela peut être dû au fait que notre méthode de lavage implique un lavage à l'eau et au méthanol, alors que les autres auteurs n'utilisent que du dichlorométhane. Ces deux solvants plus polaires parviennent possiblement mieux à solubiliser le GHB en surface et donc à l'éliminer.

Fait à mentionner, il a été observé que la concentration en GABA est très constante d'un segment à l'autre pour une même mèche de cheveux. Les coefficients de variation sont faibles, soient autour de 5%. La concentration en GHB varie quant à elle beaucoup plus. Pour certains échantillons de cheveux, les variations de GHB et de GABA vont dans le même sens, ce qui donne en général un coefficient de variation plus faible pour le ratio $[GHB] / [GABA]$ que pour la concentration en GHB. Cependant, pour la majorité des spécimens, les variations ne sont pas nécessairement dans le même sens pour les 2 molécules. Contrairement à ce qui était attendu comme hypothèse, une augmentation de GABA n'entraîne pas nécessairement une augmentation de GHB. Le ratio varie donc beaucoup d'un segment à l'autre et la normalisation des segments avec l'application des ratios n'est pas toujours vérifiée. Le coefficient de variation du ratio n'est donc en général pas plus faible que celui observé pour la concentration en GHB seule. Les concentrations mesurées de GHB sont possiblement trop basses comparativement à celles du GABA.

Les concentrations en acide succinique des segments d'une même mèche de cheveux sont beaucoup plus variables que celles du GABA. Tout comme pour le GABA, l'augmentation du GHB n'est pas nécessairement liée à une augmentation de l'acide succinique. Il arrive même que les variations soient à l'opposé. Un exemple de cette observation est rapporté dans la Figure 3.16 avec les segments 2, 3 et 4. Le ratio $[GHB] / [AS]$ n'améliore pas l'intravariabilité des segments. Dans la majorité des cas, le coefficient de variation est plus élevé que celui du GHB seul. Étant donné que l'AS n'est pas impliqué exclusivement dans le métabolisme du GABA et du GHB, sa concentration ne variera pas seulement en fonction des concentrations de ces deux molécules. D'autres facteurs indépendants vont affecter sa concentration. Il n'est donc pas possible d'utiliser cette molécule pour normaliser les signaux d'un segment à l'autre.

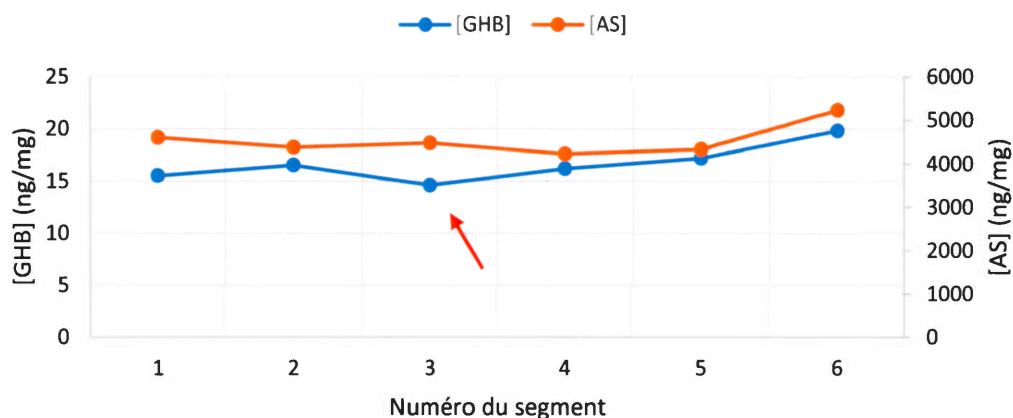


Figure 3.16 : Graphique des concentrations en GHB et en AS mesurée par CL-SM/SM dans différents segments d'une même mèche de cheveux.

La distribution des concentrations moyennes de GHB pour tous les segments de cheveux analysés au cours des deux campagnes de prélèvement ($N = 73$ personnes) est présentée graphiquement dans la Figure 3.17. La moyenne de cette distribution est de 16,2 ng/mg avec une déviation standard de 5,8.

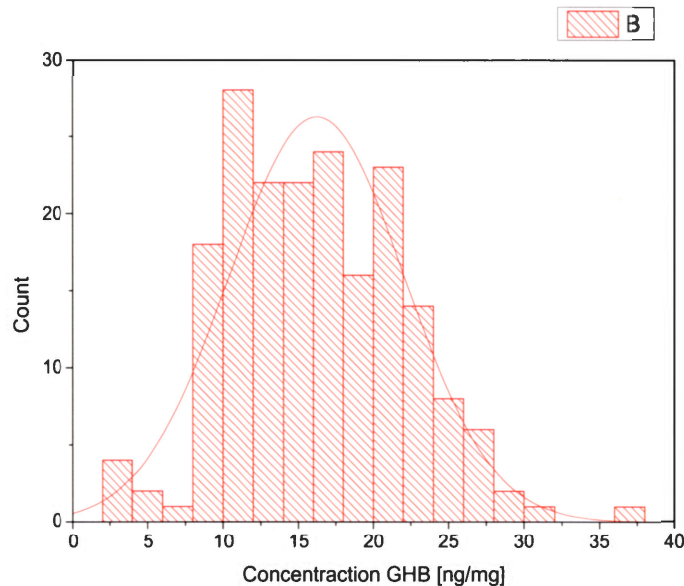


Figure 3.17 : Distribution des concentrations de GHB retrouvées dans les cheveux normaux de volontaires (N= 73 personnes).

Chacun des spécimens de cheveux a également été rapporté sous forme de diagramme en boîte quant à leur concentration en GHB dans la Figure 3.18. Les différentes couleurs de diagrammes sont fonction de la masse moyenne de cheveux hydrolysés pour les segments de l'échantillon. La grande variation inter-individus est visible sur ce graphique. Il est également possible de voir que plus la moyenne de GHB est élevée, plus la variation est élevée. Cela est plus évident dans la Figure 3.19 qui présente la corrélation existante entre l'écart-type et la moyenne qu'on appelle hétéroscédasticité. Cela aura comme conséquence que la tolérance sera plus grande à obtenir une valeur extrême lorsque la moyenne des concentrations en GHB sera plus élevée.

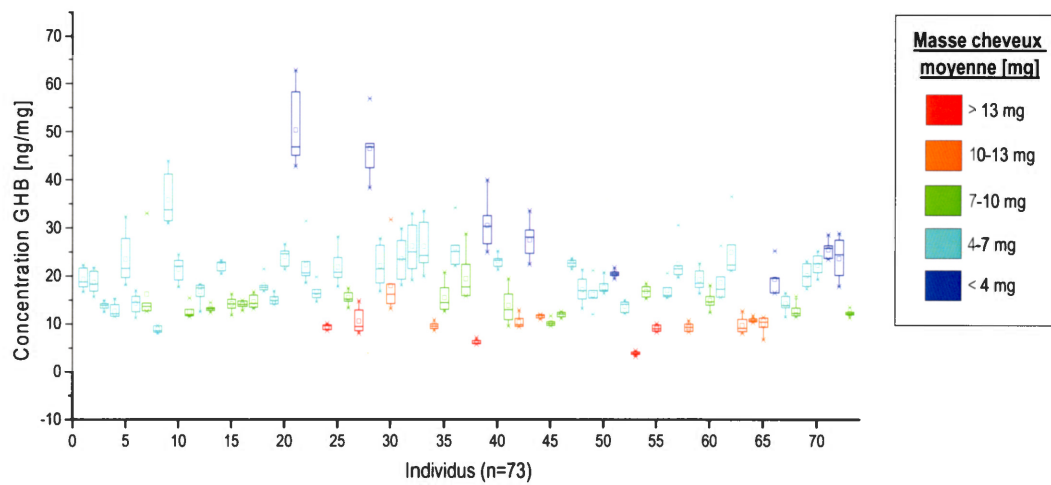


Figure 3.18 : Diagrammes à boîte des concentrations en GHB de chacun des spécimens de cheveux analysés.

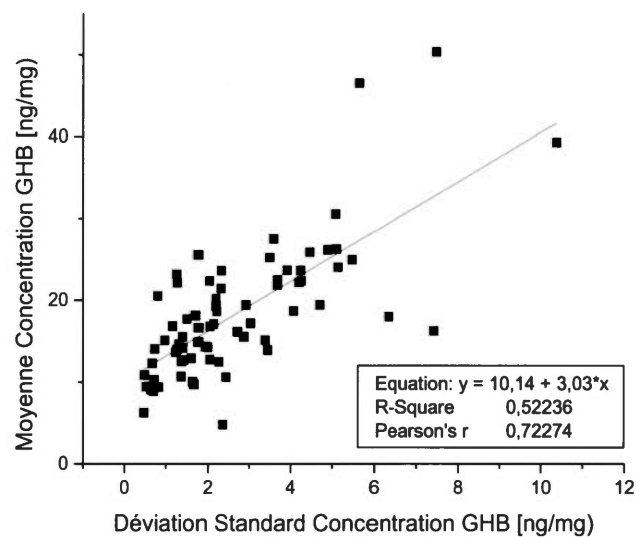


Figure 3.19 : Corrélation entre la concentration moyenne en GHB des segments d'un échantillon de cheveux et sa déviation standard.

3.5 Résultats des cas potentiellement positifs

Au cours de notre étude, nous avons reçu un échantillon de cheveux d'une personne affirmant avoir consommé du GHB (échantillon P-Br-126) et une quinzaine de spécimens de cheveux de victimes potentielles suspectant avoir été intoxiquées avec du GHB. Parmi les spécimens possiblement positifs analysés, seulement deux ont donné un résultat suspect. Afin de vérifier notre protocole analytique, nous avons analysé ces spécimens avec la méthode développée. Les résultats obtenus sont présentés dans cette section.

3.5.1 Analyse des ratios

L'échantillon positif P-Br-126 est une mèche de cheveux de couleur naturelle brune ayant subi une décoloration et une teinture une semaine avant le prélèvement. Pour procéder à son analyse, la mèche a été coupée en segments de 5 mm. Le premier segment était presque entièrement de couleur naturelle, avec seulement une petite portion teinte. Le reste de la mèche était teint. L'homme a affirmé avoir consommé du GHB à trois reprises, soit 4,5 semaines, 8 semaines et 10 semaines avant le prélèvement. À l'aide de sa teinture, dont la date était connue, il a été possible de déterminer le taux de pousse de ses cheveux. Il était d'environ 1,5 cm par mois ou 0,5 mm par jour. La consommation qui a eu lieu 4,5 semaines avant devrait se retrouver à environ 1,6 cm, ce qui est près d'un endroit où la mèche est coupée (1,5 cm). Étant donné qu'il peut y avoir un léger décalage de cheveux, l'augmentation de GHB est attendue dans le 3^e ou 4^e segment, ou les deux. La prise de GHB d'il y a 8 semaines devrait se retrouver à 2,8 cm dans le 6^e segment et celle de 10 semaines avant à 3,5 cm donc dans le 7^e ou 8^e segment. Huit segments ont pu être analysés. Cependant, le

premier segment a dû être mis de côté, car sa masse était seulement de 9 mg comparativement à 11 mg pour les autres segments, ce qui aurait pu engendrer de fausses concentrations plus élevées. Les concentrations des autres segments sont représentées dans la Figure 3.20 suivante. Étant donné les prises rapprochées de GHB, il est difficile d'obtenir un segment ayant le niveau endogène. En effet, des doses plus élevées sont attendues dans les segments 3-4, 6 et 7-8. Il reste donc le segment numéro 2 qui représente le mieux le niveau endogène. En se fiant sur ce segment, il est possible de constater une légère augmentation de la concentration de GHB, présentée en bleu dans le graphique, dans le 3^e et un peu plus dans le 4^e segment. Cela concorde avec la dernière consommation, mais l'augmentation de GHB est tout de même peu élevée : elle passe de 3,5 ng/mg dans le 2^e segment à 4,3 ng/mg dans le 4^e segment, une augmentation d'un facteur 1,23. Les segments 5-6-7 ont des concentrations semblables à celles du segment positif 4. Cela est logique pour le segment 6 qui correspond à la consommation 8 semaines auparavant. Pour les segments 5 et 7, cela peut être expliqué par le fait qu'ils sont adjacents à des segments positifs, donc s'il y a eu un léger décalage de quelques cheveux de la mèche, cela peut entraîner une augmentation de ces segments également. Finalement, le segment 8 montre une augmentation plus marquée de GHB mais toutefois toujours faible, soit d'un facteur d'environ 1,75. Cela concorde avec une prise de GHB 10 semaines plus tôt. Étant donné que le consommateur s'est procuré la drogue sur le marché noir, il n'est pas possible de connaître la dose ingérée. Selon le graphique, la première dose était probablement plus élevée que les deux autres. Il ne faut pas oublier que ces cheveux ont subi une décoloration suivie d'une teinture une semaine avant le prélèvement. Cela a pu abîmer les cheveux et entraîner une perte ou une dégradation des molécules qui s'y trouvaient. Toujours dans la Figure 3.20, on peut voir le niveau endogène de GABA qui est assez constant d'un segment à l'autre et celui de l'AS qui est plus variable.

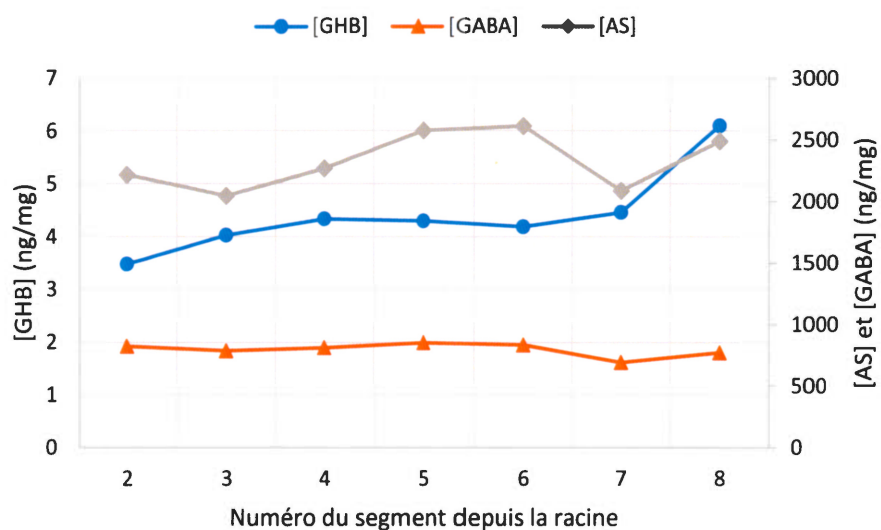


Figure 3.20 : Graphique de la concentration des trois molécules dans les différents segments de cheveux de la mèche P-Br-126.

Malgré une situation plus complexe causée par de multiples consommations de GHB et la décoloration subie par les cheveux, les ratios ont tout de même été testés sur ce spécimen pour voir ce qu'il était possible d'en tirer. Le graphique 3.21 montre les deux ratios en comparaison avec la concentration en GHB seule.

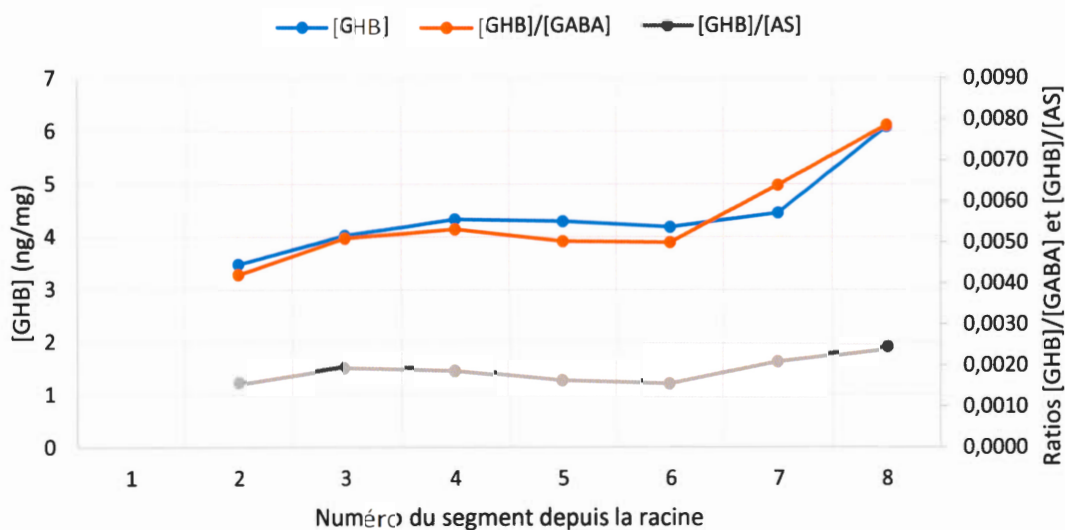


Figure 3.21 : Graphique de la comparaison des deux ratios versus la concentration de GHB dans les différents segments de la mèche P-Br-126.

Le graphique de la Figure 3.21 montre que l'augmentation des segments positifs n'est pas plus marquée lorsque les concentrations en GHB sont normalisées avec celle du GABA ou de l'AS. Pour le ratio $[GHB] / [AS]$ présenté en gris, le segment 8 n'est plus que 1,5 fois plus élevé que le segment 2. Pour ce qui est du ratio $[GHB] / [GABA]$, il y a un facteur de 1,86 entre ces 2 mêmes segments, ce qui est légèrement plus élevé que celui de 1,75 pour la concentration en GHB seule. Il semble donc y avoir une très légère amélioration de la détection d'un segment positif avec ce ratio. Il faut vérifier si cela se produit également pour d'autres matrices positives.

Le premier cas est une jeune femme qui pense avoir été droguée au GHB 7 semaines avant la date du prélèvement des cheveux. Le numéro du spécimen est le P-Br-76. Ses cheveux sont non teints. Huit segments ont été analysés. Les résultats des deux ratios et de la concentration en GHB de chaque segment sont représentés dans la Figure 3.22.

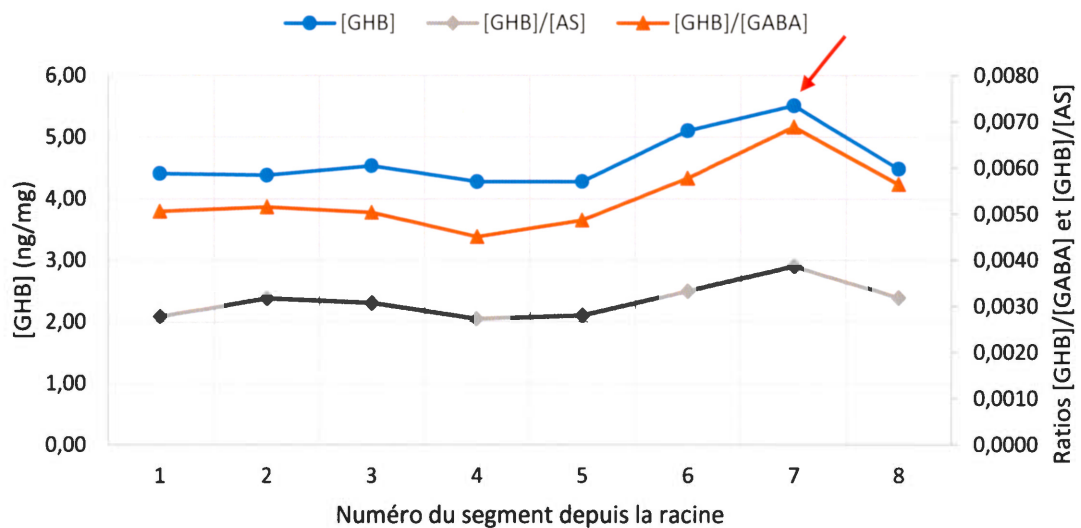


Figure 3.22 : Graphique de la comparaison des deux ratios versus la concentration de GHB dans les différents segments de la mèche P-Br-76.

Encore une fois, l'augmentation de la concentration de GHB dans le segment 7 est très faible. Le segment 6 peut être également élevé en raison d'un décalage de certains cheveux de la mèche ou encore en raison de quelques cheveux qui ont poussé plus lentement que les autres. La moyenne des segments 1 à 5 et 8 qui représentent le niveau endogène qui est de 4,4 ng/mg. Le niveau de GHB dans le segment 7 est de 5,5 ng/mg ce qui représente une augmentation d'un facteur de seulement 1,25. Avec un tel ratio, il est difficile de confirmer qu'il s'agit bel et bien d'une consommation de GHB. Étant donné qu'une consommation 7 semaines plus tôt est soupçonnée, que le segment positif est le 7^e segment donc de 3 à 3,5 cm et qu'il faut 7 à 10 jours aux cheveux pour sortir du crâne (Cooper, 2011), le taux de pousse serait entre 2,0 et 2,5 cm/mois, ce qui est plausible. Malheureusement, nous n'avons pas de 2^e prélèvement pour confirmer le taux de croissance des cheveux. Le ratio [GHB] / [GABA] est en moyenne de 0,0049 pour les cinq premiers segments. Il est de 0,0069 dans le 7^e segment, ce qui fait une augmentation d'un rapport de 1,40, soit un peu plus élevé que celui de 1,25 pour le GHB. Encore une fois, il semble que ce ratio améliore légèrement le facteur

d'augmentation des segments positifs. Le ratio $[GHB] / [AS]$ passe quant à lui de 0,00298 dans les cinq premiers segments à 0,00387 dans le 7^e segment, un ratio 1,30 fois plus élevé. L'augmentation est donc légèrement plus marquée avec ce ratio qu'avec la concentration en GHB seul, mais pas de manière significative.

Le deuxième cas est celui d'une jeune femme qui croit s'être fait droguée au GHB 14 mois auparavant. Ses cheveux n'ont pas été teint depuis l'incident. Le numéro de l'échantillon est le P-Br-71. Étant donné que l'incident a eu lieu plusieurs mois auparavant et que le taux de croissance de ses cheveux n'était pas connu, 28 segments de 0,5 cm ont été analysés, à partir du segment à une distance de 6 à 6,5 cm du crâne. Les résultats des concentrations des trois molécules de chacun des segments sont représentés graphiquement dans la Figure 3.23. Il est possible d'y voir une importante augmentation de GHB dans le 20^e segment, soit le segment à une distance de 15,5 à 16 cm du crâne. Il semble bel et bien y avoir eu consommation de GHB. Étant donné le temps écoulé de 14 mois, le taux de croissance des cheveux de cette femme est d'environ 1,1 cm par mois, ce qui est dans la moyenne.

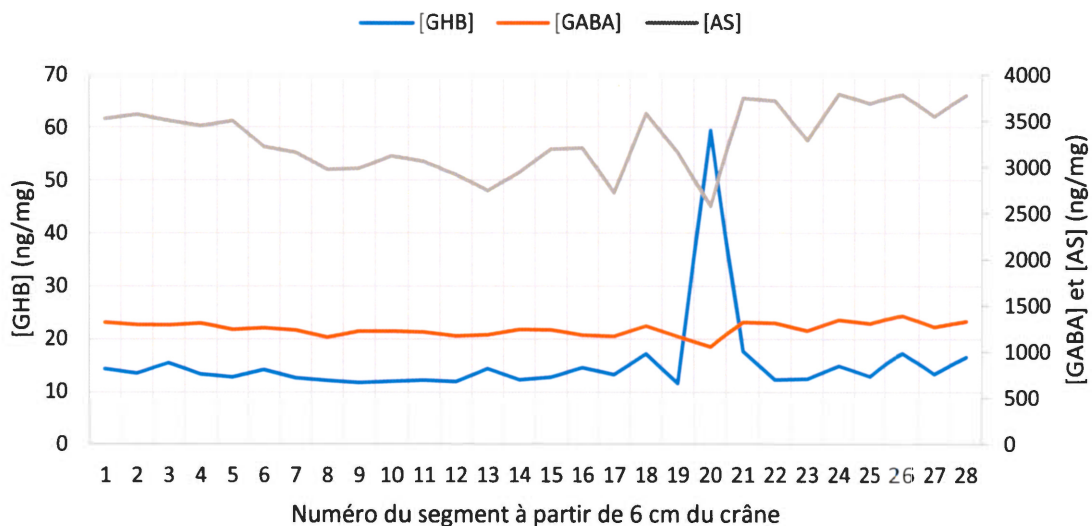


Figure 3.23 : Graphique de la concentration des trois molécules dans les différents segments de cheveux de la mèche P-Br-71.

La concentration de GHB dans le 20^e segment est de 59,4 ng/mg alors que la moyenne des autres segments est de seulement 13,7 ng/mg. Cela donne une augmentation d'un facteur 4,3. Ce facteur est beaucoup plus élevé que celui des deux cas positifs précédents. Pour ce qui est de la concentration en GABA dans ce segment, il est possible de voir une légère diminution comparativement à la moyenne des autres segments. En effet, la concentration n'est que de 1059 ng/mg alors que la moyenne des autres segments est de 1260 ng/mg avec un faible écart-type de 62 ng/mg. L'augmentation de GHB dans le corps semble donc avoir inhibé légèrement la production de GABA. Or, le métabolisme exogène du GHB décrit dans le premier chapitre n'explique pas ce phénomène d'inhibition. Au contraire, le GHB induit une augmentation de la libération de GABA. Cependant, il s'agit de l'effet immédiat de la présence élevée de GHB. Actuellement, notre niveau de connaissances ne nous permet pas d'affirmer qu'une libération importante de GABA entrainerait une diminution de sa production pour les heures à venir.

Pour ce cas, les deux ratios ont également été comparés avec la concentration en GHB. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.24. Le ratio $[GHB] / [GABA]$ dans le segment 20 est de 0,0561 alors qu'il est en moyenne de 0,0109 dans les autres segments. Cela donne une augmentation d'un facteur 5,1, ce qui est plus élevé que le facteur d'augmentation de la concentration en GHB de 4,3 dans ce même segment. Pour ce qui est du ratio $[GHB] / [AS]$, il passe d'en moyenne 0,00415 dans les segments normaux à 0,02305 dans le segment positif, ce qui donne un facteur d'augmentation de 5,6. Dans ce cas-ci, les deux ratios améliorent de manière significative la démarcation du segment positif des autres segments, facilitant l'identification de la consommation de GHB.

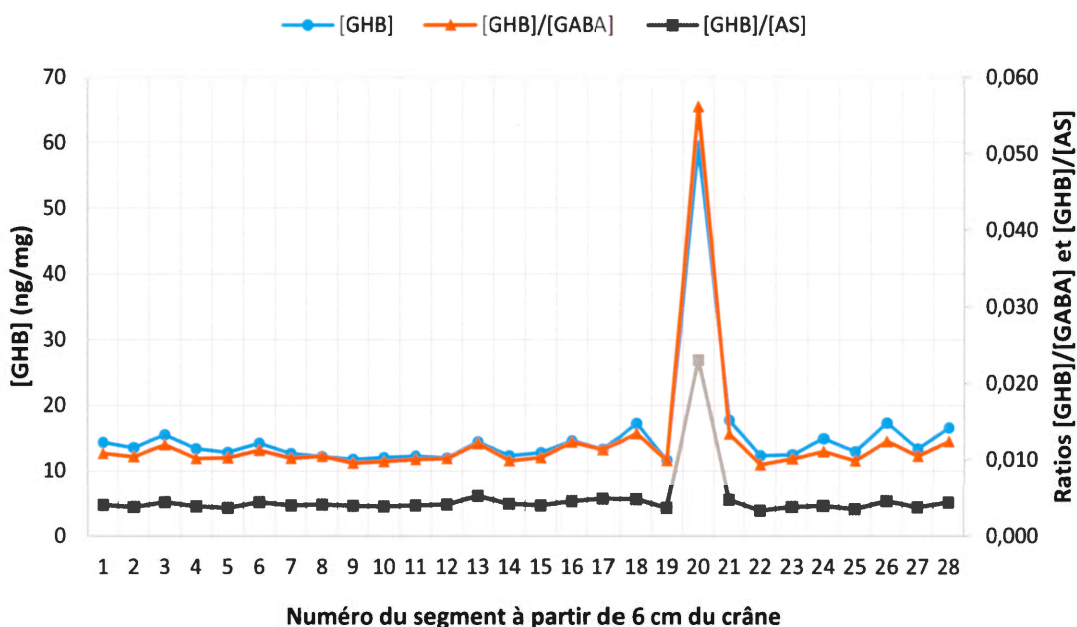


Figure 3.24 : Graphique de la comparaison des deux ratios versus la concentration de GHB dans les différents segments de la mèche P-Br-71.

Ces trois cas positifs ou suspectés positifs semblent montrer que les ratios améliorent légèrement la détection du GHB exogène dans les cheveux. Il faudrait cependant

analyser d'autres spécimens de cheveux positifs pour vérifier si cela pourrait être confirmé sur une plus grande population. En ce sens, la tenue d'une éventuelle étude clinique pourrait s'avérer nécessaire.

3.5.2 Analyse de valeurs aberrantes

Une approche statistique a aussi été évaluée pour voir s'il y avait un autre moyen de déterminer un segment suspect en GHB. Il s'agit d'une approche par la mesure de valeurs aberrantes. Ce type de tests est habituellement utilisé lorsque des valeurs extrêmes sont rencontrées dans un ensemble de mesures pour déterminer s'il s'agit d'erreurs analytiques. Précisément, les tests indiquent si statistiquement, la valeur suspecte devrait être éliminée ou non. Pour notre étude, nous tentons également de trouver des valeurs suspectes de concentrations de GHB, mais dans le but de déceler un apport de GHB exogène. En appliquant un test de valeur aberrante à nos spécimens de cheveux, il est possible d'évaluer si une valeur est significativement différente des autres valeurs et ainsi suspecter un apport exogène. À notre connaissance, ce type de tests n'a jamais été appliqué pour la détection de GHB exogène dans les cheveux.

Le test utilisé est le test de Grubbs qui permet de tester l'hypothèse que toutes les valeurs mesurées proviennent d'une même population. Pour une valeur suspecte, il faut calculer la valeur de Grubbs (G) selon l'équation 5 et la comparer avec la valeur critique correspondante dans la table de Grubbs. Les valeurs dépendent du nombre de mesures et du niveau de confiance voulu. La table de Grubbs se trouve à l'annexe 2.

$$G = | \text{Valeur suspecte} - \text{Moyenne} | / \text{Écart-type} \quad (5)$$

La moyenne et l'écart-type sont calculés avec la valeur suspecte. Si la valeur G obtenue est plus grande que celle dans la table de Grubbs, la valeur est réellement suspecte. Étant donné que nous voulons vérifier si une valeur est suspecte par rapport au niveau endogène de GHB, il est important de comparer cette valeur avec celles des segments pour lesquels nous sommes sûrs qu'ils correspondent à des concentrations endogènes. Il est donc recommandé d'enlever le segment qui précède et parfois aussi celui qui suit le segment suspect, car ceux-ci peuvent également contenir du GHB exogène pour les raisons mentionnées dans la section sur l'interprétation des résultats (section 1.3.3.5). Par conséquent, ce test pourrait s'avérer non concluant s'il est appliqué à des spécimens de cheveux provenant d'un consommateur régulier de GHB présentant peu de segments avec GHB endogène. En ce qui concerne notre étude, le test de Grubbs a été effectué pour les concentrations de GHB des deux cas potentiellement positifs. Les valeurs obtenues sont rapportées dans le Tableau 3.12. Pour l'échantillon P-Br-76, seul le segment précédent le segment suspect a été enlevé, car il était plus élevé que les autres et donc possiblement contaminé en GHB exogène.

Tableau 3.12 : Données pour le test de Grubbs pour les spécimens P-Br-76 et P-Br-71.

	N	Valeur max	Moy.	Écart-type	Valeur Grubbs (G)	G critique (99%)	G critique (99,5%)	G critique (99,9%)
P-Br-76	7	5,51	4,55	0,43	2,21	2,097	2,139	2,201
P-Br-71	26	59,37	15,43	9,1	4,83	2,884	3,001	3,230

D'après les résultats de ces tests, les segments suspects des deux spécimens de cheveux seraient réellement dus à un apport de GHB exogène, avec un niveau de confiance de 99,9 %. Pour vérifier si le test de Grubbs est une bonne approche pour détecter un segment contenant du GHB exogène, il faudrait l'appliquer à plusieurs spécimens de cheveux assurément positifs, par exemple prélevés lors d'une étude clinique. Ainsi, il serait possible de voir si le test réussit à détecter le segment positif dans tous les cas et avec quel niveau de confiance.

Le test de Grubbs a également été appliqué aux échantillons de cheveux de personnes n'ayant pas consommé de GHB pour voir si des faux positifs pouvaient être détectés en utilisant ce test. Selon les résultats, sur les 73 échantillons, trois spécimens sont déclarés avoir un segment positif si on utilise un niveau de confiance de 99,5 % alors que ce nombre diminue à un seul si le niveau de confiance est augmenté à 99,9 %. La possibilité de faux positifs est bien présente, mais elle est très faible lorsqu'un niveau de confiance très élevé est utilisé. Cependant, il faut tenir compte que lorsqu'il y a un soupçon d'avoir ingéré du GHB à une date précise, il y a un segment de cheveux en particulier associé à cette période de temps, qui dépend du taux de pousse des cheveux de la personne. Si le segment en question s'avère positif à partir du test de Grubbs, cela aura davantage de poids.

CHAPITRE IV

CONCLUSION

Au cours de cette étude, un nouveau test diagnostique pour la détection du GHB dans les cheveux humains a été expérimenté pour déterminer son potentiel dans d'éventuels cas où des crimes ont été commis sous l'influence du GHB. Pour ce faire, nous avons développé une méthode en chromatographie HILIC couplée à un spectromètre de masse en tandem pour analyser le GHB, son précurseur le GABA et son métabolite l'acide succinique (AS). Plusieurs échantillons de cheveux de personnes n'ayant pas consommé de GHB et quelques spécimens de cheveux potentiellement positifs en GHB exogène ont ensuite été analysés. Les ratios $[GHB] / [GABA]$ et $[GHB] / [AS]$ ont été calculés dans chacun des cas pour déterminer s'ils aidaient à améliorer la détection de GHB exogène.

Pour le développement de la méthode, nous avons d'abord vérifié la pertinence du lavage des cheveux. Les résultats du test ont montré qu'il était préférable de conserver les trois lavages (dichlorométhane, méthanol, eau). La digestion des cheveux a ensuite été optimisée. Étonnamment, il s'est avéré qu'après une hydrolyse de 7 jours à 110°C dans du NaOH 0,5 M, il n'y avait toujours pas de plateau atteint pour les trois molécules étudiées. Nous avons choisi d'arrêter la digestion à 24h pour diminuer le temps d'analyse. Cela signifie que les concentrations obtenues sont plus faibles que les concentrations réelles dans les cheveux. Les digestions sont ensuite diluées puis analysées en CL-SM/SM. Afin d'assurer la sélectivité de notre système chromatographique, nous avons vérifié que les principaux isomères de nos trois molécules d'intérêt soient bien séparés au niveau chromatographique, ce qui fut le cas.

Plusieurs paramètres de validation ont été testés avec la nouvelle méthode. Nous avons d'abord évalué la linéarité pour les trois molécules jusqu'à un niveau 100 fois plus élevé que le niveau endogène pour le GHB et jusqu'à 10 fois pour le GABA et l'AS, niveaux suffisants pour nos besoins analytiques. La linéarité est excellente pour les trois analytes. La répétabilité a également donné de bons résultats, car les coefficients de variation de 10 analyses subséquentes sont très faibles, soit autour de 5 %. La méthode est également reproductible, car les variations des MR pour le GHB, le GABA et l'AS, analysés au cours de chacune des séquences, sont en dessous de 15 %. Les LD et LQ ont ensuite été déterminées par la méthode de la répétabilité pour le GHB et pour l'AS, et par estimation pour le GABA qui avait une LD estimée de loin inférieure aux niveaux endogènes. La LD obtenue pour le GHB, soit 3,3 ng/mg, est entre 6 et 300 fois plus élevée que celles retrouvées dans la littérature, mais elle est assez faible pour permettre la détection et la quantification de tous les échantillons de cheveux analysés. Les LD du GABA et de l'AS, de 10,3 et 705 ng/mg respectivement, sont également assez faibles pour les besoins analytiques. Finalement, les tests d'effet matrice instrumental et de récupération ont donné de bons résultats pour les trois molécules. En effet, malgré des effets matrice absolus trop faibles ou trop élevés, les effets matrice absolus normalisés sont tous très près de 100%, ce qui indique que les standards internes compensent bien l'effet matrice instrumental. Pour ce qui est de la récupération normalisée, elle est près de 100 % pour les trois composés, avec des écarts-types très faibles de l'ordre de 2 %, ce qui est excellent.

Nous avons également vérifié l'impact de la quantité de cheveux utilisée pour l'hydrolyse sur les concentrations obtenues pour les 3 molécules. Il s'est avéré que la masse de cheveux avait une grande influence sur les résultats. En effet, pour une même matrice, plus la masse de cheveux digérés était grande, plus les concentrations obtenues étaient faibles. Les masses de cheveux qui ont donné les résultats les moins variables pour les trois répliqués sont les masses de 5 et 10 mg. La masse de 2,5 mg a quant à elle

donnée les résultats les plus variables, ce qui signifie que pour une masse de cheveux en deçà de 5 mg, il risque d'y avoir une imprécision sur le résultat. Étant donné des niveaux endogènes de GHB différents d'une matrice de cheveux à l'autre, chaque matrice constitue sa propre référence. Or, la masse de cheveux influence grandement la concentration obtenue. Il est donc très important que pour un même échantillon de cheveux, la même masse de cheveux soit utilisée pour l'analyse de chaque segment.

Les concentrations endogènes obtenues pour le GHB sont entre 4 et 63 ng/mg de cheveux, avec une valeur moyenne de 18 ng/mg, ce qui est beaucoup plus élevé que les concentrations mentionnées dans la littérature, probablement en lien avec notre méthode de digestion optimisée. Pour ce qui est du GABA, un seul article rapportait son analyse dans les cheveux, mais les concentrations obtenues étaient toutes en-dessous de leur limite de détection de 0,3 ng/mg. De notre côté, nous avons plutôt détecté de très grandes concentrations de cette molécule, entre 500 et 3000 ng/mg. À notre connaissance, c'était la première fois que l'AS était analysé dans les cheveux. Les concentrations obtenues sont très élevées, soient entre 2000 et 10 000 ng/mg.

L'application de cette méthode validée aux échantillons de cheveux exempts de GHB exogène nous a permis de vérifier si les deux ratios étaient plus constants que la concentration en GHB de différents segments d'une même mèche de cheveux. Les résultats obtenus montrent qu'il y a également une variabilité importante entre les ratios des différents segments. Il n'y a pas de corrélation directe entre les concentrations du GHB, du GABA et de l'AS. En effet, l'augmentation de GABA n'entraîne pas nécessairement une augmentation de GHB et une augmentation d'AS.

Malgré que les ratios ne soient pas nécessairement constants d'un segment à l'autre, nous avons tout de même vérifié ce qu'il advenait de ces ratios lorsque du GHB était consommé. Le premier cas positif analysé montre un léger gain du facteur

d'augmentation du ratio GHB / GABA pour le segment positif par rapport à la concentration en GHB (1,86 vs 1,75). Le ratio GHB / AS donne quant à lui un accroissement plus faible. Pour le 1^{er} cas suspecté positif, les facteurs d'augmentation du segment positif sont de 1,25, 1,40 et 1,30 pour la concentration en GHB, le ratio GHB / GABA et le ratio GHB / AS, respectivement. Dans ce cas-ci, les deux ratios sont légèrement meilleurs pour la détection du segment positif, malgré que l'augmentation soit quand même assez faible. Le dernier cas possiblement positif a pour sa part donné un accroissement beaucoup plus marqué du segment positif, que ce soit pour la concentration en GHB ou pour les ratios. Le GHB a augmenté d'un facteur 4,3, le ratio GHB / GABA d'un facteur 5,1 et le ratio GHB / AS d'un facteur 5,6. Cette fois, le bénéfice des ratios est plus marqué.

Ces trois cas semblent indiquer que les ratios améliorent la détection d'un segment positif en GHB exogène. Cependant, étant donné la faible quantité de cas positifs que nous avons pu analyser, il est difficile de tirer une conclusion exacte quant aux ratios évalués. À première vue, les ratios ont un potentiel pour faciliter la détection du GHB exogène dans les cheveux. Cependant, les cas analysés étaient particuliers. Le cas assurément positif était un cas où plusieurs doses de GHB ont été consommées, rendant l'interprétation des résultats plus difficile étant donné la quasi absence de segments représentant le niveau de base de GHB de l'individu. Le premier cas de possible consommation de GHB a quant à lui donné un résultat qui semblait être positif avec un facteur d'élévation du GHB de seulement 1,25 dans le segment suspect. Pour ce cas, il est donc difficile d'affirmer sans l'ombre d'un doute qu'il y a bel et bien eu prise de GHB.

L'approche statistique des valeurs aberrantes par le test de Grubbs a donné des résultats préliminaires intéressants pour la détection de segments contenant du GHB exogène. En effet, les deux cas potentiellement positifs se sont avérés significativement

différents selon ce test à un niveau de confiance de 99,9 %. Le test de Grubbs appliqué aux spécimens de cheveux ne contenant pas de GHB exogène a donné un résultat positif dans un cas sur 73 seulement, avec ce même niveau de confiance. Il semble donc y avoir un potentiel à utiliser ce test.

Pour les travaux futurs, le lavage des cheveux pourrait être optimisé davantage. En effet, pour ce projet, un seul spécimen de cheveux a été utilisé pour le test de lavage. Pour valider nos hypothèses, il faudrait vérifier l'impact des différents solvants de lavage sur les concentrations obtenues, pour différents types de cheveux. D'autres solvants pourraient également être testés.

Il faudrait également envisager une étude clinique au cours de laquelle trois doses connues de GHB (une faible, une moyenne et une plus élevée) seraient administrées à différents moments à une quinzaine d'individus sous surveillance médicale. Leurs cheveux seraient ensuite prélevés 1 mois plus tard ainsi que 2 mois plus tard pour vérifier le taux de croissance et confirmer les premières analyses. La méthode analytique développée au cours de cette étude serait appliquée à ces spécimens de cheveux pour voir si les ratios GHB sur son précurseur et GHB sur son métabolite améliorent bel et bien la détection d'une consommation de GHB pour tous les sujets de l'étude. Il serait également possible de vérifier l'impact de la dose administrée sur le ratio. De plus, cette étude clinique permettrait de vérifier l'efficacité du test de Grubbs à détecter un segment positif.

Une autre avenue serait d'analyser les ratios isotopiques du carbone ($^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$) du GHB dans les cheveux. Il est reconnu qu'il peut y avoir une différence dans ces ratios entre les molécules naturelles produites dans le corps humain et les mêmes molécules obtenues par synthèse chimique, étant donné leur source différente de carbones (Muccio et Jackson, 2009). D'ailleurs, cette approche a déjà été exploitée lors d'une

étude sur l'analyse du GHB dans l'urine et les résultats avaient montré une différence entre les ratios isotopiques du carbone du GHB synthétique (-32,1 à -42,1‰) et ceux du GHB endogène (-23,5 à -27 ‰) (Saudan *et al.*, 2007). Il pourrait donc être également possible de discriminer le GHB exogène de cette façon dans les cheveux.

Finalement, il existe peut-être d'autres biomarqueurs que les trois analysés au cours de cette étude qui pourraient nous donner des informations sur la consommation de GHB. Il faudrait pour cela tenter une analyse par protéomique, métabolomique et génomique pour vérifier la présence ou non de ces biomarqueurs d'exposition.

ANNEXE I

EXEMPLE DE CALCUL DE LA CONCENTRATION DE GHB DANS LES CHEVEUX (EN NG/MG) À PARTIR DE LA CONCENTRATION EN $\mu\text{G/L}$ DES DILUTIONS

LD estimée GHB = $0,825 \mu\text{g/L} = 0,825 \text{ ng/mL}$

Il s'agit de la concentration dans la dilution 1/40. Cela correspond donc à une concentration initiale 40 fois plus élevée dans le digestat:

$$[\text{GHB}] \text{ avant dilution} = 40 \times 0,825 \text{ ng/mL} = 33 \text{ ng/mL}$$

La LD estimée correspond à une concentration de 33 ng/mL dans le digestat de cheveux. Le digestat a un volume de $0,5 \text{ mL}$.

$$\text{qté GHB dans le digestat} = \frac{33 \text{ ng}}{2} = 16,5 \text{ ng}$$

Le digestat contient donc $16,5 \text{ ng}$. La masse de cheveux digérés dans la bombe est de 5 mg . Pour connaître la concentration en GHB dans les cheveux, il faut diviser la quantité de GHB (ng) par la masse de cheveux présente pour connaître la concentration en ng/mg.

$$[\text{GHB}] \text{ dans les cheveux} = 16,5 \text{ ng} / 5 \text{ mg} = 3,3 \text{ ng/mg}$$

Donc, la LD de $0,825 \mu\text{g/L}$ dans la dilution analysée correspond à une concentration initiale de $3,3 \text{ ng/mg}$ dans les cheveux.

Le procédé est le même pour calculer les concentrations de GABA et d'AS en ng/mg dans les cheveux, à l'exception qu'il faut multiplier par 400 plutôt que par 40 lors de la première étape du calcul, étant donné leur dilution plus grande.

ANNEXE II
TABLE DE GRUBBS

Number of Observations n	Values of Grubbs Statistic (G)					
	Confidence Level (%)					
	99.9	99.5	99	97.5	95	90
3	1.155	1.155	1.155	1.155	1.153	1.148
4	1.499	1.496	1.492	1.481	1.463	1.425
5	1.780	1.764	1.749	1.715	1.672	1.602
6	2.011	1.973	1.944	1.887	1.822	1.729
7	2.201	2.139	2.097	2.020	1.938	1.828
8	2.358	2.274	2.221	2.126	2.032	1.909
9	2.492	2.387	2.323	2.215	2.110	1.977
10	2.606	2.482	2.410	2.290	2.176	2.036
11	2.705	2.564	2.485	2.355	2.234	2.088
12	2.791	2.636	2.550	2.412	2.285	2.134
13	2.867	2.699	2.607	2.462	2.331	2.175
14	2.935	2.755	2.659	2.507	2.371	2.213
15	2.997	2.806	2.705	2.549	2.409	2.247
16	3.052	2.852	2.747	2.585	2.443	2.279
17	3.103	2.894	2.785	2.620	2.475	2.309
18	3.149	2.932	2.821	2.651	2.504	2.335
19	3.191	2.968	2.854	2.681	2.532	2.361
20	3.230	3.001	2.884	2.709	2.557	2.385
30	3.507	3.236	3.103	2.908	2.745	2.563
40	3.673	3.381	3.240	3.036	2.866	2.682
50	3.789	3.483	3.336	3.128	2.956	2.768
60	3.874	3.560	3.411	3.199	3.025	2.837
70	3.942	3.622	3.471	3.257	3.082	2.893
80	3.998	3.673	3.521	3.305	3.130	2.940
90	4.044	3.716	3.563	3.347	3.171	2.981
100	4.084	3.754	3.600	3.383	3.207	3.017

Source: ASTM E178-00, "Standard Practice for Dealing with Outlying Observations"

<https://www.slideshare.net/camiloaquintero/statistics-tables-grubbs-test>

BIBLIOGRAPHIE

Baciu, T., Borrull, F., Aguilar, C. et Calull, M. (2015). Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair. *Analytica chimica acta*, 856, 1-26.

Bertol, E., Argo, A., Procaccianti, P., Vaiano, F., Di Milia, M.G., Furlanetto, S. et Mari, F. (2012). Detection of gamma-hydroxybutyrate in hair: validation of GC-MS and LC-MS/MS methods and application to a real case. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 70, 518-522.

Bertol, E., Mari, F., Vaiano, F., Romano, G., Zaami, S., Baglìo, G. et Busardò, F.P. (2015). Determination of GHB in human hair by HPLC-MS/MS: Development and validation of a method and application to a study group and three possible single exposure cases. *Drug testing and analysis*, 7(5), 376-384.

Bienvenu, J.-F.o., Provencher, G., Bélanger, P., Bérubé, R., Dumas, P., Gagné, S.b., Gaudreau, E.r. et Fleury, N. (2017). Standardized Procedure for the Simultaneous Determination of the Matrix Effect, Recovery, Process Efficiency, and Internal Standard Association. *Analytical Chemistry*, 89(14), 7560-7568.

Busardò, F.P., Kyriakou, C., Marchei, E., Pacifici, R., Pedersen, D.S. et Pichini, S. (2017). Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for determination of GHB, precursors and metabolites in different specimens: Application to clinical and forensic cases. *J Pharm Biomed Anal*, 137, 123-131. doi: 10.1016/j.jpba.2017.01.022

Busardò, F.P., Vaiano, F., Mannocchi, G., Bertol, E., Zaami, S. et Marinelli, E. (2016). Twelve months monitoring of hair GHB decay following a single dose administration in a case of facilitated sexual assault. *Drug testing and analysis*, 9(6), 953-956.

Busardò, F.P. et W. Jones, A. (2015). GHB pharmacology and toxicology: acute intoxication, concentrations in blood and urine in forensic cases and treatment of the withdrawal syndrome. *Current neuropharmacology*, 13(1), 47-70.

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. (2015). Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie (Publication no DR-12-VMC). Repéré à http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/accréditation/pala/DR12VMC_protocole_val_chimie.pdf

Chirita, R.-I. (2009). *Développement de nouvelles méthodes séparatives compatibles avec une détection par spectrométrie de masse et par électrochimie pour l'analyse des traces de catécholamines et molécules apparentées*. Université d'Orléans.

Cirimele, V., Baumgartner, M., Vallet, E. et Duez, M. (2010). Interprétation des concentrations de GHB mesurées dans les cheveux. *Annales de Toxicologie Analytique*, 22(4), 161-164.

Cooper, G.A.A. (2011). Hair testing is taking root. *Annals of clinical biochemistry*, 48(6), 516-530.

Cooper, G.A.A., Kronstrand, R. et Kintz, P. (2012). Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Science International*, 218(1), 20-24.

Costa, N. (2015) *Cycle et origine de la perte des cheveux*. Récupéré le 7 juillet 2017 à <http://www.medecine-esthetique-costa.com/micro-greffe/cycle-et-origine-de-la-perte-des-cheveux/>

Ferrara, S.D., Frison, G., Tedeschi, L. et LeBeau, M. (2001). Gamma-hydroxybutyrate (GHB) and related products. *Drug-Facilitated Sexual Assault—A Forensic Handbook*, Academic Press, London, 107-126.

Goullé, J.P., Chèze, M. et Pépin, G. (2003). Determination of Endogenous Levels of GHB in Human Hair. Are there Possibilities for the Identification of GHB Administration through Hair Analysis in Cases of Drug-Facilitated Sexual Assault? *Journal of Analytical Toxicology*, 27(8), 574-580. doi: 10.1093/jat/27.8.574 Récupéré de <http://dx.doi.org/10.1093/jat/27.8.574>

Hanisch, S., Stachel, N. et Skopp, G. (2016). A potential new metabolite of gamma-hydroxybutyrate: sulfonated gamma-hydroxybutyric acid. *International journal of legal medicine*, 130(2), 411-414.

Hari, Y., König, S., Schröck, A., Coro, P., Auwärter, V., Thierauf, A. et Weinmann, W. (2013). LC-MS/MS of GHB in head hair and beard. *Toxichem Krimtech*, 80, 224-227.

Harkey, M.R. (1993). Anatomy and physiology of hair. *Forensic Science International*, 63(1-3), 9-18.

Henderson, G. (1993). Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Science International*, 63(1-3), 19-29.

Horvath, A.L. (2009). Solubility of structurally complicated materials: 3. Hair. *The Scientific World Journal*, 9, 255-271.

Jagerdeo, E., Montgomery, M.A. et LeBeau, M.A. (2014). An improved method for the analysis of GHB in human hair by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of analytical toxicology*, 39(2), 83-88.

Kintz, P., Cirimele, V., Jamey, C. et Ludes, B. (2003). Testing for GHB in hair by GC/MS/MS after a single exposure. Application to document sexual assault. *Journal of Forensic Science*, 48(1), 1-6.

LeBeau, M.A., Montgomery, M.A., Miller, M.L. et Burmeister, S.G. (2000). Analysis of biofluids for gamma-hydroxybutyrate (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL) by headspace GC-FID and GC-MS. *Journal of analytical toxicology*, 24(6), 421-428.

Lefebvre, L. (1997). Après l'Ecstasy, le "Liquid Ecstasy". *Bulletin d'information toxicologique*,

Madea, B. et Mußhoff, F. (2009). Knock-out drugs: their prevalence, modes of action, and means of detection. *Deutsches Ärzteblatt International*, 106(20), 341.

Maitre, M., Andriamampandry, C., Kemmel, V., Schmidt, C., Hodé, Y., Hechler, V. et Gobaille, S. (2000). Gamma-hydroxybutyric acid as a signaling molecule in brain. *Alcohol*, 20(3), 277-283.

Maitre, M., Humbert, J.-P., Kemmel, V., Aunis, D. et Andriamampandry, C. (2005). Mécanismes d'action d'un médicament détourné : le γ -hydroxybutyrate. *Med Sci (Paris)*, 21(3), 284-289. Récupéré de <https://doi.org/10.1051/medsci/2005213284>

Mason, P.E. et Kerns, W.P. (2002). Gamma hydroxybutyric acid (GHB) intoxication. *Academic Emergency Medicine*, 9(7), 730-739.

Muccio, Z. et Jackson, G.P. (2009). Isotope ratio mass spectrometry. *Analyst*, 134(2), 213-222.

Németh, Z., Kun, B. et Demetrovics, Z. (2010). The involvement of gamma-hydroxybutyrate in reported sexual assaults: a systematic review. *Journal of Psychopharmacology*, 24(9), 1281-1287.

Petersen, I.N., Tortzen, C., Kristensen, J.L., Pedersen, D.S. et Breindahl, T. (2013). Identification of a new metabolite of GHB: gamma-hydroxybutyric acid glucuronide. *Journal of analytical toxicology*, 37(5), 291-297.

Pragst, F. (2005). Pitfalls in hair analysis. *TIAFT Bull*, 35, 10-17.

Pragst, F. et Balikova, M.A. (2006). State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clinica Chimica Acta*, 370(1), 17-49.

Quintela, O., Lendoiro, E., Cruz, A., de Castro, A., Quevedo, A., Jurado, C. et López-Rivadulla, M. (2010). Hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS) determination of cocaine and its metabolites benzoylecgonine, ecgonine methyl ester, and cocaethylene in hair samples. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(5), 1703-1712.

Rossi, R., Lancia, M., Gambelunghe, C., Oliva, A. et Fucci, N. (2009). Identification of GHB and morphine in hair in a case of drug-facilitated sexual assault. *Forensic science international*, 186(1), e9-e11.

Saudan, C., Augsburger, M., Mangin, P. et Saugy, M. (2007). Carbon isotopic ratio analysis by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry for the detection of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) administration to humans. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(24), 3956-3962.

Shi, Y., Cui, X., Shen, M. et Xiang, P. (2016). Quantitative analysis of the endogenous GHB level in the hair of the Chinese population using GC/MS/MS. *Journal of forensic and legal medicine*, 39, 10-15.

Skoog, A., Donald, M., West, F. et Holler, J. (1997). *Chimie analytique*. (Claudine Buess-Herman, J. D.-W., Freddy Dumont, Trad. 7e éd.). Bruxelles.

Stout, P.A., Simons, K.D. et Kerrigan, S. (2010). Quantitative Analysis of Gamma-Hydroxybutyrate at Endogenous Concentrations in Hair using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of forensic sciences*, 55(2), 531-537.

Tang, Y.-B., Sun, F., Teng, L., Li, W.-B., An, S.-M., Zhang, C., Yang, X.-J., Lv, H.-Y., Ding, X.-P. et Zhu, L. (2014). Simultaneous determination of the repertoire of classical neurotransmitters released from embryonal carcinoma stem cells using online microdialysis coupled with hydrophilic interaction chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 849, 70-79.

Tracqui, A. (1996). Le poil: structure et physiologie. *Revue Française des Laboratoires*, 1996(282), 19-23.

United Nations Office on Drugs and Crime. (2011). Guidelines for the forensic analysis of drugs facilitating sexual assault and other criminal acts. Repéré à https://www.unodc.org/documents/scientific/forensic_analys_of_drugs_facilitating_sexual_assault_and_other_criminal_acts.pdf

Vaiano, F., Serpelloni, G., Furlanetto, S., Palumbo, D., Mari, F., Fioravanti, A. et Bertol, E. (2016). Determination of endogenous concentration of γ -hydroxybutyric acid (GHB) in hair through an ad hoc GC–MS analysis: A study on a wide population and influence of gender and age. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 118, 161-166.

Voet, D. et Voet, J.G. (2016). *Biochimie*. (Domenjoud, L., Trad.) : De Boeck.

Vogliardi, S., Tucci, M., Stocchero, G., Ferrara, S.D. et Favretto, D. (2015). Sample preparation methods for determination of drugs of abuse in hair samples: a review. *Analytica chimica acta*, 857, 1-27.

Wang, X., Linnet, K. et Johansen, S.S. (2016). Development of a UPLC–MS/MS method for determining γ -hydroxybutyric acid (GHB) and GHB glucuronide concentrations in hair and application to forensic cases. *Forensic Toxicology*, 34(1), 51-60.

Watson, J.T. et Sparkman, O.D. (2007). *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation*. : John Wiley & Sons.

White, R. (2017). Drugs in hair. Part I. Metabolisms of major drug classes. *Forensic science review*, 29(1), 23.

Xiang, P., Shen, M. et Drummer, O.H. (2015). Drug concentrations in hair and their relevance in drug facilitated crimes. *Journal of forensic and legal medicine*, 36, 126-135.

Yaldiz, F., Daglioglu, N., Hilal, A., Keten, A. et Gülmen, M.K. (2013). Determination of ethyl glucuronide in human hair by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of forensic and legal medicine*, 20(7), 799-802.