

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE MÉTHODE D'ANALYSE DES MÉTAUX
TOXIQUES ET ESSENTIELS DANS LE SANG PRÉLEVÉ SUR SUPPORTS ABSORPTIFS

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN CHIMIE EXTENSIONNÉE DE
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PAR
ANTHONY BRETON

DÉCEMBRE 2023

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon codirecteur de recherche, Ciprian Mihai Cirtiu de m'avoir accompagné au cours des deux dernières années, de m'avoir permis de travailler dans les laboratoires du Centre de toxicologie du Québec et de me joindre à une équipe formidable au sein de l'Institut national de santé publique. Grâce à toi, durant ces deux années, j'ai su peaufiner ma rigueur et ma curiosité scientifique, développer mon esprit critique et j'ai eu la chance de sortir de ma zone de confort à maintes reprises, ce qui m'a permis de devenir un meilleur scientifique, chercheur et parfois même vulgarisateur. Merci pour ces nombreuses opportunités de faire valoir le fruit de mes recherches, que ce soit grâce à nos collaborations à l'international ou lors d'événements, de congrès et de symposium à la grandeur du Québec et du Canada. Sans toi, rien de tout ça n'aurait pu être possible et j'en suis reconnaissant mille fois! Merci également à Normand Fleury de m'avoir permis de rejoindre l'équipe du Centre de toxicologie du Québec et d'utiliser les ressources ainsi que tout le matériel et l'instrumentation à la fine pointe de la technologie qui m'ont permis de mener à bien mes recherches.

J'aimerais également remercier André Lajeunesse de m'avoir permis de poursuivre mes études à la maîtrise et pour les démarches auprès de l'Institut national de santé publique afin que je puisse faire partie de cette magnifique collaboration qui ne cesse de me rapporter professionnellement à chaque jour. Merci également à mon actuel directeur de recherche, Professeur Cyril Muehlethaler d'avoir repris le flambeau en cours de route et de m'avoir permis de poursuivre ce merveilleux projet. Merci pour ton support, tes conseils, tes pistes de réflexion et ton expertise, sans oublier le traitement des données statistiques.

Je souhaite également remercier tous mes collègues du Centre de toxicologie du Québec pour leur support et leurs précieux conseils. Merci de m'avoir fait une place dans votre laboratoire malgré tout l'achalandage des séquences de routine. Merci à tous ceux et celles qui ont participé aux diverses collectes de sang et qui nous ont permis de pousser nos conclusions encore plus loin sur l'usage des VAMS. Un merci tout spécial à Rose Gagnon-Marois et Émilie Cloutier d'avoir effectué les prélèvements sanguins sur les participants. Merci également à Claudine Roussy pour ton précieux temps et pour la grande aide fournie avec les instruments et à Pierre Dumas d'avoir pris sous ta responsabilité le volet portant sur l'analyse des ratios isotopiques de plomb. Votre expertise en tant que scientifiques nous a permis d'apporter le projet à un autre niveau. Merci pour vos conseils et votre support.

Merci à Rimmy Shah, James Rudge et Stuart Kushon de Trajan Scientific and Medical pour cette magnifique collaboration et de nous avoir permis de réaliser mille et un tests de toutes sortes sur les dispositifs Mitra-VAMS. Sans tout ce matériel fourni, la réalisation de ce projet n'aurait pas pu être possible. Merci de nous permettre de faire rayonner ce projet au maximum de ses capacités à travers diverses plateformes.

Et finalement, je ne peux conclure mes remerciements sans dire le plus grand des mercis à mes parents, sans qui je n'aurais jamais eu la chance de me rendre aussi loin dans mon parcours académique. Merci pour le support spécialement au cours des 5 dernières années, malgré la distance. Merci de m'accueillir à bras ouverts, de me supporter et de me permettre de livrer le meilleur de moi-même. Merci de m'avoir inculqué des valeurs inestimables qui me permettent de foncer, de travailler toujours plus fort à chaque jour et surtout de persévérer.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire fait l'objet d'un travail réalisé de septembre 2021 à août 2023 dans le cadre de la maîtrise en chimie. Il a été réalisé tout d'abord sous la supervision du professeur André Lajeunesse, puis du professeur Cyril Muehlethaler en collaboration avec le professeur associé à l'UQTR Ciprian Mihai Cirtiu du Centre de Toxicologie du Québec. Ce mémoire présente les articles intitulés « Method development for the quantification of lead levels in whole blood sampled on Mitra® with VAMS® tips by inductively coupled plasma-MS/MS » qui a été publié dans le journal « Bioanalysis » le 9 mars 2023 et « Validation of Mitra VAMS as a blood collection technique for trace element analysis using ICP-MS/MS » présentement en processus de révision à des fins de publication dans le journal « Bioanalysis ».

Cette maîtrise porte sur le développement et la validation de méthodes d'analyses d'éléments toxiques et essentiels dans le sang prélevé à l'aide des micro-supports absorbants Mitra® VAMS®. L'idée derrière le projet est née d'une collaboration entre le professeur Ciprian Mihai Cirtiu, responsable de la division métaux au Centre de toxicologie du Québec, et la compagnie Neoteryx/Trajan Scientific and Medical. Neoteryx est une marque de produit destinée aux micro-prélèvements, fournissant des dispositifs de collecte de spécimens pouvant être utilisés par n'importe qui, n'importe quand et n'importe où dû à leur simplicité d'utilisation. Leurs produits répondent aux besoins des professionnels de recherche et de la santé utilisant le micro-échantillonnage pour les études de recherches sur le terrain, la télésanté et la médecine personnalisée.

D'ailleurs, les besoins cliniques de dosage sanguin de plusieurs éléments toxiques (par exemple, le plomb ou le cadmium) et essentiels (par exemple, le cuivre ou le sélénium) sont déjà bien établis, et le mode de prélèvement traditionnel pour ces spécimens sanguins demeure, à l'heure actuelle, la ponction veineuse.

Or, une alternative intéressante serait d'avoir recours à un dispositif de type DBS (*dried blood spot*) pour les prélèvements destinés au dosage des éléments toxiques et essentiels, car en plus d'être moins invasifs au niveau du prélèvement lui-même (enjeu de quantité et/ou difficulté de ponction notamment chez la clientèle pédiatrique et chez les aînés), cette alternative présente aussi des avantages en lien avec l'expédition et l'entreposage des spécimens recueillis. La principale limitation posée par les DBS est la contamination en métaux du papier buvard utilisé dans leur fabrication.

Un nouveau support absorbant, le dispositif Mitra[®] VAMS[®] (*Volumetric Absorptive Microsampling*) de la compagnie Neoteryx fait partie des options modernes de prélèvement sanguin. Outre les avantages liés au faible volume de prélèvement, il permet un prélèvement précis et centré sur le patient, tout en éliminant certains défis rencontrés avec les DBS. En plus d'être disponible en différents formats (10, 20 ou 30 μL), il serait adaptable à l'automatisation en laboratoire. Toutefois, le prix de vente reste pour l'instant un enjeu majeur dans leur implantation dans les activités de routine, mais cela pourrait bien changer si de nouvelles applications sont développées, par exemple l'analyse de métaux (éléments toxiques et essentiels) dans le sang ou autres matrices biologiques comme l'urine ou encore la salive.

Le développement de méthodes d'analyse d'éléments toxiques et essentiels permet au Centre de toxicologie du Québec de se munir de méthodes d'analyses alternatives répondant aux besoins des réseaux hospitaliers québécois et canadiens en matière d'analyses pédiatriques et néonatales qui peuvent parfois être problématiques en raison du caractère invasif de la ponction veineuse. Ce projet de maîtrise permet également à la compagnie Neoteryx de proposer une gamme plus large d'applicabilités pour son dispositif Mitra® VAMS.

Les professeurs Ciprian Mihai Cirtiu et Cyril Muehlethaler ont fourni leur expertise sur l'analyse des métaux dans diverses matrices biologiques, en chimie analytique et en traitement de données statistiques pour superviser le présent projet de maîtrise. Ce projet réalisé par moi-même avait donc comme objectif général de procéder au développement et à la validation d'une méthode multi-analytes dans le sang prélevé à l'aide des supports absorbants Mitra® VAMS. Les résultats présentés dans ce mémoire constituent des avancements déterminants vers l'implantation des dispositifs Mitra® VAMS dans le réseau hospitalier du Québec comme méthode alternative à la ponction veineuse, tout spécialement dans le dépistage pédiatrique et néonatal d'éléments toxiques et essentiels dans le sang.

Au cours du projet, une collaboration avec l'organisme mondial UNICEF est venue s'ajouter permettant de se concentrer sur un aspect spécifique du développement analytique. En effet, selon l'étude MICS (Multiple Indicator Cluster Survey) réalisée en 2018, plusieurs enfants en Géorgie sont fortement exposés à d'importantes sources de plomb. Vers la fin de l'année 2021, UNICEF a donc procédé à un appel de candidatures pour collaborer avec différentes équipes scientifiques à travers le monde dans le but de mettre en place un système de biosurveillance permettant

d'identifier, de surveiller et de diminuer les sources potentielles d'expositions au plomb chez les enfants en Géorgie. Le principe du microéchantillonnage à l'aide des Mitra® VAMS semblait pour eux une méthode révolutionnaire apportant plusieurs avantages et qui permettrait de bâtir un système de biosurveillance à grande échelle adapté à l'échantillonnage auprès des enfants. Notre apport lors de cette collaboration, qui implique également deux équipes de la Norvège (The Arctic University of Norway et Norwegian Institute for Air Research), a donc été de développer, de valider et d'évaluer la performance d'une méthode d'analyse du plomb sanguin à l'aide des dispositifs Mitra® VAMS. C'est d'ailleurs sur ce sujet que porte le premier article présenté dans ce mémoire : « Method development for the quantification of lead in whole blood sampled on Mitra® with VAMS® tips by inductively coupled plasma-MS/MS » publié dans le journal Bioanalysis en mars 2023.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
AVANT-PROPOS.....	iv
RÉSUMÉ.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES ACRONYMES.....	xiii
LISTE DES SYMBOLES.....	xiv
CHAPITRE 1.....	1
INTRODUCTION.....	1
1.1 Importance de l'analyse de spécimens sanguins.....	1
1.1.1 Contexte général.....	1
1.1.2 Rôles des éléments trace dans le sang.....	1
1.2 Méthodes de prélèvement.....	4
1.2.1 La ponction veineuse.....	4
1.2.2 Les papiers buvards DBS (<i>dried blood spot</i>).....	5
1.2.3 Les VAMS (<i>volumetric absorptive microsampling</i>).....	8
1.2.4 Autres approches de microprélèvements [39].....	12
1.3 Importance du projet de recherche.....	13
1.4 L'ICP-MS/MS.....	17
CHAPITRE 2.....	20
DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE MÉTHODE D'ANALYSE PAR ICP-MS/MS DU PLOMB SANGUIN PRÉLEVÉ SUR SUPPORT ABSORPTIFS MITRA® VAMS®.....	20
2.1 Contribution des auteurs.....	20
2.2 Résumé de l'article.....	21
2.3 Article scientifique.....	22
2.3.1 Introduction.....	24
2.3.2 Materials and Methods.....	27
2.3.2.1 VAMS, chemicals and stock solutions.....	27
2.3.2.2 Sample collection.....	28
2.3.2.3 Sample extraction and analytical method.....	29
2.3.2.4 Analytical validation.....	32
2.3.3 Results.....	33
2.3.3.1 Performance evaluation.....	36

2.3.3.2	Addressing contamination concerns.....	37
2.3.4	Discussion.....	38
2.3.5	Conclusion	43
CHAPITRE 3.....		46
VALIDATION DU DISPOSITIF MITRA VAMS COMME TECHNIQUE DE PRÉLÈVEMENT SANGUIN POUR L'ANALYSE D'ÉLÉMENTS TRACE PAR ICP-MS/MS		46
3.1	Contribution des auteurs.....	46
3.2	Résumé de l'article	47
3.3	Article scientifique.....	48
Validation of Mitra VAMS as a blood collection technique for trace element analysis using ICP-MS/MS.....		48
3.3.1	Introduction.....	50
3.3.2	Materials and Methods.....	53
3.3.2.1	Chemicals, Stock Solutions and Mitra® VAMS.....	53
3.3.2.2	Reduction of VAMS Contamination.....	54
3.3.2.3	Biological Sample Collection.....	55
3.3.2.4	Analytical Method.....	56
3.3.2.5	Analytical Validation.....	57
3.3.2.6	Study Design for Performance Evaluation and Statistical Tests.....	58
3.3.3	Results.....	60
3.3.3.1	Reduction of VAMS Contamination.....	60
3.3.3.2	Validation of analytical parameters.....	61
3.3.3.3	Performance evaluation	65
3.3.3.4	Statistical tests	66
3.3.4	Discussion.....	69
3.3.5	Conclusion	76
CHAPITRE 4.....		80
DISCUSSION.....		80
4.1	Retour sur les problématiques	80
4.2	Limitations.....	83
4.3	Perspectives	86
4.4	Conclusion	89
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		90

RÉSUMÉ

De nos jours, l'évaluation des taux de métaux toxiques (ex. plomb, cadmium, mercure, uranium, etc.) et essentiels (ex. cuivre, zinc, sélénium, etc.) se fait majoritairement à l'aide de prélèvements sanguins. La méthode de prélèvement de ces spécimens demeure, à l'heure actuelle, la ponction veineuse. Cette méthode présente cependant plusieurs inconvénients, spécialement chez la clientèle pédiatrique (nouveau-nés, enfants prématurés ou enfants en bas âge), en raison notamment de son volume important de prélèvement (5-10 mL) et de son caractère invasif qui peut, pour certains, être inconfortable et douloureux. Également, le prélèvement par ponction veineuse nécessite la formation de personnel qualifié, l'ajout d'anticoagulant dans les tubes de prélèvement, la réfrigération ou congélation des spécimens et parfois même la séparation des différents constituants sanguins une fois le prélèvement sanguin acheminé au laboratoire (plasma, sérum, globules rouges, etc.). Une alternative possible au prélèvement par ponction veineuse est, depuis 1963, l'utilisation de papiers buvards (*Dried Blood Spot* – DBS). Cette approche permet de surmonter la majorité des problèmes reliés à la ponction veineuse, car elle permet un prélèvement réduit de sang (50-100 µL) effectué au bout d'un doigt ou du talon chez les nouveau-nés, elle ne nécessite pas de réfrigération ni de congélation des spécimens et elle évite plusieurs étapes analytiques comme l'ajout d'anticoagulant ou la séparation des constituants sanguins. Or, cette méthode de prélèvement comporte également son lot d'inconvénients. En effet, le volume de prélèvement est affecté par le niveau d'hématocrite (pourcentage de globules rouges dans le sang) des patients (i.e. dispersion du sang en fonction de sa viscosité). Les prélèvements sont alors très difficilement reproductibles, on observe des diffusions inégales des composés sur la carte de prélèvement, et cette dernière peut être contaminée en métaux, ce qui rend difficile, voire impossible la décontamination, donc son utilisation. Plus récemment, en 2014, Spooner et Denniff ont fait la première démonstration d'un dérivé de la méthode de prélèvement sur papier buvard appelé VAMS (*volumetric absorptive microsampling*). Cette approche apporte tous les avantages des papiers buvards en plus de contrer les problèmes reliés aux prélèvements. Cette nouvelle approche permet le prélèvement de microvolumes précis (10, 20 ou 30 µL), à l'aide d'un embout polymérique absorbant. Une méthode d'analyse par ICP-MS/MS des métaux toxiques et essentiels dans le sang prélevé à l'aide des supports absorbants Mitra® VAMS et une pour l'analyse spécifique du plomb sanguin ont été développées et validées selon les normes ISO 17025. Les paramètres de validation évalués pour chaque élément sont : limites de détection et de quantification, répétabilité, robustesse, effet de matrice et domaine de linéarité. La stabilité des composés a également été évaluée dans les spécimens sanguins prélevés sur VAMS et entreposés à température pièce jusqu'à un an et à 37°C jusqu'à 4 mois suivant le prélèvement. Une fois les méthodes développées et validées, les performances de celles-ci ont été évaluées en les comparant à des méthodes d'analyses reconnues et utilisées de manière routinière au Centre de toxicologie du Québec. De tous les éléments testés, le cadmium, le cobalt, le cuivre, le mercure, le plomb, le sélénium, l'uranium et le zinc sont ceux qui présentent les meilleurs résultats lors de la validation et l'évaluation de la performance de la méthode. En contrepartie, pour certains des éléments testés (aluminium, arsenic, chrome, manganèse et molybdène) les embouts polymériques absorbants présentaient des niveaux de contamination beaucoup trop élevés pour être en mesure de quantifier avec précision et exactitude des spécimens sanguins réels et des matériaux de référence. En conclusion, les Mitra® VAMS possèdent des avantages intéressants pour l'analyse de plusieurs éléments dans le sang et représentent une alternative envisageable au prélèvement par ponction veineuse, spécialement pour le dépistage en bas âge.

Mots-clés : VAMS, ICP-MS/MS, Éléments trace, Sang

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Exemples de fonctions biologiques essentielles des éléments trace dans l'organisme.....	3
1.2 Exemple de prélèvement (poinçons) sur DBS.....	6
1.3 Nombre de publications avec le mot-clé <i>DBS</i> sur SciFinder ⁿ entre 1963 et aujourd'hui (1 ^{er} juin 2023).....	7
1.3 Nombre de publications avec le mot-clé <i>VAMS microsampling</i> sur SciFinder ⁿ entre 2009 et aujourd'hui (1 ^{er} juin 2023).....	10
1.5 Trousse de prélèvement VAMS avec tout le matériel nécessaire au prélèvement.....	11
1.6 Schéma d'un instrument ICP-MS/MS.....	19
2.1 Measured blood Pb concentrations of 3 replicates of each point of the linearity range compared to their expected Pb concentration ranging from 0 to 10 $\mu\text{mol/L}$ (Vertical axis offset by 1 $\mu\text{mol/L}$ on Agilent 8900 for visual separation of curves).....	35
2.2 Recovery of Pb (%) at a concentration corresponding to point #4 of the calibration curve (0.25 $\mu\text{mol/L}$) over 6 months.....	36
2.3 Spearman's rank correlation coefficient by concentration of the two compared methods used for the performance evaluation.....	37
2.4 Measured BLL concentrations ($\mu\text{mol/L}$) of all patients before (A) and after (B) hand washing.....	38
3.1 Variation in the recovery (n=3) of each element in time in whole blood sampled on VAMS and stored at room temperature.....	64
3.2 Variation in the recovery (n=3) of each element in time in whole blood sampled on VAMS and stored at 37°C.....	64
3.3 Difference of the results (n=50) obtained by comparing the new method to the reference method for each element.....	66
3.4 Spearman Correlation Coefficient for all the elements with > 50% detection rate.....	68

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1 Instrument settings and acquisition parameters for ICP-MS/MS 8800 and 8900.....	31
2.2 Results of all validated analytical parameters on Agilent 8800 and 8900 systems.....	34
3.1 Spiked concentration in blank whole blood for all the targeted elements.	54
3.2 Tune mode and mass shift from Q1 to Q2 for every targeted element....	57
3.3 Quantified values of unwashed and washed VAMS compared to the reported normal concentration and toxic thresholds in whole blood for every element.....	61
3.4 Estimated LoD and LoQ of all targeted elements (n=10).....	63
3.5 Evaluated repeatability (%) for every element for the low and the high concentrated QC material (n=10).....	63
3.6 Results of robustness test (%) for all elements after a modification in sample preparation of 4 different analytical parameters (n=8).....	63
3.7 Linearity range (n=3) and matrix effect (n=6) results for all targeted elements.....	64
3.8 Spearman's coefficient, <i>p</i> values and T-stat of all elements detected in > 50% of the samples analyzed.....	67
3.9 Average bias in concentration and relative percentage for elements with matching pairs > 50%.....	69
3.10 Operating parameters of the Agilent 8900 ICP-MS/MS instrument.....	79
4.1 Estimation des coûts pour une séquence de 75 échantillons entre les deux méthodes de prélèvement.....	85

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES ACRONYMES

BLL	Plombémie sanguine (<i>Blood lead level</i>)
C1-C7	Point de calibration
CTQ	Centre de toxicologie du Québec
DBS	Méthode de prélèvement sur papiers buvards (<i>Dried Blood Spot</i>)
ICP-MS-MS	Spectrométrie de masse en tandem à plasma à couplage inductif (<i>Inductively coupled plasma tandem mass spectrometry</i>)
INSPQ	Institut national de santé publique
IS	Standard interne (<i>Internal standard</i>)
ISO	Organisme international de standardisation
LoD	Limite de détection (<i>Limit of detection</i>)
LoQ	Limite de quantification (<i>Limit of quantification</i>)
N.R.	Non rapportée
PFAS	Composés perfluorés et polyfluoroalkylés (<i>Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances</i>)
QC	Contrôle qualité (<i>Quality control</i>)
QMEQAS	Programme externe de contrôle qualité du Québec (<i>Quebec Multielement External Quality Assessment Scheme</i>)
Q1/Q2	Quadripôle 1 et 2
RSD	Coefficient de variation (<i>Relative standard deviation</i>)
SD	Écart-type (<i>Standard deviation</i>)
UQTR	Université du Québec à Trois-Rivières
VAMS	Embouts absorbants polymériques volumétriques (<i>Volumetric absorptive microsampling</i>)
WHO	Organisation mondiale de la santé (<i>World Health Organization</i>)

LISTE DES SYMBOLES

Al	Aluminium
Ar	Argon
As	Arsenic
°C	Degré Celsius
Ca	Calcium
Cd	Cadmium
Cl	Chlore
Co	Cobalt
Cr	Chrome
Cu	Cuivre
Ge	Germanium
h	Heure
H ₂	Dihydrogène
He	Hélium
Hg	Mercure
HNO ₃	Acide nitrique
K	Kelvin
Mg	Magnésium
min	Minute
mL	Millilitre
Mn	Manganèse
Mo	Molybdène
ms	Milliseconde
n	Utilisé pour désigner un nombre de données
NH ₃	Ammoniaque
nmol/L	Nanomole par litre
O	Oxygène
O ₂	Dioxygène
Pb	Plomb

R	Coefficient de corrélation
R ²	Coefficient de détermination
Re	Rhénium
Rh	Rhodium
rps	Rotation par seconde
s	Seconde
Se	Sélénium
Tb	Terbium
U	Uranium
V	Volts
W	Watts
Zn	Zinc
% v/v	Pourcentage volumique
<i>p</i>	Probabilité
µg/L	Microgramme par litre
µL	Microlitre
µmol	Micromole
µmol/L	Micromole par litre

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Importance de l'analyse de spécimens sanguins

1.1.1 Contexte général

L'analyse de prélèvements sanguins est un outil clinique fréquemment utilisé par les médecins pour évaluer la qualité de fonctionnement de certains organes et aussi pour détecter des anomalies [1]. Que ce soit pour émettre un diagnostic ou évaluer les effets d'un traitement à court, moyen ou long terme, l'analyse sanguine demeure cruciale [1]. Des centaines de tests hématologiques ont été développés au fil des ans pour l'évaluation d'une panoplie de propriétés physiques et chimiques du sang [2]. D'ailleurs, un individu possède de 5 à 7 litres de sang dans son corps, ce qui constitue environ 8% de son poids total [3]. Il permet également le transport dans l'ensemble de l'organisme de molécules essentielles à la survie que ce soit l'oxygène, les nutriments ou encore les hormones. Le sang est composé de plasma, d'érythrocytes (globules rouges), de leucocytes (globules blancs) et de plaquettes. Chacun de ces constituants est essentiel et peut être analysé à l'aide de prélèvements sanguins [3].

1.1.2 Rôles des éléments trace dans le sang

De manière générale, les éléments que l'on retrouve dans le corps peuvent être divisés en trois catégories : les éléments majeurs (~ 96%), les éléments semi-majeurs (~ 3-4%) et les éléments trace (~ 0,02%) [4]. Bien que ces derniers ne constituent qu'une infime partie de notre poids total, leur effet n'est pas à négliger. D'ailleurs, ces éléments peuvent être

séparés en deux catégories distinctes, soient les éléments toxiques (plomb, cadmium, mercure, etc.) et les éléments essentiels (cuivre, zinc, sélénium, etc.). Il est important de pouvoir quantifier les niveaux de ces éléments en raison de leurs rôles importants dans l'organisme.

Les éléments essentiels comme le cobalt, le chrome, le cuivre, le manganèse, le molybdène, le sélénium et le zinc ont des rôles très importants, car ils sont des centres actifs enzymatiques et des substances bioactives (voir Fig 1.1) [4]. D'ailleurs, ces éléments étaient à l'origine perçus comme des nutriments au même titre que les vitamines [4]. Ils contribuent également à plusieurs fonctions biologiques au niveau des systèmes immunitaire et reproducteur, au niveau des métabolismes lipidiques et protéiques et possèdent également des propriétés antioxydantes. Ainsi, une carence d'un ou plusieurs de ces éléments peut avoir des effets néfastes qui se traduisent généralement en une réduction de l'activité enzymatique et des différentes fonctions biologiques énumérées précédemment. Une insuffisance peut survenir pour plusieurs raisons, par exemple, la maladie de Menkes qui affecte le métabolisme du cuivre [5], une grossesse ou simplement une alimentation faible en nutriments et en éléments trace [4]. À l'inverse, une consommation ou exposition excessive à ces éléments peut occasionner de la fièvre (zinc), un empoisonnement, la maladie de Parkinson (manganèse) ou même le cancer des poumons (chrome) [4]. Il est donc crucial d'être en mesure de quantifier rapidement et efficacement les niveaux de ces éléments dans l'organisme, car un déséquilibre de leur concentration peut avoir des effets importants sur les fonctions biologiques.

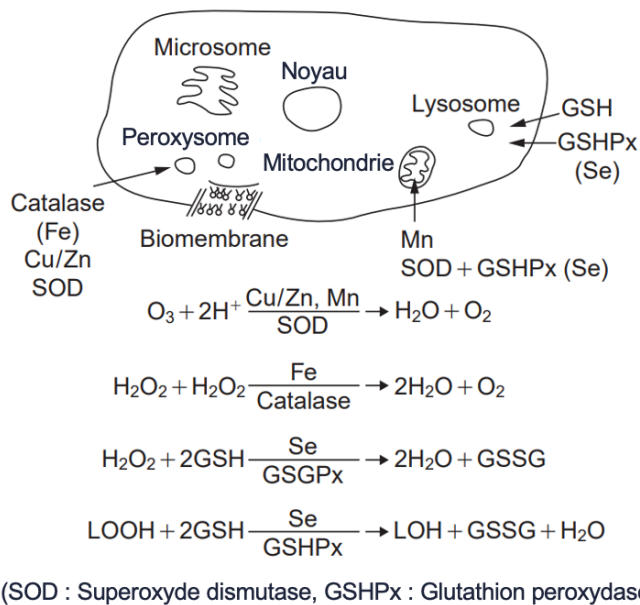


Fig 1.1 Exemples de fonctions biologiques essentielles des éléments trace dans l'organisme. Adaptée de [4].

Les éléments toxiques, quant à eux, n'ont aucune fonction biologique précise, du moins qui ne soit documentée ou reconnue. Cependant, comme leur nom l'indique, ces éléments, bien que retrouvés en concentrations souvent très faibles, peuvent engendrer des effets toxiques pour la santé humaine. Ces métaux agissent principalement en prenant la place des éléments essentiels au niveau du site actif enzymatique, inhibant ainsi leurs fonctions [6]. Le transport des éléments essentiels dans l'organisme est ainsi grandement diminué. Parmi les métaux toxiques retrouvés dans l'environnement, l'aluminium, l'arsenic, le cadmium, le mercure et le plomb sont les plus importants en raison de leur abondance et de leurs effets toxiques [7]. Ces éléments se retrouvent principalement dans la nourriture, dans l'eau, la cigarette, les peintures et dans certaines munitions de chasse. Une exposition prolongée à ces éléments peut affecter le système nerveux central, affecter le système

reproducteur, causer de l'anémie, causer de l'hypertension et, éventuellement, causer la mort. L'exposition chez les enfants est encore plus néfaste, spécialement pour le plomb, car une exposition prolongée affecte le développement physique et mental, le quotient intellectuel ainsi que les systèmes rénal, digestif et reproducteur [7-9]. Il est donc crucial de pouvoir détecter rapidement de potentielles sources d'expositions et de les éliminer, spécialement chez les enfants en bas âge, puisque les effets des éléments toxiques sont encore plus importants.

La façon la plus efficace aujourd'hui de déterminer les taux de métaux toxiques et essentiels demeure via l'analyse de spécimens sanguins [4,6-9] et ceux-ci peuvent être obtenus de différentes façons.

1.2 Méthodes de prélèvement

1.2.1 La ponction veineuse

La ponction veineuse ou phlébotomie est utilisée depuis des centaines d'années et demeure actuellement la méthode de choix lorsque des prélèvements sanguins sont requis [1]. Le sang est habituellement prélevé au niveau d'une veine située à l'intérieur du coude ou parfois même sur le dessus de la main [10]. Cependant, le nombre de veines disponibles est limité et elles peuvent parfois être difficiles à localiser, spécialement chez les nouveau-nés ou les bébés prématurés, les personnes âgées ayant des veines fuyantes ou tout simplement un patient avec des veines endommagées. D'ailleurs, chez les nouveau-nés, ce prélèvement est d'autant plus difficile et invasif, car il s'effectue généralement au niveau des veines ombilicales ou épicroâniennes [11]. Cette approche peut également être

douloureuse et stressante pour certains patients, même à l'âge adulte. En général, lors d'une ponction veineuse, on prélève entre 5 et 10 mL de sang, ce qui est un volume important de sang, spécialement pour la clientèle pédiatrique. Le prélèvement nécessite également l'assistance de personnel médical qualifié et ne peut être généralement effectué que dans un centre de prélèvement (clinique, hôpitaux, etc.). Il faut également beaucoup de matériel afin de procéder au prélèvement : aiguilles, garrot, tubes de prélèvement (avec ajout d'anticoagulant), tampons antiseptiques, gants, diachylon et contenants biorisques pour les déchets tranchants ou piquants [12]. Une fois le prélèvement terminé, il faut par la suite réfrigérer ou parfois même congeler les prélèvements sanguins pour le transport et l'entreposage, ce qui augmente grandement les coûts qui y sont associés.

Néanmoins, les prélèvements par ponction veineuse demeurent largement utilisés dans le domaine de la santé [1]. Malgré certains désavantages, cette approche de prélèvement demeure fiable et efficace, elle permet de réaliser plusieurs tests différents à l'aide d'un seul tube de prélèvement en raison du volume important prélevé et de reprendre les analyses si nécessaire. La ponction veineuse demeure tout de même bien documentée et maîtrisée par les professionnels de la santé.

1.2.2 Les papiers buvards DBS (*dried blood spot*)

Une alternative à la ponction veineuse est le prélèvement sur papiers buvards, appelé également DBS (*dried blood spot*). Cette méthode permet le prélèvement de volumes réduits de sang total (50-100 μ L) recueillis au niveau du talon chez les nouveau-nés ou au bout d'un doigt chez les enfants et les adultes. Cette méthode est également beaucoup

moins invasive, douloureuse et stressante que les prélèvements par ponction veineuse. Le principe est également beaucoup plus simple, puisque le personnel médical n'a qu'à déposer quelques gouttes de sang du patient sur la carte de prélèvement (papier buvard) et laisser le spécimen sécher à température pièce pour un minimum de 2 heures, d'où le nom anglais *dried blood spot*. Le prélèvement simplifié à l'aide des DBS ne nécessite pas obligatoirement la présence de personnel médical qualifié, bien que ce soit recommandé, comme c'est le cas pour les prélèvements par ponction veineuse. Le transport et l'entreposage à température pièce sont également beaucoup plus économiques. Pour pouvoir procéder à l'analyse, il suffit de poinçonner un petit disque au centre de la trace de sang (voir Fig 1.2). Les papiers buvards peuvent également être utilisés pour d'autres matrices biologiques comme l'urine ou la salive [13]. De plus, les avancements au niveau de l'instrumentation analytique (meilleures limites de détection, meilleures sensibilités, meilleures résolutions, etc.) nous permettent d'analyser des volumes de prélèvement sanguins de plus en plus réduits tout en gardant une bonne précision et exactitude des résultats.

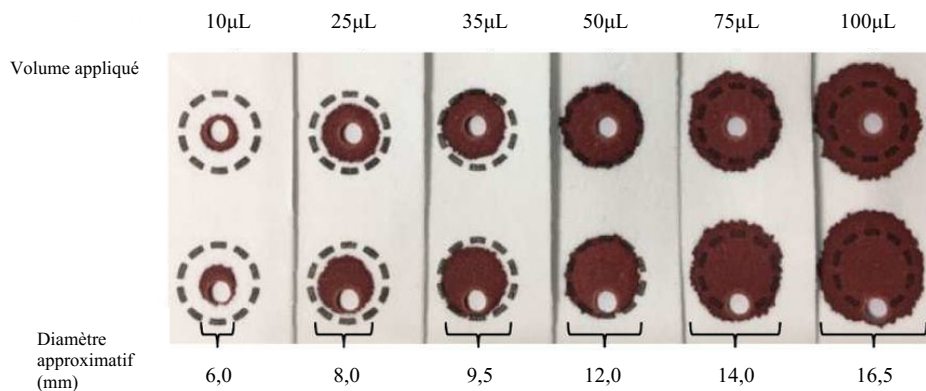


Fig 1.2 Exemple de prélèvement (poinçons) sur *Dried Blood Spot*.

L'efficacité de cette approche a été démontrée pour la première fois en 1963 par Guthrie et Susi [14] pour le dépistage néonatal de la phénylcétonurie, une maladie héréditaire produisant une accumulation de phénylalanine dans le corps [15]. Depuis, les DBS sont vastement utilisés pour le dépistage néonatal dans plusieurs pays et gagnent de plus en plus en popularité dans les domaines pharmaceutique, toxicologique et biologique, entre autres (voir Fig 1.3) [16-18]. Par exemple, aux États-Unis, 95% des nouveau-nés sont dépistés pour différentes maladies héréditaires dès leurs premiers jours de vie à l'aide des prélèvements DBS [16].

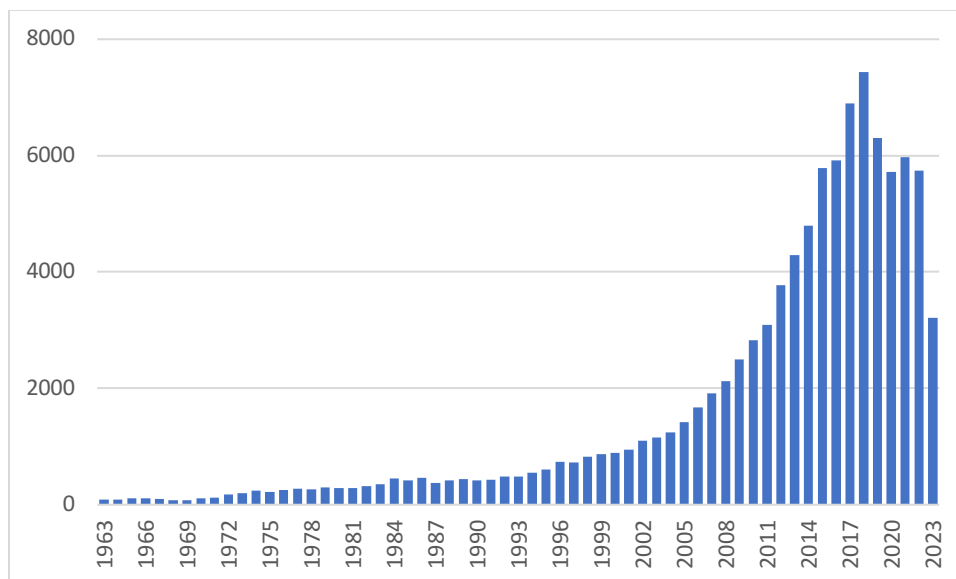


Fig 1.3 Nombre de publications avec les mots-clés *DBS* et *Blood* sur SciFinderⁿ entre 1963 et aujourd'hui (9 août 2023).

Cependant, les prélèvements sur papiers buvards présentent quelques inconvénients. Tout d'abord, la dispersion de la trace de sang sur le papier est affectée par le niveau d'hématocrite (pourcentage de globules rouges dans le sang total), qui varie d'un patient à

l'autre [17]. En effet, plus un patient a un taux d'hématocrite élevé, plus son sang est visqueux et moins il se dispersera sur le papier. À l'inverse, un spécimen sanguin contenant moins de cellules sanguines aura tendance à se disperser plus facilement sur le papier buvard. On observe également une dispersion non homogène du sang sur le papier et donc, une dispersion des différents composés d'intérêt qui est inégale. Il devient alors très difficile de savoir exactement quelle quantité de sang est analysée [18]. Pour une analyse qualitative (ex. identification de la présence/absence de marqueurs biologiques), l'utilisation de DBS ne pose pas trop de problèmes. Cependant, lors d'analyses quantitatives (normalement exprimée en quantité par unité de volume), il devient alors crucial de savoir le volume de fluide biologique utilisé pour l'analyse. Également, certaines études rapportent que les papiers buvards présentent des traces de contaminations en certains métaux, étant donné que le matériau n'a pas été conçu à la base pour l'analyse d'éléments trace [13, 21].

L'utilisation des papiers buvards pour l'analyse d'éléments trace toxiques et essentiels dans le sang est une méthode plus centrée sur le patient, simple et économique par rapport aux prélèvements par ponction veineuse. Cependant, plusieurs points négatifs sont à considérer comme l'imprécision des volumes analysés et la contamination rapportées des cartes de prélèvement.

1.2.3 Les VAMS (*volumetric absorptive microsampling*)

Une autre alternative aux prélèvements par ponction veineuse est l'utilisation de dispositifs VAMS (*volumetric absorptive microsampling*) qui, comme son nom anglais l'indique,

permet le prélèvement volumétrique de microvolumes. Le dispositif est connu sous le nom de Mitra[®] VAMS et est manufacturé par la compagnie Neoteryx/Trajan Scientific and Medical. Cette approche est dérivée de la méthode de prélèvement sur papiers buvards, car les prélèvements sont effectués au bout d'un doigt ou du talon et séchés à température pièce pour un minimum de 2h. Le dispositif de prélèvement est constitué d'un embout polymérique absorbant de volume précis (10, 20 ou 30 μ L) utilisé pour le prélèvement sanguin, mais également de toutes autres substances biologiques d'intérêt. Les VAMS offrent également tous les avantages associés aux DBS en plus de permettre des prélèvements précis et indépendants du taux d'hématocrite [16, 22-25]. De plus, étant donné que l'entièreté du polymère absorbant est analysée (contrairement à une portion du papier buvard obtenue par poinçonnage), les phénomènes de dispersion inégale du sang et des composés dans le substrat sont inexistant. Depuis que leur efficacité a été prouvée pour la première fois en 2014 (Denniff & al. 2014)[26], les dispositifs VAMS gagnent tranquillement en popularité (voir Fig 1.4). On observe depuis 2009 une augmentation graduelle de l'utilisation du principe de *microsampling* avec de plus en plus d'articles à chaque année. D'ailleurs, plusieurs études ont démontré l'efficacité des VAMS lors de l'analyse quantitative de nombreuses substances comme les drogues [24,27], les composés perfluorés et polyfluoroalkylés (PFAS) [27-28] et pour la métabolomique [30-32], entre autres [33-37].

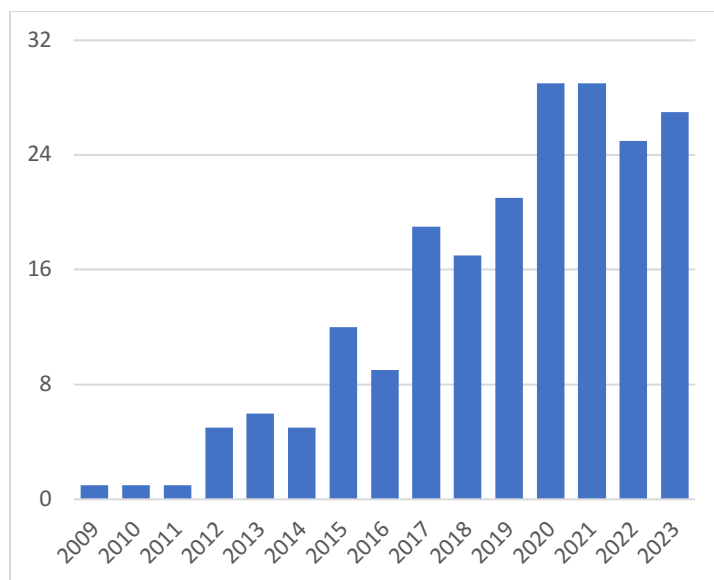
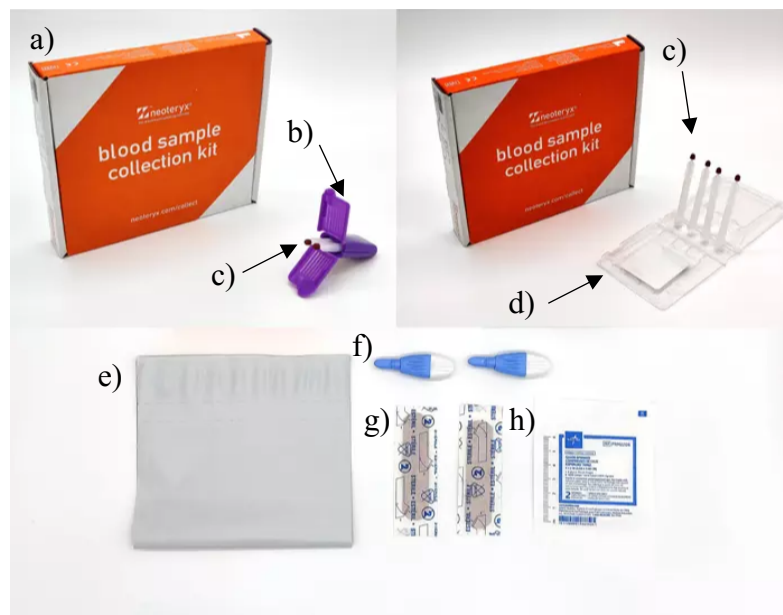


Fig 1.4 Nombre de publications avec le mot-clé *VAMS microsampling* sur Scifinderⁿ entre 2009 et aujourd’hui (9 août 2023).

L’utilisation de VAMS pour les prélèvements sanguins est également une méthode très simple d’utilisation et peut être faite par un adulte responsable en suivant le guide d’utilisation disponible dans la trousse de prélèvement ou en ligne [38]. La compagnie Neoteryx/Trajan Scientific and Medical propose d’ailleurs des trousse de prélèvements avec tout le matériel nécessaire au prélèvement et qui peuvent être commandées et livrées directement à la maison (voir Fig 1.5). Il serait donc possible de procéder au prélèvement sanguin chez soi en quelques minutes plutôt que de devoir se rendre dans un centre de prélèvement, ce qui monopolise une bonne partie de la journée et engorge l’accès au système de santé. La trousse de prélèvement vient également avec une enveloppe de retour permettant d’envoyer les spécimens sanguins directement vers un laboratoire d’analyse.



a) Boîte de transport. b) Étui pour VAMS de type *Cartridge*. c) Supports absorbants VAMS. d) Étui pour VAMS de type *Clamshell*. e) Sac de retour étanche. f) Lancettes. g) Pansements. h) Compresses non-tissées.

Fig 1.5 Trousse de prélèvement VAMS avec tout le matériel nécessaire au prélèvement.

Également, dans les domaines pharmacocinétique et toxicocinétique où plusieurs tests sont réalisés sur des animaux (souris ou rats), la réduction du volume de prélèvement a des impacts majeurs. En effet, un prélèvement de quelques microlitres permet de prélever plus régulièrement tout en diminuant le nombre de cobayes utilisés et sacrifiés [16]. Également, au cours des dernières années, de plus en plus d'attention est portée envers les enjeux éthiques touchant les recherches sur les animaux. Cette approche permet donc la réduction du nombre de sujets utilisés, du volume de sang prélevé et du même coup de meilleures conditions de vie pour les animaux de recherche [20]. Il a été prouvé qu'il est possible de prélever quatorze spécimens différents de 10 μL pour un même spécimen sur une période de 48h, éliminant ainsi le facteur d'intervariabilité observée entre les cobayes [40].

Dernier point qui distingue grandement les VAMS des deux autres approches de prélèvement décrites plus tôt est leur forme. En effet, l'embout polymérique VAMS est attaché à une tige en plastique qui possède les mêmes dimensions qu'un embout de pipette automatique. Il serait donc possible de développer des méthodes d'analyses pour lesquelles les procédures de laboratoire seraient entièrement automatisées [16, 20, 23].

1.2.4 Autres approches de microprélèvements [39]

Le dispositif Capitainer qDBS permet d'effectuer deux prélèvements de types DBS de volumes fixes de 10 μL via des microcanaux capillaires. Les disques DBS peuvent être retirés du dispositif à l'aide de pinces pour procéder à l'analyse. Au moment de débiter le projet, une seule étude sur l'applicabilité du dispositif Capitainer qDBS avait été publiée [40]. Malheureusement, lors de cette étude, seulement 77% des prélèvements ont été bien effectués (34/44).

Neoteryx/Trajan Scientific and Medical propose une autre alternative de prélèvement nommée HemaPEN. Ce dispositif de prélèvement semblable à un crayon est composé de 4 papiers buvards prédécoupés de 2,74 μL . Cependant, son utilisation est plus complexe et nécessite un minimum de pratique. Également, l'analyse de très faibles volumes (2,74 μL) risquerait de causer des problèmes de sensibilité lors de l'analyse d'éléments trace.

Un autre dispositif de microprélèvement se nomme le HemaXis DB 10. Ce dispositif de prélèvement consiste à prélever 4 spécimens de type DBS à l'aide de microcanaux capillaires volumétriques de 10 μL . Une fois le prélèvement effectué, il suffit de fermer le

dispositif pour que le sang contenu dans les microcanaux soit transféré sur le papier buvard. Lors d'une étude réalisée par Zwart et al. en 2018, ils ont obtenu des difficultés de prélèvement pour 15 des 65 patients prélevés (i.e. 23,1%) [41].

Malgré que ces trois dispositifs soient des alternatives intéressantes, ils font l'objet de très peu de publications et semblent présenter des difficultés au niveau du prélèvement. Également, contrairement aux VAMS qui contiennent des embouts polymériques, ces trois dispositifs utilisent les papiers buvards (DBS) comme moyen de prélèvement et peuvent être sujet aux mêmes problèmes que ceux énumérés à la section 1.2.2 *Les papiers buvards*. Ces trois autres dispositifs semblent également être beaucoup plus complexes au niveau de l'utilisation que les supports absorbants Mitra® VAMS.

Pour toutes ces raisons, il a été convenu d'utiliser les dispositifs VAMS pour la réalisation de ce projet de recherche.

1.3 Importance du projet de recherche

Les dispositifs Mitra® VAMS deviennent donc une alternative potentiellement intéressante pour supporter et voir même remplacer les prélèvements par ponction veineuse, non seulement dans le domaine de la santé, mais également pour tout ce qui a trait aux études de biosurveillances ou de dépistages rapides. Ce qui distingue le plus les VAMS des autres méthodes de microéchantillonnage, qui utilisent les papiers buvards, est leur embout polymérique absorbant de volume précis qui peut être analysé en entier sans se soucier des effets d'hématocrite ou de diffusion inégale du sang sur la surface absorbante. Également,

cette approche présente plusieurs avantages comparativement aux prélèvements par ponction veineuse, notamment le fait qu'elle soit centrée sur le patient, moins invasive et surtout qu'elle permette un prélèvement simplifié et adapté aux nouveau-nés, aux bébés prématurés et aux jeunes enfants.

L'objectif de ce projet de maîtrise est donc de développer et de valider une méthode d'analyse par ICP-MS/MS des éléments toxiques et essentiels dans le sang prélevé à l'aide de VAMS selon les normes ISO/CEI 17025 [42]. Ces normes internationales présentent les exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais pour la mise au point des systèmes qualité, administratifs et techniques. Par la suite, la nouvelle méthode développée et validée a été comparée à une méthode de référence reconnue pour l'analyse de ces mêmes éléments dans le sang utilisée au Centre de toxicologie du Québec (CTQ). Le CTQ pourra donc se munir d'une méthode d'analyse basée sur les prélèvements Mitra[®] VAMS pour l'analyse d'un panel d'éléments toxiques et essentiels. Les éléments visés par cette méthode sont : l'aluminium (Al), l'arsenic (As), le cadmium (Cd), le cobalt (Co), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo), le plomb (Pb), le sélénium (Se), l'uranium (U) et le zinc (Zn).

Le CTQ s'intéresse à l'identification et à la quantification de substances chimiques susceptibles de représenter un risque pour la santé humaine [43]. Le CTQ est également le centre de référence en toxicologie au sein du réseau des laboratoires hospitaliers du Québec. Les spécimens acheminés au CTQ sont majoritairement des prélèvements de sang total, d'urine, de cheveux et des tissus prélevés en contexte de suspicion d'intoxications aiguës ou chroniques, ainsi qu'à des fins cliniques, de biosurveillance et de recherche.

L'expertise analytique du CTQ est déterminante dans plusieurs projets, comme des analyses (qualitatives et quantitatives) pour la population générale, le suivi de travailleurs, à la demande de chercheurs canadiens ou étrangers (ex. cohortes mères-enfants), ou en urgence pour le Centre antipoison du Québec [43]. Le CTQ a pour mandat d'assurer la disponibilité, la qualité et l'évolution de l'expertise technique et scientifique en toxicologie analytique de façon à pouvoir répondre aux besoins de santé publique, du réseau hospitalier, des centres universitaires, des institutions publiques (ex. Santé Canada) et de certaines clientèles externes [43]. L'objectif de ce projet cadre donc parfaitement avec les mandats du CTQ qui, en fonction des besoins de sa clientèle, développe régulièrement de nouvelles méthodes d'analyse. Le laboratoire contribue également au développement des compétences par des formations offertes aux technologistes, chimistes, biochimistes cliniques et étudiants gradués [43].

Comme mentionné à la section 1.2.3 *Les VAMS (volumetric absorptive microsampling)*, plusieurs études ont déjà été réalisées sur l'analyse de sang prélevé à l'aide de VAMS pour la quantification de plusieurs composés différents [24,27,28,30-37]. Cependant, il existe encore très peu d'études qui ont été réalisées sur la quantification de métaux toxiques et/ou essentiels dans le sang, la plus notoire étant celle de Bolea-Fernandez et al. réalisée en 2016 [44]. En tout, à l'heure actuelle, il n'existe que 7 articles sur l'analyse de métaux dans le sang à l'aide de VAMS [44-50]. Sur ce lot, 2 articles discutent du développement de méthodes multiélémentaires [44-45], alors que les autres rapportent des méthodes monoélémentaires pour le cobalt [46], le fer [47-48], le mercure [49] et le lithium [50]. Il y a donc un manque important de connaissance sur l'analyse des éléments trace dans le

sang prélevé à l'aide des supports absorbants VAMS. Ce projet de maîtrise permet donc également de combler ce manque de connaissance en évaluant de manière exhaustive les possibilités, les difficultés et les limitations associées à l'analyse d'un panel de 12 éléments toxiques et essentiels.

Pour la compagnie Neoteryx/Trajan Scientific and Medical, cette collaboration avec l'Institut national de santé publique (INSPQ), et plus particulièrement le CTQ, leur permet d'étudier la possibilité d'analyser une gamme de substances et d'éléments plus larges à l'aide de leur dispositif Mitra[®] VAMS. L'analyse simultanée d'éléments toxiques et essentiels dans le sang prélevé à l'aide des supports absorbants VAMS est un sujet encore très peu exploré. Les résultats de ce projet de maîtrise permettront donc de faire un grand pas vers l'implantation des dispositifs VAMS à travers les différents réseaux hospitaliers. En effet, les conclusions de cette recherche permettront d'établir quels éléments peuvent être quantifiés avec précision, ainsi que les difficultés et les limitations associées à la quantification de plusieurs éléments trace dans le sang prélevé sur VAMS.

Également, il existe un manque important de données et de valeurs de référence pour les enfants âgés de moins de 3 ans. En effet, les études populationnelles, par exemple l'étude canadienne sur les mesures de la santé (ECMS), ne présentent que très rarement de données de références sur la population âgée de 0 à 3 ans pour les contaminants environnementaux dans le sang [51-52]. La raison est fort simple : les prélèvements par ponction veineuse ne sont pas adaptés aux jeunes enfants et aux nouveau-nés. Par contre, si une approche de prélèvement moins invasive et adaptée aux nouveau-nés était utilisée, il serait possible

d'obtenir des données et des valeurs de référence sur cette tranche de la population. Un des objectifs finaux de ce projet de maîtrise est donc de proposer une méthode d'analyse des éléments toxiques et essentiels dans le sang prélevé sur VAMS qui pourrait être utilisée lors des prochains cycles de l'ECMS. Les VAMS présentent de nombreux avantages, notamment, ils sont adaptés aux prélèvements chez les nouveau-nés. L'échantillonnage à grande échelle sur la population canadienne de 0 à 3 ans permettrait donc de combler ce manque important de données et de valeurs de référence sur une partie des contaminants environnementaux, dont font partie les métaux.

1.4 L'ICP-MS/MS

L'ICP-MS/MS (*Inductively coupled plasma tandem mass spectrometry*) est un instrument qui utilise un plasma d'argon à couplage inductif d'environ 8 000K pour procéder à l'ionisation [53]. C'est l'instrument de choix pour l'analyse d'éléments comme ceux ciblés dans ce projet, car l'ionisation est très puissante et décompose l'entièreté de la matière jusqu'à leur forme élémentaire [53]. Les éléments sont ensuite ionisés, puis séparés en fonction de leur ratio masse sur charge (m/z) à l'aide des quadripôles. Étant donné que l'argon est un gaz inerte et possédant une énergie d'ionisation plus élevée que la grande majorité des éléments (excepté les autres gaz inertes et le fluor), il est l'élément idéal pour former le plasma qui servira de source d'ionisation pour les autres éléments. Le plasma est généré dans la torche en quartz. Une bobine d'induction située autour de la torche induit un courant alternatif à haute fréquence qui génère le plasma. De plus, cet instrument possède une très bonne sensibilité (de l'ordre des parties par trillion), la capacité d'analyser simultanément plusieurs éléments d'intérêt et une injection rapide qui permet l'analyse de

faibles volumes d'échantillons. Tous ces avantages sont très importants pour ce projet étant donné qu'une douzaine d'éléments sont ciblés par la méthode d'analyse et qu'un faible volume de sang est utilisé pour l'analyse (30 µL).

L'ICP-MS/MS est composé d'une chambre de nébulisation qui permet d'introduire les échantillons sous forme de fines gouttelettes, de la torche à plasma qui procède à l'ionisation, de deux cônes d'échantillonnage (*sampler* et *skimmer*), de deux quadripôles qui agissent comme filtre de masse pour discriminer les ions en fonction de leur ratio m/z, une cellule de collision/réaction ainsi que d'un détecteur (voir Fig 1.6). Le rôle de la cellule de collision/réaction ou octopôle est de séparer les ions de même ratio m/z grâce à un gaz de collision (qui va diminuer l'énergie cinétique des ions interférents) ou de réaction (qui va réagir avec l'ion d'intérêt ou l'ion interférent pour former des adduits).

Il existe deux types d'interférences soit les interférentes isobariques (autres éléments avec le même ratio m/z, ex. $^{204}\text{Hg}^+$ et $^{204}\text{Pb}^+$) et polyatomiques (ex. $^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$ sur l'ion $^{64}\text{Zn}^+$). L'octopôle permet donc d'éliminer ces interférences soit par collision avec un gaz de collision comme l'hélium (He), le dihydrogène (H_2) (ex. $^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$ est beaucoup plus volumineux que $^{64}\text{Zn}^+$, donc plus de collisions avec le gaz dans la cellule, ce qui diminue son énergie cinétique) ou par réaction avec l'ammoniac (NH_3) ou le dioxygène (O_2) (ex. $^{204}\text{Hg} + \text{NH}_3 \rightarrow ^{204+\text{X}}\text{Hg}(\text{NH}_3)_\text{X}$ alors que ^{204}Pb ne réagit pas avec NH_3). Étant donné que le sang est une matrice complexe (composée de cellules, de protéines, d'acides aminés, etc.), il contient beaucoup d'éléments qui peuvent interférer avec les éléments ciblés dans ce projet (carbone, calcium, chlore, potassium, magnésium, sodium, phosphore, soufre et

oxygène, entre autres [44]). La cellule de collision/réaction et les deux quadripôles sont donc très importants pour permettre d'éliminer au maximum ces interférences isobariques et polyatomiques et d'obtenir le maximum de signal par rapport au bruit de fond pour nos éléments d'intérêt.

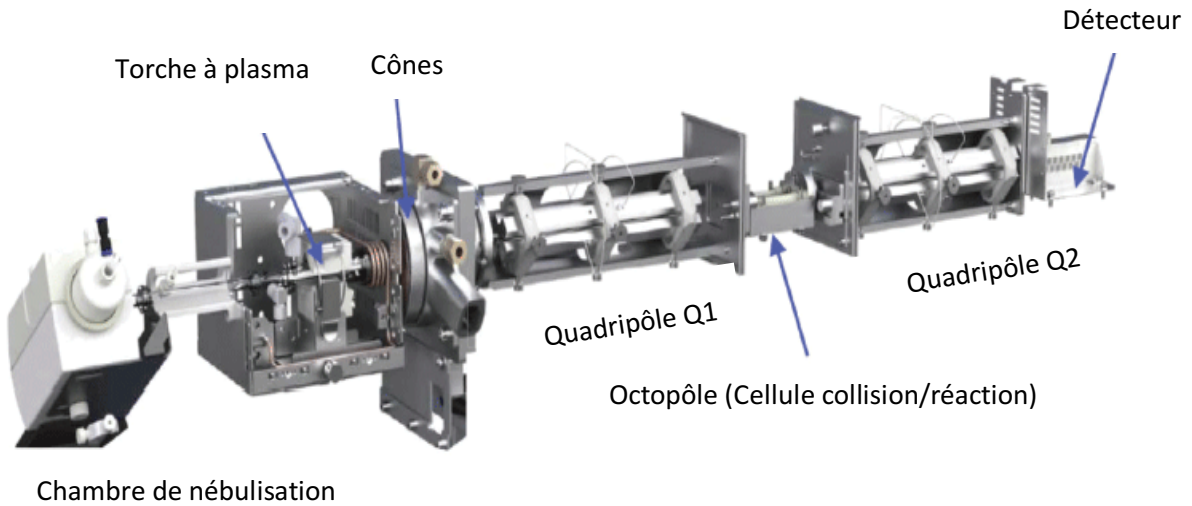


Fig 1.6 Schéma d'un instrument ICP-MS/MS. Adapté de [54].

CHAPITRE 2

DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE MÉTHODE D'ANALYSE PAR ICP-MS/MS DU PLOMB SANGUIN PRÉLEVÉ SUR SUPPORT ABSORPTIFS MITRA® VAMS®

Le contenu de ce chapitre est écrit sous la forme d'un article scientifique qui a fait l'objet d'une publication, en anglais, dans le journal scientifique « Bioanalysis » le 9 mars 2023.

L'article présenté est la version finale reprise sans aucune modification et transmise à l'éditeur avant qu'il ne soit mis-en-page et formaté pour correspondre aux exigences du journal scientifique « Bioanalysis ».

2.1 Contribution des auteurs

Anthony Breton: Analyse des résultats, Expérimentation, Méthodologie, Validation, Recherche bibliographique, Écriture, Révision, Modification

Ciprian Mihai Cirtiu: Conceptualisation, Méthodologie, Validation, Supervision, Écriture, Révision, Modification

Normand Fleury: Ressources, Supervision, Demande de fonds, Écriture, Révision, Modification

André Lajeunesse: Conceptualisation, Supervision, Écriture, Révision, Modification

James Rudge: Ressources, Écriture, Révision, Modification

2.2 Résumé de l'article

Le plomb est un élément toxique pour l'humain qui peut présenter des risques pour la santé et avoir des effets néfastes sur plusieurs systèmes biologiques. La quantification du niveau de plomb dans le sang est le meilleur moyen d'évaluer le taux d'exposition d'un individu et la méthode de prélèvement du sang demeure actuellement la ponction veineuse. Cependant, cette approche de prélèvement présente plusieurs inconvénients, par exemple, le prélèvement d'un volume important de sang (5-10 mL), son aspect invasif ainsi que le besoin d'avoir du personnel qualifié pour effectuer le prélèvement. Le but de cette étude est donc de développer et valider une méthode d'analyse par ICP-MS/MS du plomb dans le sang prélevé à l'aide des supports absorbants Mitra[®] VAMS[®]. Les dispositifs VAMS présentent plusieurs avantages par rapport à la ponction veineuse, notamment le prélèvement d'un volume réduit de sang (30 µL), ce qui est adapté à la clientèle pédiatrique. La nouvelle méthode d'analyse a été développée et validée selon les normes ISO17025. Une fois la méthode validée, la performance de la méthode a également été évaluée en la comparant à une méthode de référence reconnue et utilisée au Centre de toxicologie du Québec pour la quantification des taux de plomb sanguins par ponction veineuse. La comparaison entre les deux méthodes n'a démontré aucun biais significatif. Les résultats obtenus dans cette étude démontrent qu'il est possible de quantifier des taux de plomb sanguin avec exactitude et précision en utilisant les dispositifs Mitra[®] VAMS[®] comme approche de prélèvement.

2.3 Article scientifique

Method development for the quantification of lead levels in whole blood sampled on Mitra[®] with VAMS[®] tips by inductively coupled plasma–MS/MS

Author information :

Anthony Breton^{a,b}, Ciprian Mihai Cirtiu^{a,b}, Normand Fleury^a, André Lajeunesse^b, James Rudge^c

^aInstitut national de santé publique du Québec (INSPQ), Centre de toxicologie du Québec (CTQ), 945 Wolfe, Quebec, Canada

^bUniversité du Québec à Trois-Rivières (UQTR), Department of Chemistry, Biochemistry and Physics, 3351 boul. des Forges, Quebec, Canada

^cTrajan Scientific and Medical, Crownhill Business Center, 14 Vincent Ave, Crownhill, Milton Keynes, UK

Corresponding author e-mail address:

Ciprian-mihai.Cirtiu@inspq.qc.ca (C. M. Cirtiu)

Anthony.Breton@inspq.qc.ca (A. Breton)

Keywords:

Volumetric absorptive microsampling (VAMS[®]), Lead (Pb), Whole Blood, ICP-MS/MS, Blood Lead Level (BLL)

Abstract

Background: Lead (Pb) is harmful for humans by having adverse effects on different biological systems. Venepuncture is the “Gold Standard” for Blood Lead Level (BLL) analysis but this method has many flaws. The goal of this research was to develop and validate a more practical approach for blood sampling. **Materials & methods:** Mitra[®] devices based on VAMS[®] and ICP-MS/MS technologies were employed. Performance evaluation of the newly developed method was also assessed by comparing it to a commonly used method at CTQ’s laboratory for BLL analysis. **Results:** Comparison showed no signs of significant difference between the two methods. **Conclusion:** VAMS may be a useful alternative sampling approach for further research on blood Pb analysis and possibly many other trace elements.

2.3.1 Introduction

Metals and trace elements can be found anywhere in the environment (dust, air, soil) as well as in food, drinking water and manufactured products. Some metals and trace elements like lead (Pb) don't have any known essential functions for the human body but can lead to intoxication symptoms following a moderate to high exposure. The most common signs and symptoms of Pb poisoning are: abdominal pain, anorexia, nausea and constipation, headache, joint and muscle pain, difficulties with concentration and memory, sleep disturbances, anemia with basophilic stippling, peripheral neuropathy and nephropathy [8]. Furthermore, Pb toxicity is even more of a concern for infant development (including the unborn foetus), as the metal adversely affects several biological functions including those of the central nervous, cardiovascular, digestive, renal and reproductive systems. Despite efforts to reduce exposure by institutions and governments, Pb intoxication is still common, mainly as a result of ingesting contaminated food and water (from plumbing, waste, and ceramic plates for example). In addition, some dyes, paints, tobacco, toys and gasoline may contain Pb and also can be sources of exposure. In the workplace, Pb exposure can be encountered as a result of welding and furthermore, the heavy metal is also found in paints pigments, ceramics, insecticides, plastics, alloys, bullets and ammunition.

Currently, measurement of blood lead level (BLL), through venepuncture, is the most reliable method to measure the degree of exposure in an individual [9]. However, this approach is inconvenient for many reasons, as it still requires a collection of 5 to 10 mL of blood which can be a challenge for vulnerable cohorts such as pediatrics, geriatrics and patients with leaky or damaged veins. Moreover, the collection event can also be stressful for patients, due to its invasiveness. Furthermore, depending on the test, blood collection

tubes require the use of anticoagulant, and therefore, sampling tubes must be refrigerated or frozen post sampling, and cryogenically stored during the transportation to the testing laboratory as well as up until analysis [55].

With the advancement of instrumentation that offers better sensitivity and lower detection limits, the need for invasive procedures to collect such high blood volumes is slowly decreasing. As a result, this offers the opportunity of using reduced volume blood collection devices to minimise the aforementioned challenges of venepuncture. One such device, the dried blood spot (DBS), has gained increased popularity within the pharmaceutical, pharmacokinetic, biochemical, and toxicokinetic fields (among others) since its introduction in 1963 [20]. This method was first employed for the screening of metabolic disorders in newborns and has since found many other applications, due to its patient-centered and simplified blood collection process. Furthermore, DBS enables at-home sampling, through the self-collection of a microsample of capillary blood (generally 20-70 μL), onto the DBS filter paper. Moreover, DBS is easier and cheaper for storing and shipping. The reason for this is that samples can be often shipped at room temperature because once they are dried, they are generally considered as non-hazardous and stable. This however is dependent on the analyte of interest and the source of the blood. In preclinical toxicokinetic and pharmacokinetic studies, DBS also leads to a decrease in the number of animals required for analysis [23]. However, there are some issues regarding the use of DBS that can affect quantitation. For example, varying hematocrit levels (HTC), as well as blood viscosity, can both affect the dispersion of blood on the DBS material, which results in different blood spot sizes. This is an issue when a fixed volume punch of the DBS sample is employed during laboratory processing which can lead to biases in the

data. Furthermore, it has also been demonstrated that whole blood does not spread homogeneously which can impact quantification of some substances, dependent upon where on the DBS card the punch is taken [16,23]. In terms of measuring trace-elements in capillary blood, environmental contamination of the DBS substrate is also an issue that affects effective quantification using this device [21,44,46,56,57].

In 2014, a new derivative technology of DBS called VAMS[®] employing volumetric absorptive microsampling was first demonstrated by Spooner and Denniff [26]. Since, VAMS has proven to bring significant advantages over DBS regarding mitigating HTC biases. Furthermore, VAMS provides volumetric accuracy, and also allows for pre-treatment, as well as automation, while also maintaining the same benefits of the legacy technique. This technology uses a hydrophilic polymer absorbent VAMS tip of 10, 20 or 30 μ L attached to a plastic sampler body, for the collection of blood via a finger or heel prick, while also being useful for other biological matrices. The VAMS tips are then left to dry for around 3 hours before they can be stored and used for analytical purposes [22]. In addition, if regular monitoring of a patient's blood Pb level is required, at-home sampling methods such as this can save time for the patient and the health care system by limiting the number of medical appointments. Other devices such as hemaPEN[®] or HemaXis DB 10 could provide similar advantages [39], but the current work, presented in this publication, focuses on the development of an analytical method using VAMS technology. Over the years, many studies have shown that precise and accurate blood volumes can be collected independently of the HTC levels using Mitra[®] devices with VAMS technology [16,22,24,25,39]. Bioanalytical studies using Mitra[®] devices have been conducted on various substances such as perfluorinated compounds [28], caffeine, paraxanthine [24],

small molecules (lipids, amino acids, drugs, hormones, etc.) [30-35,37], large molecules like proteins [36] and even nucleic acids (DNA, RNA) but very few on traces elements [55]. Therefore, a better understanding of BLL analysis using VAMS is needed by conducting a comprehensive study and in doing so, developing a method of quantification of blood Pb from VAMS extracts. Previously, Bolea-Fernandez et al, illustrated a simultaneous analysis of ultra-trace concentrations of prosthesis-related metals (Al, Ti, V, Co, Cr, Ni, Sr and Zr) in whole blood using VAMS [44]. More recently, a study on mercury (Hg) biomonitoring using VAMS was conducted on German population by Koutsimpani-Wagner et al. [49]. However, to the best of our knowledge, only one study on Pb analysis using VAMS was ever published [45], but the use of VAMS as a new sampling method to evaluate BLL was not the main focus of the study.

The goal of the current research is to develop an alternative blood sampling method for biomonitoring and routine analysis of BLL evaluation.

2.3.2 Materials and Methods

2.3.2.1 VAMS, chemicals and stock solutions

Mitra[®] devices (with VAMS technology) were supplied by Neoteryx[®] (Trajan Scientific and Medical, USA) with a nominal volume of 30 μ L. It is to be noted that each lot of Mitra[®] devices has its own accurate sampling volume specified on the certificate of conformity. Only high-purity reagents (nitric acid and Milli-Q water) were used throughout this study. Ultra-pure water from a Milli-Q system (Millipore, France) was used during experiments for dilution purposes. All spiking solutions were also prepared using ultra-pure water to prevent clogging of the blood standard solutions. A 1000 μ g/mL Pb stock solution (Inorganic Ventures[™], USA) was used for the preparation of the spiking solutions while

rhodium (Rh) and rhenium (Re) at 2 µg/L in 0.5 % (v/v) aqueous solution of nitric acid (HNO₃) Omnitrace Ultrapure (Merck, Germany) were employed as internal standard.

2.3.2.2 Sample collection

One of the issues regarding the use of VAMS tips for trace elements analysis is the possible contamination originating from manufacturing process. To reduce the contamination as much as possible, a washing protocol was established using an aqueous solution of 2 % (v/v) HNO₃, an Ultrasonic Cleaner (VWR International, USA) and the Mitra[®] 96-Autorack[®]. This washing procedure enabled the VAMS tips to release their residual trace elements which lowered the analytical noise without affecting their absorptive capability once dried. To complete the washing procedure, a rinsing step with ultra-pure water was added to eliminate any residual traces of nitric acid that could degrade the polymeric surface of the VAMS tip and therefore affect its volume of collection. Before sampling with the VAMS, all solutions (QC and calibration curve points) are mixed gently for at least 5 minutes by inversion using a Labquake Shaker (Barnstead/ThermoLyne, USA). Samples are then generated by touching the blood with the tip of the Mitra[®] micro-sampler without submerging it, which then allows the VAMS tips to fill by capillary action. The samples are then dried for a minimum of 3 hours under ambient conditions before digestion, or can also be stored if needed in the Mitra[®] 96-Autorack[®] or Mitra[®] Clamshells provided by Neoteryx[®].

2.3.2.3 Sample extraction and analytical method

Samples were digested using a DigiPREP MS digestion block (SCP Science, Canada) at 80 °C for 2 hours with a solution made of 200 µL concentrated HNO₃, 50 µL of Milli-Q water and 50 µL of internal standard solution (Re and Rh at 2 µg/L) in a 4.5 mL metal free plastic tube (Sarstedt, Germany). Once the digestion was completed, the tips were removed from the tubes using plastic tweezers and the digested solutions were diluted with 2080 µL of Milli-Q water using an electronic pipette (Sartorius, Germany). To ensure a constant carbon load for all samples, as red blood cells level could vary from person to person, 20 µL of ethanol was then added to each tube in order to bring the final volume of the solution to 2400 µL (80-fold dilution from original 30 µL VAMS). The calibration curve of Pb in blood was prepared with blank whole blood collected from healthy and unexposed volunteers (collected by the External Quality Assessment Schemes Department at CTQ) spiked at different concentrations (C₁ to C₇) ranging from 0.025 to 2.5 µmol/L (normal concentrations in blood are ranging from 0.024 to 0.154 µmol/L) [58]. The spiked volume was equal to 5 % of the total volume of the standard solution. It is worth noting that during this work, two types of blanks were used. Treatment blanks were blank VAMS tips treated analytically like real blood samples (digestion, internal standards, dilution, etc.) and used as background reference, while regular blanks were blank blood sampled on VAMS tips and considered as calibration blanks (C₀). Also, two different reference materials (QC) from the QMEQAS program (Quebec Multielement External Quality Assessment Scheme operated by the Centre de toxicologie du Québec, Canada) were used during the development of the method, having respectively a low (0.066 µmol/L) and a high (1.1 µmol/L) Pb concentration.

All tests were achieved using an Agilent 8800 and 8900 ICP-MS/MS instruments (ICP-QQQ, Agilent Technologies, Japan). The sample introduction system for both instruments is composed of a MicroMist nebulizer coupled to a double-pass Scott-type spray chamber. These instruments are equipped with two quadrupole units acting as mass filters (MS/MS mode) and an octopole reaction/collision cell system (ORS) operated with helium (He) as collision gas. In order to get a better sensitivity and more accurate results, Pb isotopes ^{206}Pb , ^{207}Pb and ^{208}Pb were all monitored and summed, and both ^{103}Rh and ^{185}Re can be used as internal standards. Table 1 shows the instruments settings and the acquisition parameters for both Agilent 8800 and 8900 systems. All instrument parameters were optimized with a solution of 10 $\mu\text{g/L}$ of Pb and the tuning option of the Agilent software was used on both instruments. The optimized parameters help in reducing interferences that are coming out from the matrix or sample preparation as much as possible, thus maximizing the signal/background ratio.

Table 2.1 Instrument settings and acquisition parameters for ICP-MS/MS 8800 and 8900

Instruments settings		Acquisition Parameters*			
		Agilent 8800	Agilent 8900	Q1 → Q2 masses	Integration time/mass (s)
Plasma	Scan Type	MS/MS	MS/MS	103 → 103	0.2
	RF Power (W)	1550	1550	185 → 185	0.2
	Carrier gas flow rate (L min ⁻¹)	0.90	0.90	206 → 206	0.3
	Nebulizer Pump (rps)	0.25	0.25	207 → 207	0.3
	S/C Temp (°C)	4	4	208 → 208	0.3
	Gas Switch	Makeup Gas	Makeup Gas		
	Makeup/Dilution Gas (L min ⁻¹)	0.20	0.20		
Lenses	Extract 1 (V)	0.0	-3.2		
	Extract 2 (V)	-185.0	-210.0		
	Omega Bias (V)	-105	-100		
	Omega Lens (V)	10.4	10.0		
	Q1 Entrance (V)	1.0	1.0		
	Q1 Exit (V)	1.0	0.0		
	Cell Focus (V)	2.0	3.0		
	Cell Entrance (V)	-50	-50		
	Cell Exit (V)	-70	-70		
	Deflect (V)	-1.2	1.0		
	Plate Bias (V)	-60	-60		
	Q1	Q1 bias (V)	-1.0	0.0	
Q1 Prefilter Bias (V)		-20.0	-10.0		
Q1 Postfilter Bias (V)		-22.0	-5.0		
Cell	Reaction gas	He	He		
	Reaction gas flow rate (mL min ⁻¹)	7.0	8.0		
	Octopole bias (V)	-10.0	-10.0		
	Octopole RF (V)	190	180		
	Energy discrimination (V)	-8.0	-8.0		
Acquisition	Stabilization time (s)	20	20		
	Quick Scan	OFF	OFF		
	Wait time offset (ms)	0	0		
	Sweeps/replicate	50	50		
	Replicate	5	5		
	Total Acq time/sample (s)	31.00	33.65		

* Same acquisition parameters for both instruments were used

2.3.2.4 Analytical validation

Different analytical parameters were assessed on both instruments to ensure the validity of the method according to ISO 17025 guidelines [42]. The limit of detection (LoD) and quantification (LoQ), repeatability, matrix effect, robustness and linearity were evaluated during this work. Detection limits were determined using the standard deviation (S.D.) of 10 replicates of the low Pb concentration QC material while repeatability was assessed at two different levels using 10 replicates of both the low and high QC materials. The validity of matrix effect was evaluated by measuring the recovery of 6 real blood samples of random concentrations spiked with a known concentration of Pb. For robustness, 4 different sample preparation parameters were slightly modified over 8 different experiments. These parameters were as following: digestion time, VAMS cleanness (washed vs. unwashed), dilution factor and finally the brand of nitric acid used for digestion. By using a 2^{4-1} fractional factorial design, the effect of the 4 parameters on the sample preparation were measured on whether or not they had a significant impact on the sample preparation and the measured concentration of Pb for the high QC material. For linearity, the calibration range was determined by generating a 7-point calibration curve ranging from 0.0 to 2.5 $\mu\text{mol/L}$ of Pb and 2 more points going up to 10 $\mu\text{mol/L}$ were added to assess the linearity range.

Finally, to evaluate the performance of the analytical method, blood from different participants was collected via venepuncture and with Mitra[®] devices based on VAMS technology via a finger prick. BLL was then measured using a routine method used at the Centre de Toxicologie du Québec (CTQ) for the venous blood and the newly developed method for samples collected on Mitra[®] devices with VAMS tips. This comparison helped

identifying any bias coming either from the analytical method itself or from the use of VAMS tips. To accomplish blood collection on real participant, an ethic certificate was provided by the Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR) (#CER-22-286-07.21). All participants signed a consent form before their participation in this research.

2.3.3 Results

All results obtained for the validation parameters are presented in Table 2. Detection limits were determined on both Agilent 8800 and 8900 instruments using 10 replicates of the low QC material. LoD and LoQ were defined respectively as 3 and 10 times the value of the standard deviation (S.D.) for 10 replicates. Therefore, the LoD value was established at 0.011 and 0.0080 $\mu\text{mol/L}$ respectively for the Agilent 8800 and 8900, while the LoQ was established at 0.035 and 0.027 $\mu\text{mol/L}$.

Similarly to LoD and LoQ, the repeatability was assessed using 10 replicates of both the low and high QC materials. This validation parameter is calculated by dividing the S.D. by the average of the 10 measured replicates (also called relative standard deviation or RSD). For Agilent 8800, repeatability was evaluated at 5.7 and 3.4 % for the low and the high QC respectively, while for Agilent 8900 it was evaluated at 4.1 and 2.1 %.

Matrix effect was determined by spiking 6 real blood samples collected via venepuncture into sampling tubes. The first set of 6 samples was created by collecting blood using Mitra[®] devices with VAMS tips directly from the sampling tubes, while the second set consisted of spiking 2 mL of each of the 6 samples of the first set with a known concentration (0.063 $\mu\text{mol/L}$) before collecting on VAMS tips. Matrix effect was then assessed by averaging

recoveries measured for each of the 6 samples. Matrix effect was evaluated at 96.6 and 103.2 % for Agilent 8800 and 8900 respectively.

Robustness was determined by modifying 4 parameters of samples preparation using the high QC sample. The 4 modified parameters were as follows: the time of digestion (1h vs. 2h), the cleanness of the VAMS tips (washed vs. unwashed), the dilution factor (80x vs. 100x) and the brand of nitric acid used for the digestion (Omnitrace vs. Ultrex (J.T. Baker, Thermo Fisher Scientific, USA)). The difference has been calculated by subtracting the average Pb measured concentration of the modified parameter to the average Pb measured concentration of the original parameter. Note that no quadratic effect or interactions were considered during this test.

Table 2.2 Results of all validated analytical parameters on Agilent 8800 and 8900 systems

		Agilent 8800	Agilent 8900
Detection and quantification limits ($\mu\text{mol/L}$)	LoD	0.011	0.0080
	LoQ	0.035	0.027
Repeatability (%)	Low QC	5.7	4.1
	High QC	3.4	2.1
Matrix effect (%)	Recovery	96.6	103.2
	S.D.	14.0	14.1
Robustness (%)	Digestion time	7.9	7.8
	VAMS cleanness	-2.4	-2.6
	Dilution factor	9.5	8.7
	Acid brand	5.6	5.2

Linearity was evaluated, using a 7-point Pb blood calibration curve, ranging from 0.025 to 2.5 $\mu\text{mol/L}$. These first 7 points were used to determine the calibration range of the method. Two more calibration points were added going all the way up to 10 $\mu\text{mol/L}$ of Pb in blood. Calibration points were prepared in triplicates. Results are shown in Figure 1. The

determination coefficient (R^2) was determined to be 0.9996 for Agilent 8800 and 0.9995 for Agilent 8900.

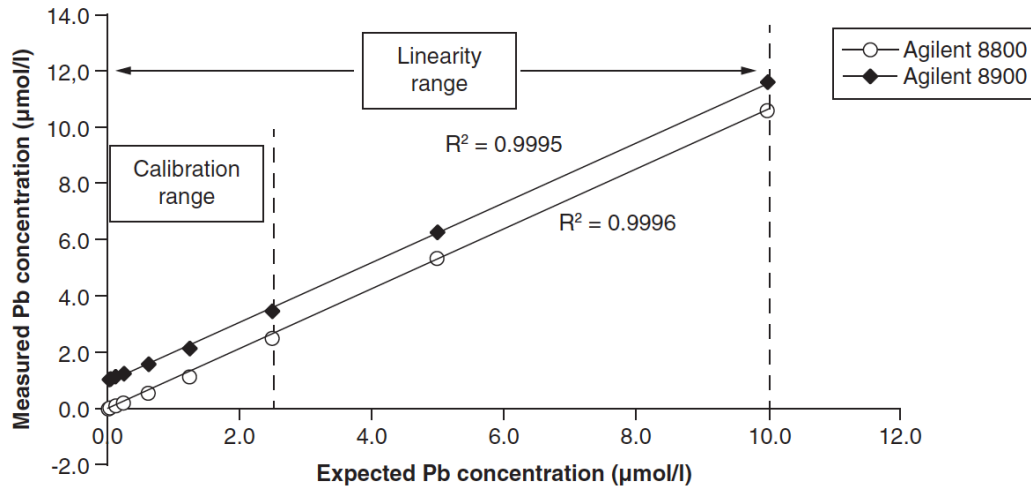


Fig. 2.1 Measured blood Pb concentrations of 3 replicates of each point of the linearity range compared to their expected Pb concentration ranging from 0 to 10 µmol/L (Vertical axis offset by 1 µmol/L on Agilent 8900 for visual separation of curves)

The stability of Pb after the sampling on the Mitra[®] device with VAMS tips, stored at room temperature, was also assessed. In fact, point #4 of the calibration curve (0.25 µmol/L) was sampled on different VAMS, and tests were conducted in triplicate up to 6 months after sampling. It was determined that Pb is stable for 3 months after the sampling with very low S.D. between each replicate (1.0, 6.0 and 2.4 %) even when stored at room temperature and starts to decrease a little bit around the 6th month with a higher S.D. (7.2 %). We can see in Figure 2 that recoveries of Pb are all very close to 100 % (100.5, 100.6, 98.5 %) for the first 3 months, but decrease around 90 % (92.6 %) after 6 months. Therefore, it was determined that Pb is very stable in dried blood sampled with VAMS for at least 3 months at room temperature and somewhat stable even after 6 months.

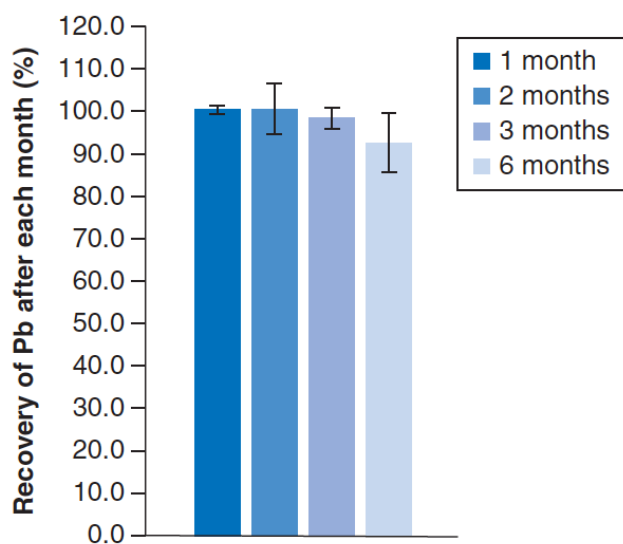


Fig. 2.2 Recovery of Pb (%) at a concentration corresponding to point #4 of the calibration curve (0.25 $\mu\text{mol/L}$) over 6 months

2.3.3.1 Performance evaluation

To further evaluate the performance of the method, a comparison using real blood samples from participants ($n=28$) was conducted. First, venous blood samples were collected via venepuncture into standard 6 mL royal blue top blood collection tubes (BD Vacutainer[®], Dickinson and Company, USA). Meanwhile, blood samples were collected from the patients using Mitra[®] devices based on VAMS technology via a finger prick. The BLL was evaluated for both methods of collection and compared to each other. A Spearman's rank correlation coefficient was used to determine the relationship between the methods of blood collection. By ranking all samples in ascending order for both methods, it is possible to evaluate how a sample's concentration compares among others in both methods. For example, it was important to see if the most concentrated sample using method A was still the most concentrated sample using method B and so on for each sample. It can be seen in

Figure 3, a moderate positive correlation ($R^2 = 0.8941$) between ranked samples using the VAMS method and the venepuncture method, indicating a monotonic relationship. However, when considering the concentrations of the samples, it was determined that on average, samples collected using Mitra[®] devices with VAMS had a 40 % higher BLL ($0.036 \mu\text{mol/L}$) than samples collected via venepuncture. This bias could come from external contamination of fingers, as participants didn't wash their hands prior to collecting blood via finger prick.

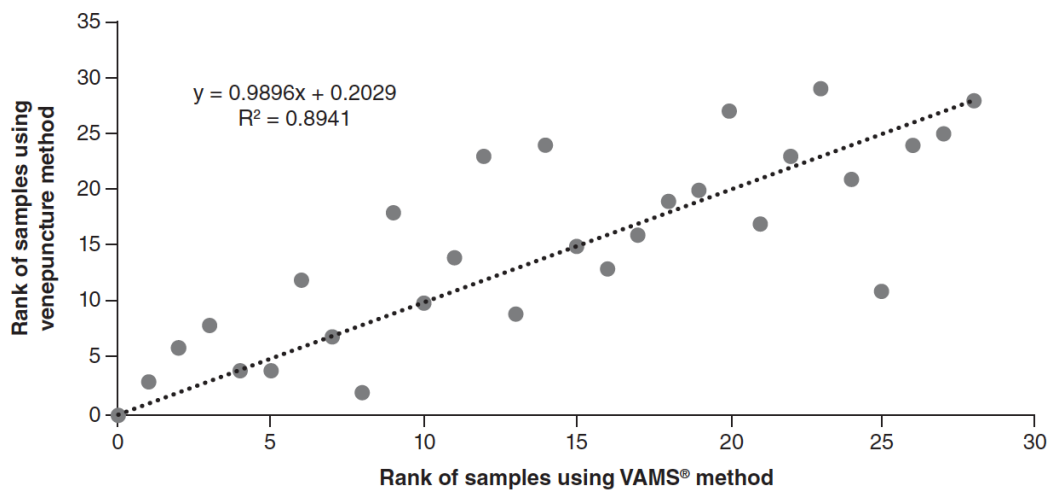


Fig. 2.3 Spearman's rank correlation coefficient by concentration of the two compared methods used for the performance evaluation.

2.3.3.2 Addressing contamination concerns

Considering that low volumes of blood were collected and low levels of BLL were expected, it was hypothesised that a small contamination may adversely impact the analytical result and so as a result, additional tests were performed to address this. Therefore, a second blood collection clinic was conducted with a group of patients (n=28)

and consisted of sampling blood on Mitra[®] devices with VAMS from patients before (A) and after (B) washing their hands. It was determined that on average, samples A were 0.028 $\mu\text{mol/L}$ higher when measuring BLL than samples B which may account for >75 % of the effect observed in the first collection clinic. It can be seen in Figure 4, where hand washing had significant impact on measured BLL. Indeed patients 9 and 21 showed large differences on BLL measured before and after hand washing (0.084 & 0.487 $\mu\text{mol/L}$ respectively). For some patients, sample B had a higher BLL than sample A, but the difference was never major.

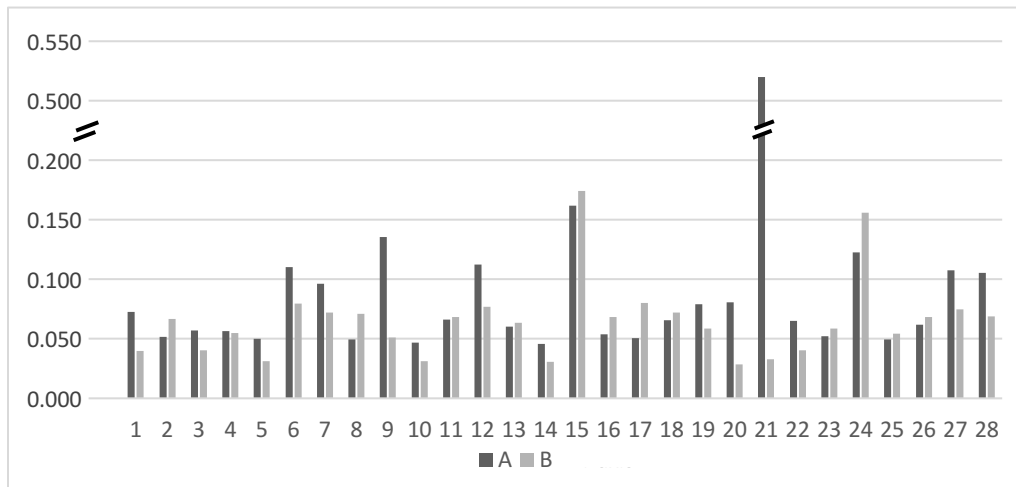


Fig. 2.4 Measured BLL concentrations ($\mu\text{mol/L}$) of all patients before (A) and after (B) hand washing

2.3.4 Discussion

The determination of Pb in complex matrices, such as microsamples of capillary blood collected on Mitra[®] devices with VAMS, can be a challenge. Some polyatomic interferences (ex.: $^{192}\text{Pt}^{16}\text{O}^+$ on ^{208}Pb) can artificially bias on the measured Pb concentration, but the use of ICP-MS/MS has proved to provide interference-free

conditions thanks to its reaction/collision cell and the use of proper collision gas, in this case helium (He). As mentioned previously, many materials can be sources of Pb contamination and Mitra[®] devices with VAMS tips are not exempt from this type of contamination, especially due to their absorptive capabilities. The washing procedure we developed (see section 2.2 Sample collection) was designed to reduce trace elements found on VAMS tips as much as possible in order to improve analytical results. In fact, the results of the study demonstrated the washing procedure minimized VAMS tip contamination, and therefore, in this study did not have significant impact on the measured BLL for this specific sample type. Furthermore, it was found that the use of a matrix match calibration curve using blood collected on VAMS was the best way to reproduce, as much as possible, the data obtained from regular samples. In fact, by testing two types of calibration curves (with and without matrix match calibration) it was determined that matrix match calibration curves resulted in more accurate and reproducible results, compared to the same calibration curve prepared without matrix (H₂O). This also reduced, as much as possible, the Pb contribution coming from the VAMS tip, since it was found in the blank and so was then subtracted from all measured samples. Regarding the use of internal standards (IS), since the goal of this method is to enable at-home and easy sampling, the use of IS directly spiked into VAMS tips is not an option. Instead, adding IS directly into the digestion solution seemed to be the best option to achieve the most reproducible and practical results in a real-life sample collection scenario. As a result, the IS did not experience the same conditions as the analytes of interest, but instead controlled the experiment at the point of extraction onwards (sample digestion). Indeed, due to the volumetric nature of the VAMS devices, plus the almost quantitative extraction efficiency demonstrated in this method, the

need for on-tip IS addition was negated. Therefore, by measuring the signal ratio of analyte compared to IS spiked in the extract, it was thus possible to quantify with precision any digested analyte from the VAMS tips; in that case Pb.

The method was proven to be sensitive and indeed the LoD and LoQ were acceptable on both Agilent 8800 and 8900 instruments. Therefore, when compared to the reference blood Pb range in the Canadian population (0.024 to 0.154 $\mu\text{mol/L}$ [58]), the LoD values on both instruments were under the lower threshold of reference range. Furthermore, according to the World Health Organization (WHO), blood Pb analysis methods range from ~ 0.50 $\mu\text{mol/L}$ for the least sensitive instrumentation such as furnace atomic absorption spectrometry (FAAS), and as low as ~ 0.0050 $\mu\text{mol/L}$ for the best methods using ICP-MS technology [59]. In conclusion, the determined LoD and LoQ using this method were closer to the best reported limits even with the reduced sample volumes employed. However, even though results on a Agilent 8900 were slightly better than on a Agilent 8800, both instruments provided acceptable LoD and LoQ for the type of analysis desired in biomonitoring studies or routine analysis. Finally, results for repeatability were also within acceptable validation parameters for both QC materials on both instruments ($\leq 5.7\%$).

Two major observations were reported for this study. First, repeatability (%) was lower on the Agilent 8900, which means that this instrument provided more reproducible results compared to Agilent 8800. Moreover, repeatability was reported to be lower for the QC with higher blood Pb concentration, which means that both instruments produced more reproducible results for samples with higher concentrations than lower ones. This second observation was because that although the sample volumes for these analyses were low

(~30 μL), all repeatability results for both instruments, either with high or low BLL, were within analytical validation parameters.

Furthermore, matrix effect was evaluated by spiking different real blood samples as mentioned in section 2.4. Even though recoveries pass analytical validation parameters (96.6 % and 103.2 % respectively), it should be noted that the standard deviation was on the upper end of what was acceptable (~14.0 %). It was surmised that this was due to the small volume of analysed samples leading to the impression. As seen with the repeatability experiment, samples with lower blood Pb concentrations were more difficult to quantify with precision, which led to bigger bias contributing to the higher standard deviation. However, it must be noted that, all of these random errors ultimately cancelled each other which then let to the average measured recoveries to be close to 100 %.

For the robustness of the method, all tested parameters demonstrated no major impact (≤ 9.5 %) on the measured Pb concentration on either instrument. We can therefore conclude that the method was not subject to major variation, when one of the tested parameters was slightly modified during sample preparation. Linearity was assessed by comparing 3 replicates of each calibration point to its expected value, as the Agilent software also calculates a determination coefficient (R^2) using each measured point. The measured R^2 on both Agilent 8800 and 8900 (0.9996 and 0.9995) were higher than 0.997. This represented the lowest acceptable R^2 value with respect to the linearity criteria of the CTQ for methods validation. Therefore, the developed method was not only linear for the calibration range going as high as 2.5 $\mu\text{mol/L}$ but the linear range was assessed all the way up to 10 $\mu\text{mol/L}$,

which was the most concentrated point tested. Therefore, it can be concluded that this method was able to quantify blood Pb level for samples far above toxic thresholds (0.48 $\mu\text{mol/L}$ for children [60] and 0.90 $\mu\text{mol/L}$ for adults [52]) without reaching detector saturation and so eliminating the need for diluting high concentration samples. When determining stability of Pb in blood sampled on the VAMS tips and stored at room temperature, it was demonstrated that even after 6 months, Pb can be measured with very high recoveries (>90 %) compared to blood sampled the same day. This negated any need for refrigeration.

Furthermore, when blood samples were collected from participants, the results obtained using Mitra[®] devices based on the VAMS method (when collected properly on clean hands), were not significantly different when compared to the results obtained with routine methods currently used to evaluate BLL at the CTQ. In addition, a Spearman's rank coefficient correlation illustrated that for the most part, patients that had a high BLL using the VAMS method were also the most concentrated using the venepuncture method. But, a perfect correlation ($R^2= 1$) would have suggested that the bias using Mitra[®] devices with VAMS (0.036 $\mu\text{mol/L}$) was constant for all patients and could be subtracted from the VAMS result. However, the results showed that the bias was not constant for all samples, ranging from 0.001 to 0.114 $\mu\text{mol/L}$.

Finally, hand washing helped to reduce any environmental contamination and so the data was found to be similar between blood collected via venepuncture and samples collected on the Mitra[®] devices based on VAMS. The small difference of 0.0080 $\mu\text{mol/L}$ observed,

could be explained by the fact that one method (whole venous blood analysis) used dilution as sample preparation, while the other method used digestion (VAMS method) to extract the blood from the substrate. As a result, slightly greater recoveries could be expected when a sample was digested versus diluted. Indeed, previous observations suggest that digestion allows a better recovery of metals once absorbed on Mitra[®]-VAMS (data not shown here). Therefore, hand washing prior to sampling is crucial to provide better analytical results and thus limiting the impact on the bias seen from the two extraction methods.

2.3.5 Conclusion

In this work, major improvements were made regarding blood Pb level quantification using VAMS technology. It was first demonstrated that VAMS tips were slightly contaminated with Pb. This contamination would have an adverse effect on the measured BLL concentration on monitored patients leading to false positives. In order to solve this, a method for washing VAMS tips, prior to sampling, was developed to decrease the Pb contamination. Following this, a sample preparation protocol based on digestion of blood absorbed onto VAMS tips with nitric acid, was established. This method was found to be straightforward and also significantly reduced reagents usage compared to the traditional workflow due to the low sample input volume. Using ICP-MS/MS technologies such as Agilent 8800 and 8900, an analytical method for Pb quantification was developed and validated according to ISO 17025 guidelines. The ICP-MS/MS technology employed, offered great sensitivity and a fast throughput, enabling analysis of microsamples with high sensitivity and accuracy.

Then, analyte stability at room temperature was proven to be excellent, thus negating the need for cryo-storage and transportation when compared to traditionally collected samples. Moreover, the pilot study using real participants demonstrated the potential of this newly developed method as an alternative approach for blood Pb analysis. Furthermore, efforts regarding simultaneous analysis of multiple traces elements in blood using once again ICP-MS/MS technology will also be investigated in future stages of this research. Many more essential and toxic elements that need to be monitored, especially for newborns, will be added to the method, as they can also have serious effects on physical and mental development of this cohort. However, to further demonstrate the suitability of the VAMS technology for real life applications, more work needs to be done in collaboration with health care systems. Nevertheless, the present results do show that capillary blood sampling approaches, such as VAMS, could have the potential to eventually replace venepuncture as the standard method for Pb blood tests.

Acknowledgements

Authors want to thank Neoteryx – Trajan Scientific and Medical for providing the Mitra[®] devices based on their patented VAMS technology.

Authors would also like to thank Stuart Kushon, chief scientific officer for Trajan Scientific and Medical, for his help throughout this project and for reviewing the present article.

Disclosure

Ethic certificate (#CER-22-286-07.21) for the realisation of research on real participants was provided by the Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR) ethical committee.

Written informed consent was also obtained from the participants of the study.

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to declare. This study was financed by the Centre de Toxicologie du Québec (CTQ), which is part of the Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ).

Summary Points

- Development on ICP-MS/MS of a new blood lead analysis method using Mitra[®]-VAMS
- Validation of the VAMS-based method as per ISO/CEI-17025 guidelines
- Comparison of the VAMS method with routine method used at CTQ
- Assessment of the effect of hand washing when sampling on VAMS
- Acceptable results for all the tested parameters (LoD, LoQ, repeatability, robustness, matrix effect and linearity)
- New method showed similar results when compared to a routine method
- Results overall are promising for the use of Mitra[®]-VAMS as alternative blood sampling approach to venepuncture

CHAPITRE 3

VALIDATION DU DISPOSITIF MITRA VAMS COMME TECHNIQUE DE PRÉLÈVEMENT SANGUIN POUR L'ANALYSE D'ÉLÉMENTS TRACE PAR ICP-MS/MS

Le contenu de ce chapitre est écrit sous la forme d'un article scientifique, en anglais, qui est en cours de publication

La version présentée dans ce mémoire est la version finale envoyée à l'éditeur du journal « Bioanalysis » avant la mise-en-page finale à des fins de publication.

3.1 Contribution des auteurs

Anthony Breton: Analyse des résultats, Expérimentation, Méthodologie, Validation, Recherche bibliographique, Écriture, Révision, Modification

Ciprian Mihai Cirtiu: Conceptualisation, Méthodologie, Validation, Supervision, Écriture, Révision, Modification

Normand Fleury: Ressources, Supervision, Demande de fonds, Écriture, Révision, Modification

Cyril Muehlethaler: Conceptualisation, Supervision, Écriture, Révision, Modification

James Rudge: Ressources, Écriture, Révision, Modification

3.2 Résumé de l'article

Le dosage clinique sanguin des éléments toxiques et essentiels (oligoéléments) est déjà bien établi et le mode de prélèvement demeure la ponction veineuse. Malheureusement, cette méthode présente plusieurs inconvénients et n'est pas adaptée à toutes les situations, spécialement pour la clientèle pédiatrique. Cependant, les dispositifs Mitra[®] VAMS[®] permettent de surmonter plusieurs de ces inconvénients tout en permettant un prélèvement de volume réduit et adapté à la clientèle pédiatrique. Une méthode d'analyse par ICP-MS/MS de spécimens sanguins prélevés à l'aide de VAMS a été développée et validée selon les normes ISO17025. Les éléments ciblés par cette méthode sont : l'aluminium (Al), l'arsenic (As), le cadmium (Cd), le cobalt (Co), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo), le plomb (Pb), le sélénium (Se), l'uranium (U) et le zinc (Zn). Les limites de détection et de quantification, la répétabilité, la robustesse, l'effet de matrice, la linéarité sont les paramètres analytiques évalués pour chacun des éléments. La stabilité a également été évaluée à température pièce jusqu'à un an suivant le prélèvement sur VAMS. La nouvelle méthode a également été comparée à une méthode de référence utilisée en routine au CTQ pour la quantification de ces mêmes éléments dans le sang prélevé par ponction veineuse. La validation et la comparaison avec la méthode de référence n'ont montré aucun biais significatif pour l'analyse de la majorité des éléments ciblés (Cd, Co, Cu, Pb, Se, U et Zn). Les résultats tendent à démontrer que le mercure pourrait être quantifiable avec précision, mais pour des valeurs plus élevées que celles retrouvées chez les participants de l'étude. Pour d'autres éléments (Al, As, Cr, Mn et Mo), les niveaux de contamination des VAMS étaient trop élevés pour pouvoir quantifier avec précision ces éléments.

3.3 Article scientifique

Validation of Mitra VAMS as a blood collection technique for trace element analysis using ICP-MS/MS

Author information :

Anthony Breton^{a,b}, Ciprian Mihai Cirtiu^{a,b}, Cyril Muehlethaler^b, James Rudge^c & Normand Fleury^a

^aInstitut national de santé publique du Québec (INSPQ), Centre de toxicologie du Québec (CTQ), 945 Wolfe, Quebec, Canada

^bUniversité du Québec à Trois-Rivières (UQTR), Department of Chemistry, Biochemistry and Physics, 3351 boul. des Forges, Quebec, Canada

^cTrajan Scientific and Medical, Crownhill Business Center, 14 Vincent Ave, Crownhill, Milton Keynes, UK

Corresponding author e-mail address:

Ciprian-mihai.Cirtiu@inspq.qc.ca (C. M. Cirtiu)

Anthony.Breton@inspq.qc.ca (A. Breton)

Keywords: ICP–MS/MS, Trace elements, volumetric absorptive microsampling VAMS, whole blood, Method development and validation

Abstract

Background: Clinical dosage of toxic and essential elements in blood is well established and the collection method is still performed by venipuncture. The venipuncture method has drawbacks and is not suited for everyone. Volumetric absorptive microsampling (VAMS[®]) has been shown to bring advantages over venipuncture. **Materials & methods:** Using ICP-MS/MS, a method for quantifying elements in dried whole blood sampled on Mitra[®] devices based on VAMS technology was developed/validated. The VAMS method performance was assessed by comparison with liquid whole blood results. **Results:** Validation and performance assessment tests tend to show that most of the targeted elements provide accurate and reproducible results compared to a method of reference. **Conclusion:** Overall, dried blood analysis using VAMS presents good preliminary results to eventually become an alternative to venipuncture for blood sampling for some trace elements analysis purposes.

3.3.1 Introduction

Trace elements play a major role in our health for a variety of reasons: some have essential functions for life, while others are toxic for the human body [4]. Even if trace elements are found in very small amounts in the human body (~0.02 % of the total body weight) they can have serious effects positively or negatively as some of them play significant roles in metabolic functions in particular as active enzymes' centers [4]. Various elements such as chromium (Cr), cobalt (Co), copper (Cu), manganese (Mn), molybdenum (Mo), selenium (Se) and zinc (Zn) are considered essential for life and are known collectively as essential trace elements. For example, Zn, Cu and Cr are crucial for maintaining various metabolic functions such as those found in lipid, protein, and bone metabolisms. Furthermore, Mn is essential for the immune system and Se is involved in antioxidant pathways [4]. However, deficiencies of those elements in the human body can lead to serious adverse effects like anemia, weight loss, disorientation, cardiomyopathy, immunosuppression, as well as psychological symptoms such as depression. In extreme cases, such deficiencies can lead to coma and even death [4]. Conversely, an excess of these elements can lead to acute and chronic disorders such as nausea, vomiting, poisoning, anorexia as well as reduced reproductive function and anemia [4,6].

In addition to the essential elements, which are important for maintaining homeostasis, other elements such as, aluminum (Al) arsenic (As), cadmium (Cd), mercury (Hg), lead (Pb) and uranium (U) are considered toxic even at trace levels [6]. Indeed, exposure to one or more of these elements can alter certain metabolic processes by competing with one or more of the essential elements involved with particular biochemical pathways [6]. There

are many sources of exposure to these elements such as, food (e.g., high concentration of As and Hg in seafood), water, plumbing, and cigarettes, among others. Acute exposure to these elements can have serious adverse effects, especially for young children, affecting mainly the central nervous system, and causing symptoms like nausea, headache, changes in mental state, and eventually death [6, 61].

Therefore, it is important to monitor levels of these essential and toxic elements in the human body as they are crucial for many biological functions, but can also lead to adverse effects with excessive exposure. Monitoring toxic as well as essential elements is even more crucial for pediatric populations, who are often more severely impacted by overexposure to one or more of these elements. Monitoring exposed and vulnerable populations allows for early detection to prevent disease onset, to help confirm disease diagnosis, and to allow for appropriate medical intervention when required. Therefore, it can be appreciated that quantification of essential and toxic elements in whole blood is of primary importance.

Since essential trace elements are found at very low concentrations (ng/L), it is a challenge to diagnose trace elemental deficiencies without using appropriate analytical instrumentation [4]. To evaluate levels of both essential and toxic elements in whole blood, venipuncture is currently the standard sample collection method. However, this technique is not ideal for regular monitoring of patient's blood, especially for pediatrics, due to typical sample collection volumes of 5-10 mL per blood tube. Not only is venipuncture invasive, but repeat blood draws can damage veins over the long term. Routine

venipuncture can also exceed a maximum allowable blood volume limit especially when dealing with pediatric samples [55,62]. Furthermore, venipuncture can be distressing, especially for children. A minimally invasive alternative sample collection method would be welcomed for such cohorts.

Due to the improved sensitivity of analytical technology, it is now possible to measure trace elements from low-volume samples, or microsamples (10-30 μL) [23]. This allows for self or assisted collection of capillary blood, negating the need for phlebotomy. One low-volume technology is volumetric absorptive microsampling (VAMS), a volumetric variation on the dried blood spot (DBS) technique. The Mitra[®] device based on VAMS[®] technology, is a capillary blood microsampling device that features a volumetric polymeric tip of 10, 20 or 30 μL attached to a plastic handle (sampler body) used for the collection of whole blood via a finger or heel prick [44].

Since its first demonstration in 2014 by Spooner and Denniff [26], the Mitra devices based on VAMS has gained increased interest in various scientific fields such as bioanalysis and analytical chemistry, among others [20,22]. This relatively new sampling technique has been proven to be successful for the analysis of various compounds, such as drugs [27] (caffeine, paraxanthine [24]), metabolomics [30-32], nucleic acids [55], perfluorinated and polyfluoroalkyl substances [28-29], amongst others [33-37]. However, there has been a limited number of publications on essential and/or toxic trace elements in whole blood using VAMS [44-46,49,61].

This manuscript discusses a follow-up study to a previous study (2023, Breton et al. [61]), that focused on the development and validation of lead in whole blood. The goal of this research is to improve the knowledge around toxic and essential trace elements analysis in whole blood (Al, As, Cd, Cr, Co, Cu, Hg, Mn, Mo, Pb, Se, U and Zn) using VAMS technology as an alternative sampling procedure. To do so, a method for quantifying toxic and essential elements in whole blood collected on Mitra devices with VAMS tips using ICP-MS/MS technology was developed and validated according to ISO 17025/2017 guidelines [42]. The performance of the method was then evaluated by comparing it to a commonly used method of reference at the Centre de toxicologie du Québec (CTQ) to quantify toxic and essential elements in whole blood collected via venipuncture.

3.3.2 Materials and Methods

3.3.2.1 Chemicals, Stock Solutions and Mitra® VAMS

Omnitrace Ultrapure nitric acid (HNO₃) (Merck, Darmstadt, Germany) of high-purity and ultra-pure water obtained from a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France) were used for digestion and dilution purposes respectively. Multi-analytes calibration curves were prepared using whole blood collected from unexposed and healthy participants (collected by the External Quality Assessment Schemes Department at CTQ) spiked at different concentration. A 5-point calibration curve (C1 to C5) in whole blood was prepared using the spiking solutions (5% v/v spiking solution/blood) containing all the targeted elements at different concentrations (see Table 1). Stock solutions (Inorganic Ventures™, Christianburgs, VA, USA) at 1000 µg/mL (Al, As, Cd, Co, Cr, Hg, Mn, Mo, Pb, Se and U) and 10 000 µg/mL (Cu, Zn) were used to prepare the spiking solutions. Germanium (Ge),

rhodium (Rh), terbium (Tb) and rhenium (Re) stock solutions at 1000 µg/mL (VWR International, Radnor, PA, USA) were diluted in 0.5% (v/v) aqueous solution of nitric acid at 0,4 µg/L and used as internal standard. Mitra[®] microsampling devices with VAMS tips of a nominal volume of 30 µL were supplied by Neoteryx[®] (Trajan Scientific and Medical, Austin, TX, USA). It is important to note that each VAMS lot has its own specific volume of collection (differs generally ≤ 10% of the nominal value). This information can be found on the certificate of conformance provided by the manufacturer.

Table 3.1 Spiked concentration in blank whole blood for all the targeted elements

Element	Units	C1	C2	C3	C4	C5
Al	µmol/L	0.10	0.50	1.0	5.0	10
As	nmol/L	10.00	50.00	100.0	500.0	1000
Cd	nmol/L	4.00	20.0	40.0	200	400
Cr	nmol/L	10.00	50.00	100.0	500.0	1000
Cu	µmol/L	2.00	10.0	20.0	100	200
Hg	nmol/L	4.00	20.0	40.0	200	400
Mn	nmol/L	50.00	250.0	500.0	2500	5000
Mo	nmol/L	20.00	100.0	200.0	1000	2000
Pb	µmol/L	0.0250	0.125	0.250	1.25	2.50
Se	µmol/L	0.10	0.50	1.0	5.0	10
U	nmol/L	0.10	0.50	1.0	5.0	10
Zn	µmol/L	10.00	50.00	100.0	500.0	1000

3.3.2.2 Reduction of VAMS Contamination

It was determined in a previous study (Breton & al. 2023) [61] that some VAMS tips had higher Pb levels than others, therefore providing inconstant analytical biases from one sample to another. Unfortunately, almost all the targeted elements (for this study) were found in unused VAMS tip on Mitra devices, especially Al, Cr, Mn and Mo. This is possibly due to the fabrication and molding processes of the absorptive polymeric VAMS

tips. Therefore, reducing the contamination as much as possible, by adding a washing procedure for the VAMS tip, is even more crucial when analyzing multiple elements. The same washing procedure as the previous study (Breton & al. 2023) [61] was employed for this study. The VAMS tips on the Mitra devices were washed with a 2% HNO₃ aqueous solution using the Mitra 96-Autorack™ provided by Neoteryx® and an Ultrasonic Cleaner (VWR International, Radnor, PA, USA) for 10 minutes for three repeats. Finally, a rinsing step using Milli-Q water in a sonic bath for 10 minutes was added to ensure that no trace of nitric acid that would degrade the polymeric surface over time was left on the VAMS tips.

3.3.2.3 Biological Sample Collection

Before analysis, biological fluids (in this case, whole blood) must be collected with Mitra devices with pre-treated (washed) VAMS tips. Touching the surface of the fluids allows the VAMS tip to collect a precise volume by absorption (~30 µL, depending on the specific lot volume). The samples were then left to dry for a minimum of 2 hours at room temperature before further analytical procedures. Fresh whole blood quality control (QC) samples and calibration curve points were gently mixed for a minimum of 10 minutes by inversion using a Labquake Shaker (Barnstead/ThermoLyne, Ramsey, MN, USA) ensuring a homogeneous distribution of all the elements before being sampled on Mitra devices with VAMS as mentioned above.

3.3.2.4 Analytical Method

Digestion was used to extract the analyte from the matrix (whole blood in this case) by mineralization. The VAMS tips on the Mitra devices were digested with 250 μL of a 50% HNO_3 aqueous solution and 50 μL of internal standard solution (mix of Ge, Rh, Tb and Re standards at 0,4 $\mu\text{g/L}$) in a 4.5 mL metal free plastic tube (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) using a DigiPREP MS digestion block (SCP Science, Baie-d'Urfé, QC, Canada) at 80 °C for 2 hours. After 2 hours of digestion, VAMS tips were removed from the tubes. Digestate was then cooled down and diluted by adding 2080 μL of a 200 ppb of gold (Au) solution in Milli-Q water and 20 μL of ethanol. Adding Au helps stabilizing Hg in aqueous solutions [63]. Adding ethanol, an organic compound, in excess ensures a constant carbon load from one sample to another since it could differ in each blood sample. Also, the addition of an organic compound, such as ethanol, is an effective way to reduce polyatomic interferences coming from argon and chloride anions (Ar^- , Cl^-) while ensuring a constant carbon enhancement effect [64]. The final volume of the samples is 2,400 μL (80-folds dilution from original 30 μL samples).

ICP-MS/MS is the instrument of choice for trace elements analysis as it offers great sensitivity and detection limits (part per trillion) as well as a fast throughput enabling multi-analytes analysis in low volumes of sample. Also, since the plasma torch operates at a temperature around 8000K, it provides high ionization efficiency, resulting in high sensitivity and low detection limits of elemental constituents [65]. It is therefore the most suited technology for elemental analysis of essential and toxic elements, like those targeted in this study. Agilent 8900 (ICP-QQQ, Agilent Technologies, Hichioji, Japan) ICP-MS/MS

instrument with MicroMist nebulizers coupled to double-pass Scott-type spray chambers was used for the development, validation and performance evaluation of the method. The instrument was equipped with two mass filters quadrupoles units (MS/MS mode) and a reaction/collision cell octopole (ORS). 4 different modes using various reaction/collision gazes were used: ammonia (NH₃), hydrogen (H₂), oxygen (O₂), and helium (He) (see Table 2). All 4 modes were optimized to maximize the signal/background ratio by eliminating possible interferences. Operating parameters are shown in Table 10 (see Supplementary Information).

Table 3.2 Tune mode and mass shift from Q1 to Q2 for every targeted element

Element	Mode	Q1 → Q2 masses
Cu	NH ₃	63 → 63
Zn	NH ₃	64 → 64
Al	H ₂	27 → 27
Mn	H ₂	55 → 55
As	H ₂	75 → 75
Mo	H ₂	98 → 98
Cr	O ₂	52 → 68
As	O ₂	75 → 91
Se	O ₂	80 → 96
Cd	O ₂	114 → 114
Hg	He	202 → 202
Pb	He	208 → 208
U	He	238 → 238

3.3.2.5 Analytical Validation

For all tested elements, different analytical parameters were assessed according to ISO 17025/2017 guidelines. Limits of detection (LoD) and quantification (LoQ), repeatability, matrix effect, robustness and linearity range were evaluated for every element through

various tests. LoD and LoQ were defined as 3 and 10 times the standard deviation (SD) of 10 replicates of an analytical blank or low concentrated sample respectively. Repeatability was evaluated by measuring the SD of 10 replicates of a QC sample at two different levels (high and low concentrations) for each element. Matrix effect was assessed by spiking real whole blood samples with point 2 (C2, see Table 1) of the calibration curve, and measuring the recovery of the spiked concentration. Robustness was determined by modifying 4 analytical parameters of the method and measuring their impact on the results. For this study, these included: digestion time, status of VAMS tips (washed vs. unwashed VAMS tips), dilution factor, and brand of nitric acid used for digestion. It was determined that these 4 parameters were the most critical in sample preparation, and so their effect on the quantification of all the targeted elements needed to be evaluated. Linearity range was evaluated by measuring the calibration curve in triplicate. We also tested two other linearity points (C6 & C7), increasing to concentrations as high as 5-times the last calibration point of the curve.

The stability of each element in blood sampled with Mitra devices stored either at room temperature or at 37°C was also evaluated. This test helped to address any concerns of analyte degradation and/or contamination that could occur during storage and transport, and if temperature played a significant role on those effects over time.

3.3.2.6 Study Design for Performance Evaluation and Statistical Tests

Once the method was developed and validated, it was important to evaluate its performance compared to reference analytical methods used in the healthcare system to evaluate both

toxic and essential elements in whole blood. A pilot study was conducted in order to compare analytical methods; whole blood from participants (n=50) was collected both via a finger prick using Mitra[®] devices with VAMS tips and via venipuncture. All the targeted elements that passed the validation step were measured for all participants using both the newly developed method (VAMS-ICP-MS/MS) and a method of reference used at the CTQ. The reference method involves dilution of whole blood (40-folds dilution) as a sample preparation approach and uses an ICP-MS/MS instrument to quantify trace elements. An ethic certificate was provided by the Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR) (#CER-22-286-07.21) in order to proceed to blood collection clinics and testing on real participants. Also, all participants signed an informed consent form.

To statistically evaluate the performance of the method, we quantified every element that passed the validation steps and calculated the difference in concentration on both methods of analysis. The samples were divided into 4 categories based on the LoD and LoQ of the VAMS-ICP-MS/MS method. This helped to determine if the newly developed method gave results which were significantly different from the method of reference or if the results were within an acceptable range and gave similar results. Since the VAMS method was developed for screening and biomonitoring purposes and because of its reduced volumes of collection that lead to higher measure uncertainties, any comparison that had a concentration difference between both methods lower than the validated LoQ was considered acceptable.

For statistical analysis of the data, a Spearman's rank correlation was conducted on all the elements with detection rate over 50% for all our participants. All results lower than the LoD for one of the two methods was considered undetected. Since the participants were all healthy and unexposed to toxic elements, levels of some elements were undetected for the majority of our cohort. Also, we used a Grubbs' test with a two-sided significance level at 0.05 ($p < 0.05$) to eliminate outliers. It is to be noted that outliers could arise due to contaminations coming from the VAMS tip and not because the method is not reliable. Samples were then ranked by increasing concentrations for both methods. Therefore, the Spearman's test helped in correlating the two variables which are, in this case, the measured concentrations for the same sample using both methods. Next, a two-tailed t-Student's test with a significance level of 0.005 ($p < 0.005$) was performed for all the elements to evaluate if the Spearman correlation is significantly different from 0; in other words, if there is a correlation between both methods.

Finally, we calculated the average bias (in total concentration and in percentage) of the VAMS-ICP-MS/MS method over the method of reference for all the elements that were detected in over 50% of our participants. Once again, a Grubbs' test with a two-sided significance level at 0.05 ($p < 0.05$) to eliminate outliers was employed.

3.3.3 Results

3.3.3.1 Reduction of VAMS Contamination

To evaluate the effectiveness of the developed cleaning procedure, VAMS tips on Mitra devices were quantified in triplicate, before and after washing and compared to the reported

normal concentration (reference range) in whole blood. As demonstrated in Table 3, the cleaning procedure proved to be very successful for all the elements except Hg and U. However, although the cleaning procedure helped in reducing levels of Al, Cr and Mo by a significant amount, the concentrations of these elements measured in washed VAMS were still too high compared to the normal concentration in whole blood to be able to validate a method of quantification based on these elements. As a result, during the next stages of the development and validation, Al, Cr and Mo were removed from the method.

Table 3.3 Quantified values of unwashed and washed VAMS compared to the reported normal concentration and toxic thresholds in whole blood for every element

Elements	Units	Unwashed VAMS	Washed VAMS	Reported normal concentration in whole blood	Toxic thresholds
Al	µmol/L	36.4	15.8	0.05 – 0.24 ⁶⁶	N.R.
As*	nmol/L	< 0.001	< 0.001	4 – 54 ⁶⁷	670 ⁸
Cd	nmol/L	< 0.001	< 0.001	0.5 – 7.1 ⁶⁸	180 ⁸
Co	nmol/L	14.6	6.96	2.6 – 6.8 ⁶⁸	N.R.
Cr	nmol/L	965	611	7.0 – 19.0 ⁶⁹	N.R.
Cu	µmol/L	0.40	< 0.001	11 – 19 ⁶⁸	N.R.
Hg	nmol/L	5.76	5.68	0 – 27 ⁵²	250 ⁸
Mn	nmol/L	352	99.1	120 -273 ⁵²	600 ⁵⁸
Mo	nmol/L	111	79.8	4 – 15.6 ⁶⁸	N.R.
Pb	µmol/L	0.0576	0.0096	0.024 – 0.154 ⁵²	Kids : 0.48 ⁶⁰ Adults : 0.9 ⁵²
Se	µmol/L	< 0.001	< 0.001	2.0 – 3.0 ⁶⁸	6.3 ⁷⁰
U	nmol/L	0.160	0.136	0 – 0.084 ⁶⁸	N.R.
Zn	µmol/L	53.3	14.4	75 – 112 ⁶⁸	N.R.

N.R.: Non-reported values

*Note that different lots of VAMS were used during this study. This particular lot did not have any problematic contamination for arsenic. However, in further stages, important contaminations in arsenic were observed.

3.3.3.2 Validation of analytical parameters

LoD, LoQ, repeatability, robustness, matrix effect and linearity range were evaluated as mentioned (in section 2.5 *Analytical Validation*). Results for the LoD and LoQ are shown in Table 4. Repeatability results for both low and high QC materials are shown in Table 5. It should be noted that results with %RSD ≤ 15% were considered acceptable. A robustness

test was performed by modifying 4 analytical parameters of the method over the course of 8 experiments. The robustness shows how the quantification of different elements is affected by the modification of analytical parameters. Robustness results are shown in Table 6. Results for the linearity range of each element and results for the matrix effect of the average recovery (%) and SD of the 6 samples are shown in Table 7. Overall, the validation results for As, Cd, Co, Cu, Hg, Pb, Se, U and Zn are satisfying enough to go through the performance evaluation step. Unfortunately, the analytical validation for Mn yielded unsatisfying results (too variable due to contaminations coming from VAMS tips), therefore, it has been removed from the targeted elements for further stages.

The stability test was performed in triplicate at each specific time (1, 2, 3, 6 and 12 months). Recovery (%) was calculated by dividing the average of the 3 replicates by the expected concentration of calibration point #3 for each element. Stability results are shown in Figure 1. Furthermore, the same stability test was performed at 37°C using a certified QC material for up to 4 months. This test allowed to evaluate to effects of degradation and/or contamination of some elements over time and to ascertain if temperature played a significant role on the recuperation of these elements. Stability results at 37°C are shown in Figure 2.

Table 3.4 Estimated LoD and LoQ of all targeted elements (n=10)

Element	Units	LoD	LoQ
As	nmol/L	4.4	14.6
Cd	nmol/L	1.50	4.99
Co	nmol/L	8.97	29.9
Cu	µmol/L	2.16	7.21
Mn	nmol/L	375	1251
Hg	nmol/L	4.5	15.2
Pb	µmol/L	0.0209	0.0698
Se	µmol/L	0.204	0.680
U	nmol/L	0.140	0.466
Zn	µmol/L	8.62	28.7

Table 3.5 Evaluated repeatability (%) for every element for the low and the high concentrated QC material (n=10)

Element	Units	Low QC		High QC	
		Concentration	%	Concentration	%
As	nmol/L	31.0	4.8	125	3.4
Cd	nmol/L	10.6	7.6	52.1	3.9
Co	nmol/L	18.5	14	67.8	4.4
Cu	µmol/L	14.2	5.0	26.0	5.1
Mn	nmol/L	237	32	471	33
Hg	nmol/L	29.7	5.1	51.0	5.7
Pb	µmol/L	0.0750	14	0.356	4.3
Se	µmol/L	1.86	3.7	4.30	3.2
U	nmol/L	0.125	15	0.677	9.0
Zn	µmol/L	90.3	3.2	127	2.7

Table 3.6 Results of robustness test (%) for all elements after a modification in sample preparation of 4 different analytical parameters (n=8).

Element	Units	QC concentration	Digestion time (%)	VAMS cleanliness (%)	Dilution factor (%)	Brand of nitric acid (%)
As	nmol/L	139	0.0	2.2	-5.1	5.3
Cd	nmol/L	10.6	3.7	7.7	-13	14
Co	nmol/L	67.8	-5.6	1.5	-11	0.64
Cu	µmol/L	26.0	-5.1	-7.9	-4.2	1.7
Mn	nmol/L	237	-69	42	55	-72
Hg	nmol/L	57.5	26	6.2	2.0	-1.3
Pb	µmol/L	0.356	0.0	24	-16	-2.6
Se	µmol/L	4.30	0.80	-4.3	-6.7	-0.80
U	nmol/L	0.403	4.3	4.3	-1.0	1.9
Zn	µmol/L	127	-3.3	-7.4	-5.8	5.1

Table 3.7 Linearity range (n=3) and matrix effect (n=6) results for all targeted elements

Element	Units	Linearity		Matrix effect (%)	
		Range	R^2	Recovery	S.D.
As	nmol/L	20.3-2500	0.998	92.2	5.6
Cd	nmol/L	1.50-2000	0.998	102.2	5.8
Co	nmol/L	8.97-1000	0.998	93.6	9.2
Cu	μ mol/L	2.16-1000	0.998	88.5	9.1
Mn	nmol/L	375-25000	0.999	102.8	36
Hg	nmol/L	2.31-2000	0.998	94.5	12
Pb	μ mol/L	0.0209-12.5	0.999	94.0	11
Se	μ mol/L	0.204-10	0.999	81.2	7.3
U	nmol/L	0.140-50	0.998	96.9	16
Zn	μ mol/L	8.62-3000	0.998	84.9	9.1

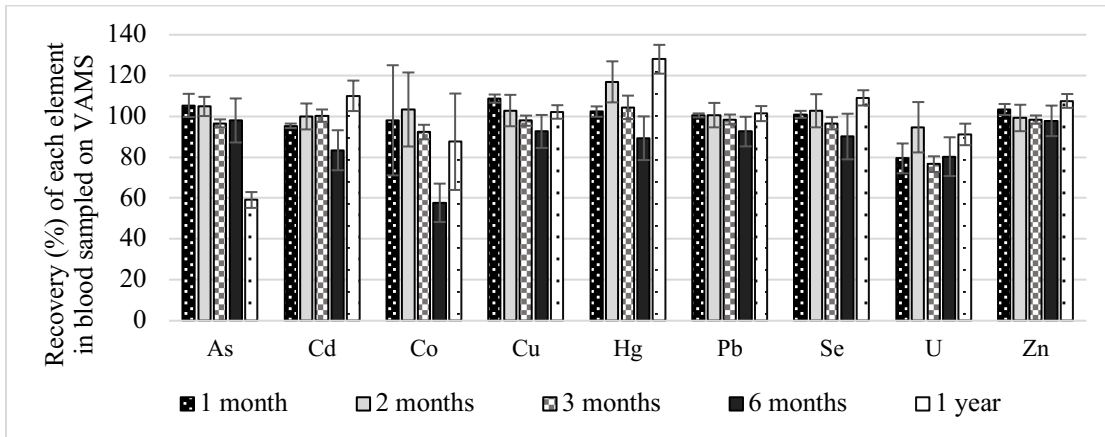


Fig 3.1 Variation in the recovery (n=3) of each element in time in whole blood sampled on VAMS and stored at room temperature.

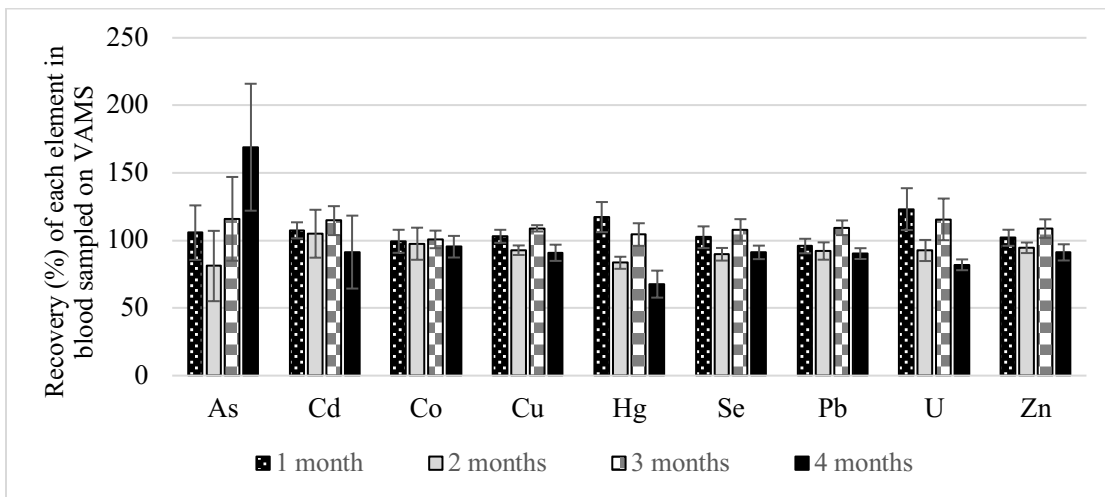
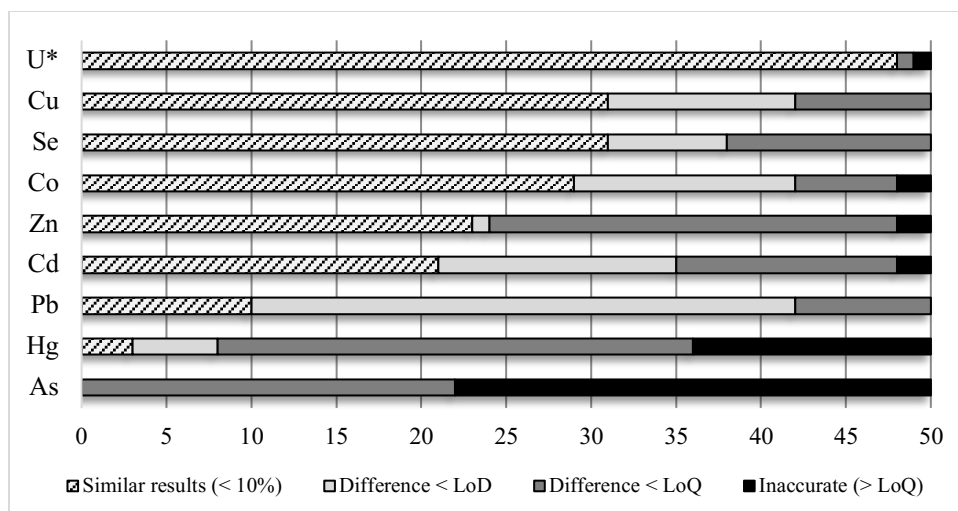


Fig 3.2 Variation in the recovery (n=3) of each element in time in whole blood sampled on VAMS and stored at 37°C.

3.3.3.3 Performance evaluation

To evaluate the performance of the new method, a pilot study (see section 2.6) was performed to quantify each validated element in 50 participants' whole blood. This study consisted of measuring paired samples from both standard venous collection and capillary samples (collected on Mitra VAMS). Whole venous blood from participants was collected into 6 mL collection tubes (BD Vacutainer[®], Franklin Lakes, NJ, USA) via venipuncture. Paired capillary collection was conducted using 2 x 30 μ L VAMS tips and collected via a finger prick (after thorough handwashing to minimize any contamination from the skin). It should be noted that this pilot study was conducted on healthy and unexposed participants. Therefore, low levels of toxic elements were observed (As, Cd, Hg, Pb, U), as expected (see figure 3). Results were divided into 4 different categories based on the difference observed between both methods and the LoD and LoQ of the VAMS-ICP-MS/MS method. The categories are as follows: similar results (difference lower than 10% between both methods), results with difference lower than the LoD, results with difference lower than the LoQ and finally, inaccurate results (difference over the LoQ). Since most of the participants had very low levels of toxic elements in their blood, measuring the difference only by using percentages was not the right approach. In fact, a slight difference at low levels (concentrations) can bring a high relative deviation when calculating the differences in percentages.



*All results for uranium using the method of reference were under the limit of detection

Fig 3.3 Difference of the results (n=50) obtained by comparing the new method to the reference method for each element.

3.3.3.4 Statistical tests

In order to evaluate the comparability of the VAMS-ICP-MS/MS method, a Spearman's rank correlation was conducted. A Spearman's correlation will rank all the samples from the least concentrated to the most concentrated for both methods. One should note that the closer the coefficient is to 1, the stronger the correlation. As, Co, Cd and U had concentrations under the LoD for over 50% of participants, so as a result, statistical analysis was not conducted on these elements. Listed in Table 8 and shown in Figure 4, are the Spearman's correlation coefficients for the six elements with over 50% detection rate.

Table 3.8 Spearman's coefficient, p values and T-stat of all elements detected in > 50% of the samples analyzed

	Arsenic	Copper	Mercury	Lead	Selenium	Zinc
Number of samples* (n=)	45	50	32	47	49	48
Spearman coefficient (r_s)	0.6897	0.8148	0.5554	0.8072	0.8979	0.5606
p value	1.60 ^E -07	5.98 ^E -13	9.69 ^E -04	7.19 ^E -12	2.31 ^E -18	3.42 ^E -05
T-stat	6.246	9.739	3.658	9.175	13.98	4.591
T_{crit}**	2.959	2.943	3.030	2.952	2.946	2.949

*Outliers were excluded using a Grubbs' test with a two-sided significance level of 0.05 ($p < 0.05$)

** T_{crit} was determined using a two-tailed test with a significance level of 0.005 ($p < 0.005$)

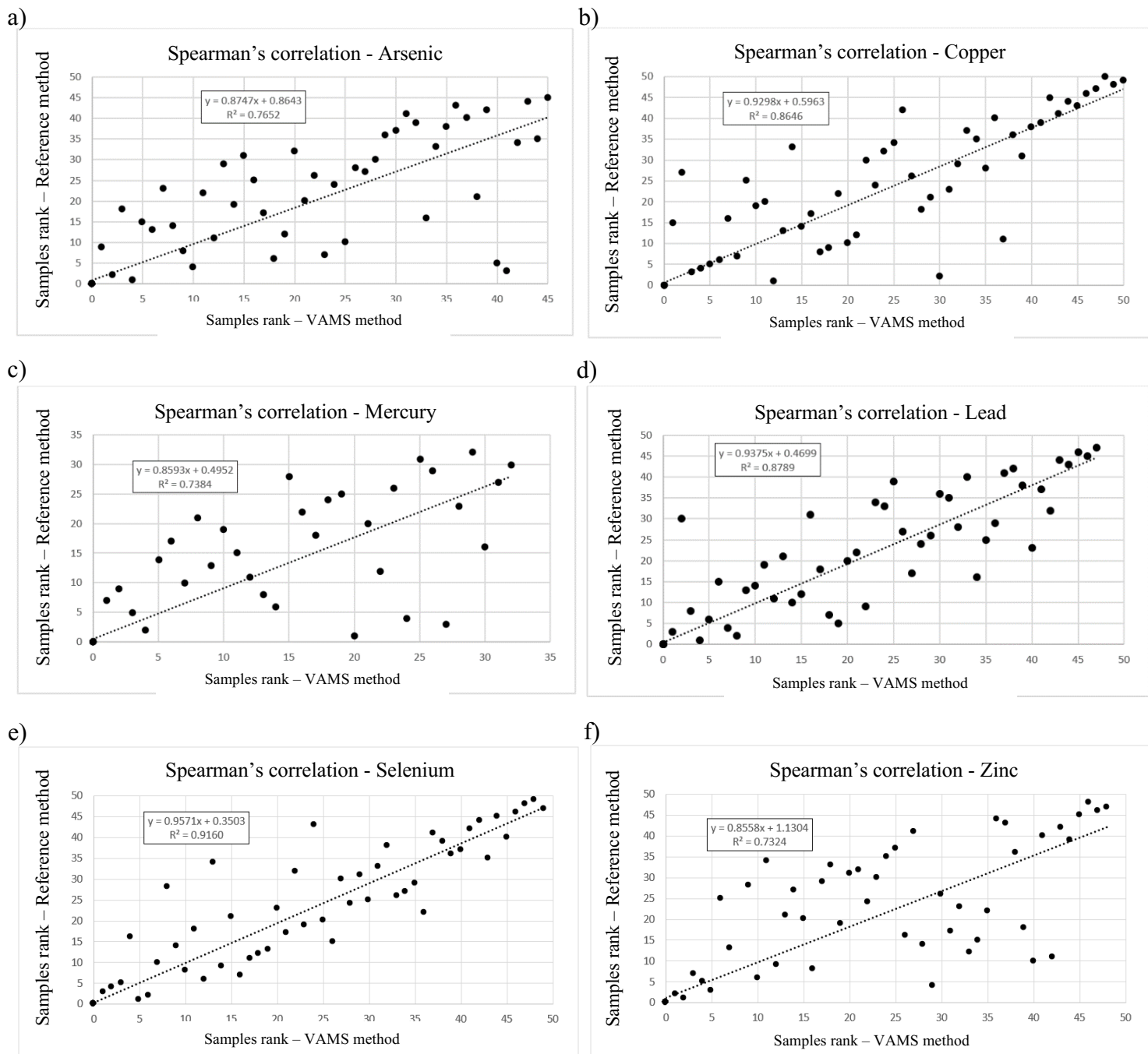


Fig 3.4 Spearman Correlation Coefficient for all the elements with > 50% detection rate.

To further evaluate the similarity or difference between the two methods, we calculated the average bias of the VAMS-ICP-MS/MS method compared to the method of reference. Table 9 lists the average biases from matching pairs. It is worth noting that for As and Hg, levels in whole blood of these toxic metals were detectable for the most part. However only 3 participants had levels higher than the LoQ.

Table 3.9 Average bias in concentration and relative percentage for elements with matching pairs > 50%

	Average bias	(%)	Matching pairs (n)*	Outliers excluded**
As	86 nmol/L	146	46/50	1
Cu	-1,2 µmol/L	-8,5	49/50	1
Hg	7,4 nmol/L	73	32/50	1
Pb	0,014 µmol/L	39	47/50	2
Se	-0,12 µmol/L	-5,9	50/50	0
Zn	0,33 µmol/L	0,046	49/50	1

*Number of matching pairs equals detectable samples for both methods minus outliers

**Outliers were determined using a Grubbs' test with a two-sided significance level of 0.05 ($p < 0.05$)

3.3.4 Discussion

Quantification of various toxic and essential elements in very small volumes of a complex matrix, like whole blood, can be a challenge for many reasons. Most of the issues are related to contamination (environmental as well as residual metals on the VAMS tips of the Mitra devices) but also polyatomic and isobaric interferences play a part during ICP-MS/MS analysis. Firstly, interferences can artificially bias the quantification of many targeted trace elements such as ^{59}Co (e.g. $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, $^{24}\text{Mg}^{35}\text{Cl}^+$), ^{55}Mn (e.g. $^{37}\text{Cl}^{18}\text{O}^+$, $^{38}\text{Ar}^{17}\text{O}^+$) or ^{80}Se (e.g. $^{40}\text{Ar}_2^+$), just to name a few [71]. The use of both ICP-MS/MS mass filters and its reaction/collision cell help to, in part, minimize these interferences coming from the environment and from the biological matrix itself [72] (e.g., O_2 , Ca, Mg that are

largely present in whole blood) or from the instrumentation (e.g., argon gas used to generate the plasma source that ionizes the elements).

As for contamination coming from the VAMS tips on Mitra devices, results shown in section 3.1 (*Reduction of VAMS Contamination*) tended to show that washing the VAMS tips prior to sampling reduces the contamination for the majority of the elements by a significant amount. However, for some elements (Al, Cr and Mo), the contamination coming from the VAMS tips was still too high to be able to quantify with precision and accuracy. In addition, since we were working with reduced volumes (30 μ L), interference and contamination effects are exponentially higher compared to traditional venipuncture methods using bigger matrix volumes. However, using a matrix match calibration curve (whole blood) sampled with VAMS was the best way to replicate real samples and eliminate, as much as possible, the effect of contamination coming from the VAMS tips and interference coming from the matrix.

Firstly, when comparing LoD and LoQ values (Table 4), to the reported normal concentrations and toxic thresholds in whole blood (Table 3), it can be seen that the measured limits were lower than the normal values in whole blood for the majority of the elements tested. However, for Co, Hg, Mn and U, the measured LoD were at the higher end of the normal concentration in whole blood. Therefore, for these elements, VAMS could only be used to evaluate if a patient was heavily exposed. Since these values would be higher than normal values in whole blood, it would be possible to evaluate potentially exposed patients for screening purposes, even if the overall LoD and LoQ are higher using

the VAMS-ICP-MS/MS method. On the other hand, for essential elements with higher concentrations in whole blood such as Cu, Se or Zn, dried blood microsampling using Mitra devices with VAMS could be a useful alternative to venipuncture for screening purposes to quickly evaluate normal values in whole blood as well as deficiencies or excess exposure in populations.

For repeatability, it can be seen in Table 5 that all the elements are considered acceptable, except Mn for both low and high QC concentrations. The reason for this appeared to be that the VAMS tips were too highly contaminated in Mn. It can also be explained by the fact that the QC samples had Mn concentrations which were lower than the established LoD. It therefore made sense, when considering concentrations under the LoD are reported with greater measurement uncertainties than samples with detected concentrations. Otherwise, results tended to show a better repeatability at higher concentrations for almost all of the elements.

For the robustness test, once again, the most problematic element was Mn, as all the modified parameters had an impact >15% of the measured concentration. It was concluded that this data could not fully be attributed only to the modified parameters because of how much variation there was between each replicate for this element. Indeed, the quantification of Mn was difficult because of the inconstant contamination found on the Mitra devices, even after washing the VAMS tips. This was in accordance with other results. For almost all the other elements, the cleanliness of the VAMS tips was the parameter that most affected the results, reinforcing once again the importance of washing

the VAMS tips before sampling. A focus on further optimizing the VAMS tip washing procedure would be a consideration for future investigation to attempt address this issue.

For linearity, the ranges listed in Table 7 represent the domain on which $r > 0.997$ (or up to 5-times higher than our regular calibration curve (see Table 1)). The validated method was found to be linear for all the elements across several orders of magnitude covering both the LoD thought high toxic thresholds and which had been previously observed [8,52,58,60,66-70].

For the matrix effect, every element seems to be within the acceptable range for validation. However, it should be noted that the SD for Mn was elevated (36.2%), this meant that there was a large difference observed between all the recovery results for the 6 samples analyzed. The Mn recovery values canceled each other to arrive at 102.8%. Indeed, the parameter was considered not validated because of the high measurement uncertainty and variation between each measurement. Fortunately, all other elements gave acceptable results for the matrix effect.

Since manganese was too problematic and analytical validation of this element yielded poor results, this element was also eliminated from the method before the stability test and performance evaluation.

For stability, most of the elements (As, Cd, Cu, Hg, Pb, Se and Zn) were shown to be very stable for a minimum of three months post sampling, some of them even for six months to

one year. In fact, for these elements, the observed variation over time was roughly the same variation observed in the repeatability test ($\geq 15\%$) which suggests that time did not play a significant role on recovery and that these elements were stable under the conditions tested. Uranium showed slightly lower recoveries ($\sim 80\%$) but gave similar results and was stable at different timepoints. Moreover, very good stability once again was observed for the majority of the elements for the whole duration of the test (4 months) at 37°C . In fact, Cd, Co, Cu, Se, Pb and Zn showed excellent recoveries, even after 4 months post-sampling, which suggested that there was no contamination or degradation effect over time for these elements, even at a higher temperature.

Arsenic tended to show an increase in recovery over time, which suggests incremental contamination. The reason behind this contamination is unclear but our hypothesis is that the plastic 96 well-plate in which the Mitra devices are stored increases the levels of arsenic in the VAMS tips over time, and that this effect is amplified at higher temperatures. This hypothesis is based on the fact that trace elements are still found nowadays in plastics and especially recycled plastics [73]. As for Hg and U, we saw a small decrease in measured concentrations over time at 37°C . The goal behind this test was not necessarily to analyze samples one-year post sampling. However, the results tended to show that if there was a future need, accurate quantification could still be achieved after a reasonable amount of time (< 4 months) after the sample was collected even if the samples were stored at a higher temperature.

For the performance evaluation, for Hg and As, the comparison tended to show that results between both methods were inaccurate, since 48% of the results had a difference over the limit of quantification. However, even when considering those two elements, 89.1% of the results for all the elements gave results that had a difference with the reference method lower than our LoQ and therefore could be qualified as acceptable and accurate for screening purposes only. However, when we excluded As and Hg, which are more difficult to accurately quantify in unexposed populations (where levels would be expected to be very low indeed), the results with difference \leq LoQ went up to 98.0% (for Cd, Co, Cu, Pb, Se, U, Zn).

The Spearman's rank correlation showed significant results for the six elements with detection rate over 50% (As, Co, Hg, Pb, Se and Zn). In fact, all measured T-statistic values were over the critical t-value and all compared analytes were statistically significant ($p < 0.005$). Therefore, based on the Spearman's test, there was a significant monotonic correlation between the concentration measured by both methods for arsenic, copper, mercury, selenium, lead and zinc.

In addition, when evaluating the average biases of the VAMS-ICP-MS/MS method compared to the reference method, we can conclude that for Cu, Pb, Se and Zn, the difference was lower than our limit of detection and thus was negligible. On the other hand, Hg and As presented higher average biases (73% and 146% respectively) for all the detected samples. However, there were only 3/50 samples for these two elements where concentration was higher than our LoQ which may have explained this bias. It can be

expected that a new study with heavily exposed participants would give better results and lower average biases.

The results shown with the validation tests, the performance evaluation and the statistical tests suggest that VAMS dried blood microsampling could become an alternative to venipuncture for screening toxic and essential elements in whole blood. For some elements (Cd, Co, Cu, Pb, Se, U and Zn) we saw a difference lower than our limit of quantification in the vast majority of the analyzed samples even in very low to undetectable concentrations. Unfortunately, we were unable to apply significant statistical tests on Cd, Co and U results because they were undetected for the majority of the participants. For As and Hg, since the volunteers were healthy and unexposed to toxic elements, the performance evaluation did not show significant results. The difference in Hg measured concentration between the two methods could be explained by contamination of the environment and/or memory effect of the instrument during analysis as previously raised. More work needs to be done regarding this hypothesis to try to enable more accurate results for Hg screening in the future.

In general, it was demonstrated that Cd, Co, Cu, Pb, Se, U and Zn showed excellent results compared to the reference method. Therefore, VAMS finger prick microsampling could become a reliable alternative to venipuncture for screening, biomonitoring studies or regular medical follow-up for the quantification of these 7 elements.

3.3.5 Conclusion

The Mitra device based on VAMS microsampling technology for the analysis of metals was discussed in detail in this paper. This relatively new sampling device could bring significant advantages over classic venipuncture, especially when it comes to reducing the volume of blood collection needed for analysis. This targeted study, on trace elements analysis of whole blood sampled using Mitra with VAMS, helped to further the knowledge around this sampling method.

Coupling VAMS extracts with ICP-MS/MS analytical technology allows the simultaneous analysis of multiple elements whilst also simultaneously significantly reducing the consumption of reagents (only 2.4 mL of sample per analysis) compared to traditional methods of blood analysis (~ 10 mL) due to low sample input volumes. The use of both mass filters helped to eliminate isobaric and polyatomic interferences coming from the matrix (whole blood) and the environment (mostly from VAMS tips on Mitra devices) to allow for better analytical results.

A washing procedure that helped to lower the contamination found in VAMS tips without affecting their volume of collection was developed, which is crucial to enable good analytical results. This washing procedure could be used by the manufacturer to provide metal-free Mitra devices with uncontaminated VAMS tips specifically built for trace element analysis. However, at the moment, some elements like Al, Cr, Mn and Mo are very difficult to quantify using Mitra devices mainly due to the observed contamination of the VAMS tips, even after washing.

For the validation of the VAMS-ICP-MS/MS method and the tested parameters, results tended to show that all of the elements responded well to whole blood analysis using Mitra with VAMS, except for Mn that was discarded before the performance evaluation stage.

Furthermore, the stability test was very promising for many elements. This finding negates the need for expensive cryo-storage and transport of dried blood samples due to the stability of the trace elements in this matrix which is also more economic and greener compared to traditional approaches. It also shows that accurate and reproducible results can still be obtained when analyzing Mitra devices even after a reasonable amount of time (~ 4 months) once the sample collection occurred.

Performance evaluation showed great results. Indeed 98.0% of the compared samples had a difference \leq LoQ for Cd, Co, Cu, Pb, Se & Zn, demonstrating that we can obtain similar results in the vast majority of cases by using Mitra-VAMS microsampling instead of venipuncture.

In conclusion, finger prick microsampling with Mitra devices based on VAMS could become a reliable alternative to venipuncture in the near future especially in screening of some toxic and essential elements such as As, Cd, Co, Cu, Hg, Pb, Se, U and Zn in all age groups, including newborns and premature babies. The suitability of using Mitra devices with VAMS technology for screening both toxic and essential elements could be further improved by testing other trace elements, metals and inorganic compounds. More work

could be done to further improve results of elements like As and Hg that yielded good results for the validation but not in the performance evaluation. Indeed, the greater the number of studies on Mitra devices with VAMS, the greater the number of real-life applications will be demonstrated using this small device that has many advantages over traditional venipuncture. Nevertheless, the present study is a big step towards the implementation of Mitra microsampling devices with VAMS in our everyday life.

Acknowledgments

The authors thank Neoteryx – Trajan Scientific and Medical for providing the Mitra[®] devices based on their patented VAMStechnology.

Financial & competing interests disclosure

This study was financed by the Centre de Toxicologie du Québec (CTQ), which is part of the Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed. No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

Ethics certificate (no. CER-22-286-07.21) for the realization of research on real participants was provided by the Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR) ethical committee. Written informed consent was also obtained from the participants of the study.

CrediT roles:

Anthony Breton: Formal Analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing – Original Draft, Visualization **Ciprian Mihai Cirtiu:** Conceptualization, Methodology, Validation, Supervision, Writing – Original Draft, Visualization, Writing – Review & Editing **Cyril Muehlethaler:** Conceptualization, Supervision, Writing – Review & Editing **James Rudge:** Resources, Writing – Review & Editing **Normand Fleury:** Resources, Supervision, Funding Acquisition, Writing – Review & Editing

Summary Points:

- Development on ICP-MS/MS of a new analysis method using VAMS for toxic and essential elements in blood
- Validation of the VAMS-based method as per ISO/CEI-17025 guidelines
- Comparison of the VAMS method with routine method used at CTQ
- Statistical evaluation of the results compared to the method of reference

Supplementary Information:

Table 3.10 Operating parameters of the Agilent 8900 ICP-MS/MS instrument

« Acq Mode » :	Spectrum
« Q2 Peak Pattern » :	1 point
« Replicate » :	4
« Sweeps/Replicates » :	15
« Scan Type » :	MS/MS
« Weight » :	«1/x »
« Origin » :	« Ignore »
« Curve Fit » :	« Linear »
« Calibration method » :	« Standard Addition »
« Nebulizer Pump » :	0,25 rps
« S/C Temp » :	4 °C
« Makeup Gas » :	0,20 L/min
« Nebulizer Gas » :	0,90 L/min
« Option Gas » :	0,0 %
« Plasma Gas »:	15,0 L/min
« Auxiliary Gas »:	0,9 L/min

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 Retour sur les problématiques

Tel que mentionné à la section 1.2.1 du présent mémoire, la ponction veineuse demeure la méthode de choix pour quasiment tous types de prélèvements sanguins. Par contre, son aspect invasif et son volume de prélèvement important (5-10 mL) font en sorte que des méthodes alternatives pourraient être plus souvent utilisées, spécialement chez la clientèle pédiatrique et périnatale. Une alternative possible serait d'utiliser les prélèvements à l'aide de papiers buvards (DBS – *Dried blood spot*) qui sont déjà vastement utilisés pour les prélèvements chez la clientèle pédiatrique. Cependant, certaines études ont rapporté des difficultés au niveau de la reproductibilité des prélèvements en raison des effets d'hématocrite et de dispersion inégale du sang sur le papier (tel que mentionné à la section 1.2.2). Heureusement, les dispositifs Mitra[®] VAMS de la compagnie Neoteryx/Trajan Scientific and Medical, permettent un prélèvement réduit, précis et moins invasif effectué au niveau du talon ou au bout d'un doigt.

Ainsi, grâce à la technologie ICP-MS/MS des systèmes Agilent (modèles 8800 et 8900), il a été possible de développer, de valider et d'évaluer la performance de deux méthodes analytiques. Ces deux méthodes sont originales et uniques à l'INSPQ et servent à l'analyse du plomb sanguin (méthode décrite dans le 1^{er} article) et à l'analyse simultanée d'un panel d'éléments toxiques et essentiels dans le sang (méthode décrite dans le 2^e article). Ces deux

méthodes sont basées sur l'analyse de spécimens sanguins prélevés à l'aide des dispositifs Mitra® VAMS. Ce sont les deux premières et seules méthodes d'analyses développées et validées à l'INSPQ qui font usage des prélèvements VAMS. L'INSPQ et le CTQ se dotent donc de deux nouvelles méthodes d'analyses pouvant être utilisées dans le réseau hospitalier au Québec et au Canada pour l'analyse de différents métaux toxiques et essentiels, soit pour du dépistage néonatal ou pour des études de biosurveillance.

Ce projet de maîtrise a également permis de tester de manière exhaustive 12 éléments trace qui n'avaient pas ou très peu été étudiés par prélèvements VAMS jusqu'ici. D'ailleurs, le présent projet a permis de publier un nouvel article scientifique en lien avec l'analyse de métaux dans le sang prélevé à l'aide de VAMS ainsi qu'un deuxième en cours de publication. Ces 2 articles scientifiques permettent de combler en partie le manque de connaissance sur cet aspect de l'analyse de spécimens sanguins prélevés sur VAMS. D'ailleurs, les résultats de ces études tendent à démontrer qu'une méthode d'analyse du sang prélevé sur VAMS pour le cadmium, le cobalt, le cuivre, le plomb, le sélénium, l'uranium et le zinc pourrait devenir une alternative envisageable au prélèvement par ponction veineuse. Bien que cette nouvelle méthode ne permette pas de mesurer des niveaux normaux dans le sang pour certains éléments comme le cobalt et l'uranium en raison des limites de détection élevées, elle pourrait tout de même être utile pour détecter de fortes expositions à ces éléments qui pourraient être toxiques. L'analyse de l'arsenic et du mercure semble présenter de bons résultats pour la validation. Cependant, lors de l'évaluation de la performance de la méthode à l'aide de prélèvements sanguins, la comparaison de la méthode sur VAMS semblait présenter un biais par rapport à la méthode

de référence pour ces deux éléments. Étant donné que les participants à l'étude étaient en santé et non exposés à des sources de métaux toxiques, leurs niveaux d'arsenic et de mercure sanguin étaient très faibles. Il serait donc intéressant de comparer la méthode VAMS avec une méthode de référence sur une population dont les niveaux sanguins pour ces éléments sont plus élevés. Également, selon Koutsimpani et al. [49], qui ont obtenus d'excellents résultats dans leur étude, la quantification précise et exacte du mercure sanguin serait possible à l'aide de VAMS. Contrairement à ce projet, leur équipe a développé une méthode spécifique pour l'analyse du mercure sanguin, ce qui pourrait expliquer les meilleurs résultats obtenus. Cependant, toujours selon cette même étude, il est possible d'observer une augmentation des niveaux de mercure mesurés dans les VAMS lorsque ceux-ci sont entreposés dans les sacs de transports fournis par la compagnie Neoteryx/Trajan Scientific and Medical et ce, même après quelques semaines. Il serait intéressant de comparer les taux de mercure sanguins mesurés directement après le prélèvement sur VAMS par rapport aux mêmes spécimens sanguins, mais entreposés 1-2 semaines dans ces sacs de transports.

Par ailleurs, pour l'aluminium, le chrome, le manganèse et le molybdène, les niveaux de contamination dans les VAMS étaient trop élevés et variables pour pouvoir quantifier ces éléments avec précision et exactitude, que ce soit avec des matériaux de référence (QC) ou des prélèvements sanguins. Pour l'instant, les procédures de fabrication et de moulage ainsi que la matière brute utilisée pour les embouts polymériques VAMS induisent des niveaux de contamination pour ces éléments trace qui sont trop élevés.

Pour la compagnie Neoteryx/Trajan Scientific and Medical, ce projet permet d'étudier un panel d'éléments jusqu'ici très peu ou aucunement testés pour leur dispositif Mitra® VAMS. Pour eux, les résultats démontrés dans ces deux articles permettent de faire un grand pas vers une implantation des VAMS comme méthode de prélèvement traditionnelle, que ce soit pour des examens de routine, des dépistages néonataux ou encore des études de biosurveillance. Les difficultés rencontrées avec certains éléments au cours du projet, notamment la contamination, permettent aussi à Neoteryx/Trajan Scientific and Medical de se pencher sur ces problématiques et de développer des méthodes de fabrication et/ou de moulage des embouts polymériques qui soient exemptes d'éléments trace. Des matières premières non-recyclées et exemptes d'éléments trace pourraient également être utilisées pour la fabrication de l'embout polymérique.

4.2 Limitations

Les dispositifs de microprélèvements Mitra® VAMS présentent cependant quelques inconvénients. Tout d'abord, il n'existe présentement qu'un seul fournisseur d'embouts polymériques absorbants de type VAMS (*volumetric absorptive microsampling*) et il s'agit de la compagnie Neoteryx/Trajan Scientific and Medical. Il n'y a donc aucune possibilité pour le moment de se tourner vers un autre fournisseur pour commander des embouts de prélèvements basés sur le principe VAMS.

De plus, comme mentionné dans les deux articles et à la section 4.1, les embouts polymériques présentent des traces de contamination pour plusieurs éléments. Il y a donc certaines limitations quant aux éléments qu'il est possible de quantifier à l'aide de VAMS

pour l'instant. Les résultats et les problématiques rencontrés au cours du présent projet de maîtrise pourraient obliger Neoteryx/Trajan Scientific à se doter d'une gamme de matériaux moins contaminés qui pourraient servir à fabriquer des embouts polymériques utilisés spécialement pour l'analyse d'éléments trace (style *metal-free*).

Présentement, le prix pour un seul embout polymérique VAMS est d'environ 5 dollars canadiens. Évidemment, lorsqu'on prend en compte les différents avantages reliés aux prélèvements par VAMS (aucun personnel qualifié nécessaire, transport et entreposage à température pièce, prélèvement directement à la maison), le coût unitaire est justifiable. D'ailleurs, dans le tableau 1, il est possible de constater que la différence de coûts entre les deux méthodes de prélèvement (VAMS vs ponction veineuse) provient essentiellement du support lui-même (VAMS vs tube de prélèvement). Il n'a pas été possible de recueillir certaines données quant aux coûts associés aux prélèvements par ponction veineuse notamment, le personnel médical nécessaire au prélèvement ainsi que le transport et l'entreposage réfrigérés. De plus, certains facteurs humains comme le stress associé au prélèvement par ponction veineuse ainsi que le temps nécessaire pour avoir un rendez-vous dans un centre et effectuer le prélèvement doivent également être pris en compte.

Par contre, il est vrai que dans un contexte de recherche où plusieurs centaines d'embouts peuvent être nécessaires, le prix unitaire peut devenir un enjeu, ce qui limite ultimement le nombre de recherches pouvant être réalisées en utilisant les VAMS. D'autre part, plus l'applicabilité des VAMS est démontrée, plus la demande des réseaux hospitaliers sera grande, plus le nombre d'embouts produits sera grand et plus le prix unitaire risque de diminuer.

Tableau 4.1 Estimation des coûts pour une séquence de 75 échantillons entre les deux méthodes de prélèvement.

	Prélèvement VAMS (CAD\$)	Prélèvement sanguin (CAD\$)
Support de prélèvement	4,45	0,69
Consommables par échantillon	0,49	0,47
Total par séquence (75 échantillons)	704,25	87,00

Par la suite, étant donné la nature des embouts VAMS (volume réduit, analyse de l'embout en entier), il n'y a pas de possibilité de réanalyse pour un même embout. Il n'est pas non plus possible de faire de duplicata sur un même embout étant donné qu'il est digéré en entier dans l'acide nitrique. Il arrive parfois, pour des raisons variées (problème d'instrumentation, erreur dans la préparation d'un échantillon, valeur anormalement élevée ou basse) que des reprises d'analyses soient nécessaires. Il est donc recommandé de prélever 2 à 4 embouts de 30 µL ce qui permet de procéder à des réanalyses ou encore à d'autres tests. Parlant d'autres tests, on ne peut faire qu'une seule analyse par embout polymérique prélevé, c'est-à-dire que si l'on veut procéder à l'analyse des éléments trace et à l'analyse des PFAS, par exemple, il faudra au minimum prélever 2 embouts pour le même patients (voire même 4 embouts si l'on veut être en mesure de faire des réanalyses).

Finalement, les résultats présentés dans les deux articles tendent à démontrer que la qualité de l'analyse des méthodes développées est moindre que pour les méthodes de référence. En effet, à cause des volumes réduits de prélèvement et de la contamination des VAMS pour certains éléments, l'incertitude sur les résultats est plus grande que pour les méthodes de références (i.e. moins bonne répétabilité). Conséquemment, les limites de détection sont également plus élevées pour les deux méthodes développées que pour les méthodes de référence. Cependant, pour la majorité des éléments testés (cadmium, cobalt, cuivre,

plomb, sélénium, uranium et zinc), la qualité des résultats est suffisante pour être capable de réaliser des dépistages rapides et des études de biosurveillance. Dans ces cas spécifiques, une analyse très exacte des taux de différents éléments dans le sang n'est pas nécessaire. Par contre, les méthodes développées sont en mesure de donner un ordre de grandeur assez précis au niveau de la quantification des métaux pour savoir si un patient présente une carence, est dans les valeurs normales ou présente des taux potentiellement toxiques pour sa santé.

4.3 Perspectives

Plusieurs recherches futures découlent déjà directement des résultats de ce projet de maîtrise. Tout d'abord, l'organisme mondial UNICEF a découvert en 2018, lors d'une étude en Géorgie (*Multiple Indicator Cluster Survey - MICS 2018* [74]), qu'une très grande proportion des enfants de ce pays sont fortement exposés au plomb. Afin de permettre un suivi rapide chez ces enfants, UNICEF cherchait un laboratoire capable de faire des analyses des taux de plombémie (taux de plomb sanguin) chez les enfants. Le CTQ a donc proposé de développer une méthode spécifique pour l'analyse du plomb sanguin à l'aide des dispositifs de microprélèvements Mitra® VAMS. C'est donc pour cette raison qu'une méthode d'analyse du plomb sanguin (article #1) a été développée et validée. Cette méthode sera donc utilisée en début d'automne 2023 pour l'analyse de la plombémie d'environ 2000 enfants par année en Géorgie dans le cadre d'une étude de biosurveillance (programme G-Less). Le but de cette étude de biosurveillance est d'identifier quelles zones du pays sont plus touchées, d'identifier quels enfants sont à risque en mesurant leur niveau de plomb sanguin, de tenter d'identifier les sources de contaminations possibles à l'aide de

l'analyse des ratios isotopiques de plomb et de réduire et/ou éliminer ces sources d'exposition. Les prélèvements sur VAMS vont permettre un prélèvement à très grande échelle qui est réduit, simplifié et moins invasif. L'efficacité de la méthode sera donc mise à l'épreuve à vaste échelle dès l'automne 2023.

Autre projet à grande échelle qui pourrait se réaliser prochainement, est l'étude FEHNCY (*Food, Environnement, Health and Nutrition of First Nations Children and Youth*) à l'automne 2023 également. Cette étude canadienne vise à analyser la nutrition, la santé et l'environnement des jeunes membres des premières nations de 3 à 19 ans. Les prélèvements sur VAMS pourraient être grandement utiles pour les enfants en bas âge. Les VAMS permettraient d'attirer un plus grand nombre de participants et donc d'obtenir beaucoup plus de données de référence. Une fois de plus, l'efficacité de ce dispositif de microprélèvement pourrait être mis à l'épreuve à vaste échelle pour l'analyse d'éléments trace, mais également de différents contaminants environnementaux (ex. PFAS) si d'autres méthodes venaient à être développées au CTQ.

Parlant d'autres méthodes d'analyses, il serait intéressant d'évaluer d'autres éléments dans le sang ou même d'autres matrices biologiques. Un panel de 12 éléments a été évalué de manière exhaustive, mais il en reste encore plusieurs autres (ex. titane, vanadium, fer, nickel, argent, étain, or, etc.) pour voir si l'analyse sur VAMS présenteraient des résultats significatifs. Également, il existe une multitude de composés qui sont analysés à partir de spécimens sanguins (albumine, anticorps, ADN, cholestérol, créatinine, protéomique, métabolomique, etc.) qui pourraient être évalués dans le sang prélevé sur supports absorbants VAMS. Les VAMS peuvent également être utilisés pour différentes matrices

biologiques comme l'urine et la salive. Il serait donc possible d'évaluer ces matrices et de voir quel serait le potentiel d'analyse de ces matrices prélevées à l'aide de VAMS que ce soit pour l'analyse de métaux ou de différents contaminants environnementaux.

Comme mentionné plus tôt dans ce mémoire, le but ultime de ce projet serait d'implanter les VAMS au sein du réseau hospitalier au Québec et au Canada. Cette nouvelle approche de prélèvement présente de nombreux avantages spécialement pour la clientèle pédiatrique. Les résultats présentés dans ce mémoire sont le premier pas de franchi vers l'implantation des VAMS dans le réseau hospitalier au Québec. Le dépistage néonatal, qui se fait d'ailleurs majoritairement à l'aide de papiers buvards (DBS), pourrait grandement bénéficier de l'usage de VAMS notamment dû au fait qu'ils sont volumétriques, ce qui permet de faire des analyses quantitatives beaucoup plus précises qu'avec les DBS.

Les nouvelles méthodes développées pourraient d'ailleurs être utilisées lors des prochains cycles de l'enquête canadienne sur les mesures de la santé (ECMS) pour obtenir des données de référence chez les enfants âgés de 0 à 3 ans. La méthode spécifique au plomb ou la méthode complète (cadmium, cobalt, cuivre, plomb, sélénium, uranium et zinc) pourrait servir à recueillir des données populationnelles à très grande échelle pour cette tranche d'âge. Il est essentiel de combler le manque de données et de valeurs de références sur les contaminants environnementaux pour cette portion de la population et la solution se trouve peut-être dans l'implantation des VAMS au sein des prochains cycles de l'ECMS.

4.4 Conclusion

En conclusion, l'ensemble des données présentées dans ce mémoire tendent à démontrer l'efficacité des embouts polymériques absorbants Mitra® VAMS pour l'analyse des éléments toxiques et essentiels dans le sang. En effet, le cadmium, le cobalt, le cuivre, le plomb, le sélénium, l'uranium et le zinc présentent de très bons résultats et les méthodes d'analyses développées et validées au CTQ pourraient servir dans le cadre d'études de biosurveillance ou pour le dépistage néonatal au Québec et au Canada. Le présent mémoire a permis d'étudier de manière exhaustive le potentiel d'analyse d'un panel de 12 éléments toxiques et essentiels dans le sang prélevé sur supports absorbants VAMS et de mettre en lumière les possibilités et les difficultés qui y sont reliées. Ce mémoire représente un pas important vers l'implantation des VAMS comme approche alternative aux prélèvements par ponction veineuse dans le réseau hospitalier au Québec surtout pour l'analyse de métaux toxiques et essentiels dans le sang.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Buowari, O. Y. (2013). Complications of venepuncture. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.4236/abb.2013.41A018>
2. *Blood analysis | Properties, Tests, Benefits, & Facts | Britannica*. (s. d.). Consulté 31 mai 2023, à l'adresse <https://www.britannica.com/science/blood-analysis>
3. *Sang : Composition, quantité, plaquettes*. (2022, mars 18). Consulté le 31 mai à l'adresse <https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-anatomie-et-examens/2723199-sang-composition-quantite-plaquettes-definition/>
4. Wada O. (2004). What are Trace Elements? Their deficiency and excess states. *JMA Journal* 47(8): 351–358.
5. *Menkes Disease*. (s. d.). National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Consulté 31 mai 2023, à l'adresse <https://www.ninds.nih.gov/health-information/disorders/menkes-disease>
6. Abdulla, M., & Chmielnicka, J. (1989). New aspects on the distribution and metabolism of essential trace elements after dietary exposure to toxic metals. *Biological Trace Element Research*, 23(1), 25-53. <https://doi.org/10.1007/BF02917176>
7. Mehri, A. (2020). Trace Elements in Human Nutrition (II) – An Update. *International Journal of Preventive Medicine*, 11, 2. https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM_48_19
8. Dart, R. C. (2004). *Medical Toxicology*. Lippincott Williams & Wilkins.
9. Centers for Disease Control and Prevention. Childhood Lead Poisonin Prevention. Consulté le 14 septembre 2022 à l'adresse <https://www.cdc.gov/ncch/lead/prevention/infographic-lead-in-environment.htm>.
10. Admin. (2020, décembre 11). *Qu'est-ce que la ponction veineuse ? Procédures, risques et craintes | Phlebotomy Coach | Association LEA*. Consulté le 31 mai 2023 à l'adresse <https://assolea.org/quest-ce-que-la-ponction-veineuse/>

11. *La prise de sang par ponction veineuse—Cours soignants.* (s. d.). EspaceSoignant.com. Consulté 31 mai 2023, à l'adresse <https://www.espacesoignant.com/soignant/pratiques-de-soins/ponction-veineuse>
12. *Explication du fonctionnement niveau prélèvement sanguin à Montréal.* (s. d.). Consulté 31 mai 2023, à l'adresse <https://www.priredesangmontreal.com/fr/materiel/>
13. Resano, M., Belarra, M. A., García-Ruiz, E., Aramendía, M., & Rello, L. (2018). Dried matrix spots and clinical elemental analysis. Current status, difficulties, and opportunities. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 99, 75-87. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.004>
14. Guthrie, R., & Susi, A. (1963). A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*, 32, 338-343.
15. *Phenylketonuria (PKU)—Symptoms and causes.* (s. d.). Mayo Clinic. Consulté 1 juin 2023, à l'adresse <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/phenylketonuria/symptoms-causes/syc-20376302>
16. Spooner, N., Denniff, P., Michielsen, L., De Vries, R., Ji, Q. C., Arnold, M. E., Woods, K., Woolf, E. J., Xu, Y., Boutet, V., Zane, P., Kushon, S., & Rudge, J. B. (2015). A device for dried blood microsampling in quantitative bioanalysis : Overcoming the issues associated blood hematocrit. *Bioanalysis*, 7(6), 653-659. <https://doi.org/10.4155/bio.14.310>
17. Velghe, S., Delahaye, L., & Stove, C. P. (2019). Is the hematocrit still an issue in quantitative dried blood spot analysis? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 163, 188-196. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.10.010>
18. Spooner, N. (2013). A dried blood spot update : Still an important bioanalytical technique? *Bioanalysis*, 5(8), 879-883. <https://doi.org/10.4155/bio.13.56>
19. Timmerman, P., White, S., Cobb, Z., De Vries, R., Thomas, E., & Van Baar, B. (2013). Update of the EBF recommendation for the use of DBS in regulated bioanalysis integrating the conclusions from the EBF DBS-microsampling consortium. *Bioanalysis*, 5(17), 2129-2136. <https://doi.org/10.4155/bio.13.173>

20. Nys, G., Kok, M. G. M., Servais, A.-C., & Fillet, M. (2017). Beyond dried blood spot : Current microsampling techniques in the context of biomedical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 97, 326-332. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.002>
21. Langer, E. K., Johnson, K. J., Shafer, M. M., Gorski, P., Overdier, J., Musselman, J., & Ross, J. A. (2011). Characterization of the elemental composition of newborn blood spots using sector-field inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 21(4), 355-364. <https://doi.org/10.1038/jes.2010.19>
22. Protti, M., Mandrioli, R., & Mercolini, L. (2019). Tutorial : Volumetric absorptive microsampling (VAMS). *Analytica Chimica Acta*, 1046, 32-47. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.09.004>
23. Kok, M. G. M., & Fillet, M. (2018). Volumetric absorptive microsampling : Current advances and applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 288-296. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.029>
24. De Kesel, P. M. M., Lambert, W. E., & Stove, C. P. (2015). Does volumetric absorptive microsampling eliminate the hematocrit bias for caffeine and paraxanthine in dried blood samples? A comparative study. *Analytica Chimica Acta*, 881, 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.056>
25. Capiou, S., & Stove, C. (2020). Hematocrit prediction in volumetric absorptive microsamples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 190, 113491. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113491>
26. Denniff, P., & Spooner, N. (2014). Volumetric Absorptive Microsampling : A Dried Sample Collection Technique for Quantitative Bioanalysis. *Analytical Chemistry*, 86(16), 8489-8495. <https://doi.org/10.1021/ac5022562>
27. Kocur, A., Marszałek, D., Rubik, J., Czajkowska, A., & Pawiński, T. (2023). Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus Based on Volumetric Absorptive Microsampling Technique (VAMS) in Renal Transplant Pediatric Recipients-LC-MS/MS Method Development, Hematocrit Effect Evaluation, and Clinical Application. *Pharmaceutics*, 15(1), 299. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010299>

28. Koponen, J., Rudge, J., Kushon, S., & Kiviranta, H. (2018). Novel volumetric adsorptive microsampling technique for determination of perfluorinated compounds in blood. *Analytical Biochemistry*, 545, 49-53. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.01.015>
29. Carignan, C. C., Bauer, R. A., Patterson, A., Phomsopha, T., Redman, E., Stapleton, H. M., & Higgins, C. P. (2023). Self-Collection Blood Test for PFASs : Comparing Volumetric Microsamplers with a Traditional Serum Approach. *Environmental Science & Technology*. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c09852>
30. Kok, M. G. M., Nix, C., Nys, G., & Fillet, M. (2019). Targeted metabolomics of whole blood using volumetric absorptive microsampling. *Talanta*, 197, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.014>
31. Cala, M. P., & Meesters, R. J. (2017). Comparative study on microsampling techniques in metabolic fingerprinting studies applying gas chromatography-MS analysis. *Bioanalysis*, 9(17), 1329-1340. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0037>
32. Volani, C., Caprioli, G., Calderisi, G., Sigurdsson, B. B., Rainer, J., Gentilini, I., Hicks, A. A., Pramstaller, P. P., Weiss, G., Smarason, S. V., & Paglia, G. (2017). Pre-analytic evaluation of volumetric absorptive microsampling and integration in a mass spectrometry-based metabolomics workflow. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(26), 6263-6276. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0571-8>
33. Kovač, J., Panic, G., Neodo, A., Meister, I., Coulibaly, J. T., Schulz, J. D., & Keiser, J. (2018). Evaluation of a novel micro-sampling device, Mitra™, in comparison to dried blood spots, for analysis of praziquantel in *Schistosoma haematobium*-infected children in rural Côte d'Ivoire. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 151, 339-346. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.01.030>
34. Tuma, C., Thomas, A., Braun, H., & Thevis, M. (2023). Quantification of 25-hydroxyvitamin D2 and D3 in Mitra® devices with volumetric absorptive microsampling technology (VAMS®) by UHPLC-HRMS for regular vitamin D status monitoring. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 228, 115314. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115314>

35. Scuderi, C. E., Parker, S. L., Jacks, M., John, G. T., McWhinney, B., Ungerer, J., Mallett, A. J., Healy, H. G., Roberts, J. A., & Staatz, C. E. (2023). Serum Creatinine and Tacrolimus Assessment With VAMS Finger-Prick Microsampling : A Diagnostic Test Study. *Kidney Medicine*, 5(4), 100610. <https://doi.org/10.1016/j.xkme.2023.100610>
36. Molloy, M. P., Hill, C., McKay, M. J., & Herbert, B. R. (2023). Proteome Analysis of Whole Blood Collected by Volumetric Absorptive Microsampling. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2628, 173-179. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2978-9_11
37. van der Heijden, L. T., Uittenboogaard, A., Nijstad, A. L., Gebretensae, A., Kaspers, G. J. L., Beijnen, J. H., Huitema, A. D. R., & Rosing, H. (2023). A sensitive liquid chromatographic-mass spectrometry method for the quantification of vincristine in whole blood collected with volumetric absorptive microsampling. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 225, 115232. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115232>
38. Mitra Resources | User Guides, Applications and How to Guides. Consulté le 2 juin 2023, à l'adresse <https://www.neoteryx.com/mitra-vams-resources>.
39. Delahaye, L., Veenhof, H., Koch, B. C. P., Alffenaar, J.-W. C., Linden, R., & Stove, C. (2021). Alternative Sampling Devices to Collect Dried Blood Microsamples : State-of-the-Art. *Therapeutic Drug Monitoring*, 43(3), 310-321. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000864>
40. Lenk, G., Ullah, S., Stemme, G., Beck, O., & Roxhed, N. (2019). Evaluation of a Volumetric Dried Blood Spot Card Using a Gravimetric Method and a Bioanalytical Method with Capillary Blood from 44 Volunteers. *Analytical Chemistry*, 91(9), 5558-5565. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02905>
41. Kocur, A., Marszałek, D., Rubik, J., Czajkowska, A., & Pawiński, T. (2023). Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus Based on Volumetric Absorptive Microsampling Technique (VAMS) in Renal Transplant Pediatric Recipients-LC-MS/MS Method Development, Hematocrit Effect Evaluation, and Clinical Application. *Pharmaceutics*, 15(1), 299. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010299>

42. ISO (2019, septembre 9). *ISO/IEC 17025—General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. <https://www.iso.org/publication/PUB100424.html>
43. Institut national de santé publique du Québec. (s.d.). *Qui sommes-nous? | INSPQ*. <https://www.inspq.qc.ca/ctq/qui-sommes-nous>
44. Bolea-Fernandez, E., Phan, K., Balcaen, L., Resano, M., & Vanhaecke, F. (2016). Determination of ultra-trace amounts of prosthesis-related metals in whole blood using volumetric absorptive micro-sampling and tandem ICP - Mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *941*, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.08.030>
45. Cañabate, Á., García-Ruiz, E., Resano, M., & Todolí, J.-L. (2017). Analysis of whole blood by ICP-MS equipped with a high temperature total sample consumption system. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *32*(1), 78-87. <https://doi.org/10.1039/C6JA00374E>
46. Capiou, S., Bolea-Fernandez, E., Balcaen, L., Van Der Straeten, C., Verstraete, A. G., Vanhaecke, F., & Stove, C. P. (2020). Development, validation and application of an inductively coupled plasma—Mass spectrometry method to determine cobalt in metal-on-metal prosthesis patients using volumetric absorptive microsampling. *Talanta*, *208*, 120055. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.06.055>
47. Anoshkina, Y., Costas-Rodríguez, M., & Vanhaecke, F. (2017). Iron isotopic analysis of finger-prick and venous blood by multi-collector inductively coupled plasma-mass spectrometry after volumetric absorptive microsampling. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *32*(2), 314-321. <https://doi.org/10.1039/C6JA00394J>
48. Volani, C., Paglia, G., Smarason, S. V., Pramstaller, P. P., Demetz, E., Pfeifhofer-Obermair, C., & Weiss, G. (2018). Metabolic Signature of Dietary Iron Overload in a Mouse Model. *Cells*, *7*(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/cells7120264>
49. Koutsimpani-Wagner, A., Quartucci, C., Rooney, J. P. K., Bose-O'Reilly, S., & Rakete, S. (2022). Mercury biomonitoring in German adults using volumetric

- absorptive microsampling. *Environmental Monitoring and Assessment*, 194(4), 315. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-09962-1>
50. Wikström, F., Olsson, C., Palm, B., Roxhed, N., Backlund, L., Schalling, M., & Beck, O. (2023). Determination of lithium concentration in capillary blood using volumetric dried blood spots. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 227, 115269. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115269>
51. *Enquête canadienne sur les mesures de la santé (ECMS)*. (s. d.). Consulté 8 juin 2023, à l'adresse <https://www.statcan.gc.ca/fr/enquete/menages/5071>
52. Santé Canada. (2015, juillet 15). *Troisième rapport sur la biosurveillance humaine des substances chimiques de l'environnement au Canada* [Page de navigation]. <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/sante-environnement-milieu-travail/rapports-publications/contaminants-environnementaux/troisieme-rapport-biosurveillance-humaine-substances-chimiques-environnement-canada.html>
53. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) Information—CA*. (s. d.). Consulté 24 mai 2023, à l'adresse <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/trace-elemental-analysis-tea-information/inductively-coupled-plasma-mass-spectrometry-icp-ms-information.html>
54. Balaram, V. (2021). Strategies to Overcome Interferences in Elemental and Isotopic Geochemical Analysis by Quadrupole Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Critical Evaluation of the Recent Developments . *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 35(10) <https://doi.org/10.1002/rcm.9065>
55. Mory, C. (2020). Validation d'une méthode de dosage du Vémurafénib par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) à partir d'une goutte de sang séché (DBS) : Application dans une cohorte pédiatrique atteinte d'histiocytose langerhansienne. Sciences pharmaceutiques. dumas-03216574

56. Pedersen, L., Andersen-Ranberg, K., Hollergaard, M., & Nybo, M. (2017). Quantification of multiple elements in dried blood spot samples. *Clinical Biochemistry*, 50(12), 703-709. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.01.010>
57. Hsieh, H.-F., Chang, W.-S., Hsieh, Y.-K., & Wang, C.-F. (2011). Using dried-droplet laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry to quantify multiple elements in whole blood. *Analytica Chimica Acta*, 699(1), 6-10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.05.002>
58. Cawte, J., Hams, G., & Kilburn, C. (1987). Manganism in a neurological ethnic complex in Northern Australia. *Lancet (London, England)*, 1(8544), 1257. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(87\)92699-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(87)92699-7)
59. *Brief guide to analytical methods for measuring lead in blood, 2nd edition.* (s. d.). Consulté 3 février 2023, à l'adresse <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240009776>
60. Salden S.J. *et al.*, Pediatric Reference Ranges, AACL Press, Washington, 1999.
61. Breton, A., Cirtiu, C. M., Fleury, N., Lajeunesse, A., & Rudge, J. (2023). Method development for the quantification of lead levels in whole blood sampled on Mitra® with VAMS® tips by inductively coupled plasma-MS/MS. *Bioanalysis*, 15(2), 71-81. <https://doi.org/10.4155/bio-2022-0242>
62. Howie, S. R. (2011). Blood sample volumes in child health research : Review of safe limits. *Bulletin of the World Health Organization*, 89(1), 46-53. <https://doi.org/10.2471/BLT.10.080010>
63. Fatemian, E., Allibone, J., & Walker, P. J. (1999). Use of gold as a routine and long term preservative for mercury in potable water, as determined by ICP-MS. *Analyst*, 124(8), 1233-1236. <https://doi.org/10.1039/A809859J>
64. Liu, S.-H., Han, Z., Kong, X., Zhang, J., Lv, Z., & Yuan, G. (2021). Organic matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry : A tutorial review. *Applied Spectroscopy Reviews*, 57, 1-29. <https://doi.org/10.1080/05704928.2021.1897991>

65. Meyer, S., Markova, M., Pohl, G., Marschall, T. A., Pivovarova, O., Pfeiffer, A. F. H., & Schwerdtle, T. (2018). Development, validation and application of an ICP-MS/MS method to quantify minerals and (ultra-)trace elements in human serum. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 49, 157-163.
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.05.012>
66. Goullé, J.-P., Mahieu, L., Castermant, J., Neveu, N., Bonneau, L., Lainé, G., Bouige, D., & Lacroix, C. (2005). Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. Reference values. *Forensic Science International*, 153(1), 39-44.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.04.020>
67. Santé Canada. (2010, août 16). *Rapport sur la biosurveillance humaine des substances chimiques de l'environnement au Canada* [Page de navigation].
<https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/sante-environnement-milieu-travail/rapports-publications/contaminants-environnementaux/rapport-biosurveillance-humaine-substances-chimiques-environnement-canada-sante-canada-2010.html>
68. Santé Canada. (2013, avril 5). *Deuxième rapport sur la biosurveillance humaine des substances chimiques de l'environnement au Canada* [Page de navigation].
<https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/sante-environnement-milieu-travail/rapports-publications/contaminants-environnementaux/deuxieme-rapport-biosurveillance-humaine-substances-chimiques-environnement-canada-sante-canada-2013.html>
69. Goullé, J.-P., Saussereau, É., Mahieu, L., Coulant, I., Plougouven, S., Guerbet, M., & Lacroix, C. (2011). Validation du dosage du chrome par ICP-MS avec cellule de collision dans les matrices biologiques et concentrations usuelles. *Annales de Toxicologie Analytique*, 23(4), 211-216.
<https://doi.org/10.1051/ata/2011126>
70. Wu, A. H. B. (2006). *Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests*. Saunders/Elsevier.
71. May, T., & Wiedmeyer, R. H. (1998). A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS. *Atomic Spectroscopy*. <https://www.semanticscholar.org/paper/A-Table-of-Polyatomic-Interferences-in-ICP-MS-May-Wiedmeyer/b8156c21f333d5c154efe8a68d347c8d9f102845>

72. *The elements of the periodic table sorted by elements in human body.* (s. d.). Consulté 23 mars 2023, à l'adresse <https://www.lenntech.com/periodic-chart-elements/human-body.htm>
73. Turner, A., & Filella, M. (2021). Hazardous metal additives in plastics and their environmental impacts. *Environment International*, 156, 106622. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106622>
74. *2018 Georgia MICS (Multiple Indicator Cluster Survey) | UNICEF Georgia.* (2019, novembre 20). <https://www.unicef.org/georgia/reports/2018-georgia-mics-multiple-indicator-cluster-survey>