HAL
open science

Développement d'outils analytiques de mise en évidence de biomarqueurs d'une exposition aux nouvelles substances psychoactives (NPS) : approches in vivo, in silico, in vitro

Camille Richeval

To cite this version:

Camille Richeval. Développement d'outils analytiques de mise en évidence de biomarqueurs d'une exposition aux nouvelles substances psychoactives (NPS) : approches in vivo, in silico, in vitro. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2018. Français. NNT : 2018LILUS024 . tel-02044100

HAL Id: tel-02044100

https://theses.hal.science/tel-02044100v1

Submitted on 21 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE LILLE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE

THESE

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lille

Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Développement d'outils analytiques de mise en évidence de biomarqueurs d'une exposition aux nouvelles substances psychoactives (NPS) : approches *in vivo, in silico, in vitro*

Présentée et soutenue publiquement le 28 septembre 2018

Camille RICHEVAL

née le 30 décembre 1984

JURY

Jean-michel GAULIER, Docteur au CHU de Lille	Directeur de thèse
André GUILLOUZO, Professeur à l'Université de Rennes	Rapporteur
Bruno MEGARBANE, Professeur à l'Université de Paris - Diderot	Rapporteur
Delphine ALLORGE, Professeur à l'Université de Lille	Membre du jury
Hélène EYSSERIC, Maitre de conférences à l'Université de Grenoble	Membre du jury
Pascal KINTZ, Professeur conventionné à l'Université de Strasbourg	Membre du jury

Remerciements

Je remercie,

le Professeur André GUILLOUZO, pour m'avoir accompagnée, conseillée lors des comités de suivi individuel et pour avoir accepté d'être rapporteur

le Professeur Bruno MEGARBANE, pour l'intérêt porté à ce travail en tant que rapporteur

le Docteur Hélène EYSSERIC, pour avoir accepté d'être membre du jury et pour les collaborations avec plusieurs études de cas

le Professeur Pascal KINTZ, pour m'avoir accompagnée, conseillée lors des comités de suivi individuel et pour les collaborations avec plusieurs études expérimentales

le Professeur Delphine ALLORGE, pour m'avoir soutenue dans ma démarche et permis de réaliser cette thèse en parallèle de mon activité professionnelle et de participer à mon jury

le Docteur Jean-michel GAULIER, pour m'avoir encadrée pendant cette thèse, pour l'aide précieuse apportée pendant ces années, le soutien et les encouragements

toutes les personnes ayant participé de près ou de loin par les collaborations qui ont été le socle de ce travail

Mélodie, Jean-François, Luc, Virginie, mes collègues, pour m'avoir soutenue et permis de me libérer du temps, pour l'aide apportée

tous les stagiaires m'ayant aidée dans les différents travaux, Ana, Anne-Julie, Audrey, Alexandre, Laëtitia, Xavier

et mes parents, Cécile et Véro, mes sœurs, Chloé et Luc, mes amis, pour le temps consacré à la relecture de ce manuscrit, pour le soutien apporté et pour les moments de détente quand j'en avais besoin.

Sommaire

Sommaire 1
Liste des figures 3
Liste des tableaux 5
Abréviations 6
Introduction 9
Partie 1 : Généralités 11
1 Les nouvelles substances psychoactives 13
1.1 Définition 13
1.2 Etat des lieux en France 15
1.2.1 Données de l'OFDT 15
1.2.2 Règlementation 16
1.3 Cas d'intoxication en France 17
1.4 Classification 17
1.5 Les nouveaux opioïdes de synthèse 19
2 Les outils analytiques 21
2.1 La spectrométrie de masse 21
2.2 Principe de l'électrospray 21
2.3 Les analyseurs 22
2.3.1 Le quadripôle 22
2.3.2 Le temps de vol 23
2.4 Le screening 23
2.4.1 Le screening non ciblé en masse exacte 24
2.4.2 Le screening ciblé 25
2.5 Résonance magnétique nucléaire 26
2.5.1 Principe 26
2.5.2 Description de l'appareil 27
2.5.3 Méthode quantitative 27
Partie 2 : Travaux 29
1 Objectif des travaux 31
2 Stratégie *in vitro*, *in silico* et *in vivo* : exemple du Fu-F [39] 31
2.1 Analyse de poudre 31
2.1.1 TOF 32
2.1.2 RMN ^{1}H 35
2.2 Production des métabolites *in vitro* 36
2.2.1 Lignée cellulaire : Hepa-RG 36
2.2.2 Microsomes 38
2.2.3 Analyses sur le TOF 38
2.2.4 Résultats des données in vitro 40
2.2.5 Comparaison avec les données in vivo 44
2.2.6 Conclusion 46
2.3 Applications 47
2.3.1 Analyse de poudre 47
2.3.1.1 SINTES 47
2.3.1.2 CHEMSEX [41] 52
2.3.2 Etudes de cas 54
2.3.2.1 Ocfentanil [53] 54
2.3.2.2 U-47700 57
2.3.3 Etudes clinico-biologiques et épidémiologiques 60
2.3.3.1 Etudes clinico-biologiques 60
2.3.3.1.1 FERIATOX 61

2.3.3.1.2 MUSITOX 65
2.3.3.2 NPS et conduite automobile 67
2.3.3.2.1 Prélèvements sanguins [128,129] 67
2.3.3.2.2 Prélèvements salivaires 69
2.3.4 Autres travaux 72
2.3.4.1 Etudes de cas 72
2.3.4.1.1 Méthiopropamine [136] 72
2.3.4.1.2 25I-NBOMe [137,138] 72
2.3.4.1.3 α-PHP 73
2.3.4.1.4 5-MeO-DALT et diphénidine 73
2.3.4.1.5 AB-FUBINACA [54] 74
2.3.4.2 Etudes expérimentales 74
2.3.4.2.1 Métizolam [51] 74
- Article 15 : LSD Detection and Interpretation in Hair 75
2.3.4.2.2 Flunitrazolam [142] 75
2.3.4.3 Autres matrices, autres temps, autres substances 76
3 Synthèse et perspectives 78
Conclusion 82
Bibliographie 84
Articles 93
- Article 1 : *In vitro* characterization of NPS metabolites produced by human liver microsomes and the HEPA-RG cell line using liquid chromatography high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) analysis: application to furanyl fentanyl 95
- Article 2 : The comeback of Ecstasy : New designs and increased MDMA content. 96
- Article 3 : CHEMSEX, NPS & risk reduction management: Preliminary results of a pilot study 97
- Article 4 : Fatality involving ocfentanil documented by identification of metabolites. 98
- Article 5 : Relevance of metabolite identification to detect new synthetic opioid intoxications illustrated by U-47700 99
- Article 6 : New psychoactive substances in a drugged driving population: Preliminary results. 117
- Article 7 : Prevalence of new psychoactive substances and prescription drugs in the Belgian driving under the influence of drugs population. 118
- Article 8 : New psychoactive substances in oral fluid of French and Belgian drivers in 2016 119
- Article 9 : Acute Methiopropamine Intoxication After “Synthacaine” Consumption. 120
- Article 10 : Retrospective identification of 25I-NBOMe metabolites in an intoxication case. 121
- Article 11 : LSD instead of 25I-NBOMe: The revival of LSD? A case report. 122
- Article 12 : Case reports: Four concomitant non-fatal intoxications with AB-FUBINACA and MDMA. 123
- Article 13 : Detection of the designer benzodiazepine metizolam in urine and preliminary data on its metabolism: Metizolam identification in urine. 124
- Article 14 : Detection of designer benzodiazepine flunitrazolam in urine and preliminary data on is metabolism 125
- Article 15 : LSD Detection and Interpretation in Hair 138
- Article 16 : Characterization of metizolam, a designer benzodiazepine, in alternative biological specimens 139
- Article 17 : Behavioural differences in tobacco and tea use (Siberia, 1650-1900 A.D.). 140

Liste des figures

Figure 1 : Exemples de NPS mimant les effets psychoactifs de molécules « traditionnelles ». 13
Figure 2 : Nombre de NPS identifiés en 2017 par pays 14
Figure 3 : Nombre de NPS identifiés par famille de 2000 à 2017 en France 16
Figure 4 : The drug wheel, Nouvelle ère des drogues 18
Figure 5 : Structures de quelques nouveaux opioïdes de synthèse 19
Figure 6 : Principe de l'électrospray 21
Figure 7 : Dissociation par Collision Induite (CID) 22
Figure 8 : Schéma d'un quadripôle 22
Figure 9 : Principe du TOF 23
Figure 10 : Principe du mode MSe 24
Figure 11 : Détection en mode MRM 25
Figure 12 : Détection en mode Daughter scan 25
Figure 13 : Orientation des spins en fonction de la situation 26
Figure 14 : Signal FID et spectre RMN 26
Figure 15 : Schéma d'un spectromètre RMN 27
Figure 16 : Questionnaire reçu avec l'échantillon 31
Figure 17 : Chromatogramme de la poudre blanche analysée sur le Xevo® G2 TOF 32
Figure 18 : Spectres de masse haute résolution de la poudre blanche analysée sur le Xevo® G2 TOF sans collision [A] et avec collision [B] 33
Figure 19 : Formules développées du fentanyl [A] et du Fu-F [B] 34
Figure 20 : Schéma de fragmentation du Fu-F 34
Figure 21 : Spectre RMN ^{1}H de la poudre blanche analysée 35
Figure 22 : Schéma des 2 plaques 12 puits pour les différents tests réalisés avec Hepa-RG 37
Figure 23 : Protocole réalisé pour les différents tests d'incubation du Fu-F avec Hepa-RG 38
Figure 24 : Conditions chromatographiques de l'UPLC 39
Figure 25 : Ratio des aires des métabolites/aire du Fu-F à 100 µM avec HLM et à 100 µM pendant 24 h avec Hepa-RG 40
Figure 26 : Voies métaboliques du Fu-F proposées à partir de l'analyse in vitro 40
Figure 27 : Schéma de fragmentation des métabolites du Fu-F 41
Figure 28 : Ratio des aires des métabolites du Fu-F/aire du Fu-F à H0 sur l'ensemble de la cinétique de 0 H à 48 H. 43
Figure 29 : Echantillons SINTES reçus et analysés au laboratoire de 2015 à mai 2018 48
Figure 30 : Nombre de NPS identifiés, par famille, de 2015 à mai 2018 49
Figure 31 : Photos de quelques comprimés d'ecstasys 51
Figure 32 : Voies métaboliques de l'ocfentanil proposées à partir de l'analyse *in vitro* 55
Figure 33 : Schéma de fragmentation de l'ocfentanil 55
Figure 34 : Spectre du U-47700 obtenu par CL-SMHR [A] et son schéma de fragmentation [B], spectre de la RMN ^{1}H [C] 57
Figure 35 : Voies métaboliques du U-47700 proposées à partir de l'analyse *in vitro* 59
Figure 36 : Ferias de Dax et Mont de Marsan 61
Figure 37 : Protocoles d'extraction des échantillons de l'étude FERIATOX 62

Figure 38 : Festival Garorock 65
Figure 39 : Procédure pour les contrôles de stupéfiants 67
Figure 40 : Zones géographiques de l'étude en Belgique 67
Figure 41 : Protocole de préparation du sang 68
Figure 42 : Fréquence des NPS identifiés dans les 558 échantillons de sang 68
Figure 43 : Connexions entre les NPS et les stupéfiants « classiques » (en noir) dans les DW collectés en 2016 et en 2017. Le nombre d'identifications et de connexions est présenté. 70
Figure 44 : Fréquence des NPS identifiés dans les DW aux abords du festival Garorock 71
Figure 45 : Chronologie d'apparition des NPS depuis 1960 77
Figure 46 : Les nombreuses collaborations 79

Liste des tableaux

Tableau 1 : Gradient UPLC 32
Tableau 2 : Métabolites du Fu-F avec temps de rétention (TR), biotransformation, formule, masse exacte de l'ion précurseur $[M+H]^+$ et des fragments 42
Tableau 3 : Comparaisons de ses données in vitro pour les métabolites du FuF avec celles de la littérature 45
Tableau 4 : Liste des NPS identifiés dans les échantillons SINTES de 2015 à mai 2018 50
Tableau 5 : Nouveaux NPS ajoutés dans la base de données grâce aux échantillons SINTES 51
Tableau 6 : Résultats des 31 échantillons analysés de l'étude Chemsex 53
Tableau 7 : Nouveaux NPS ajoutés dans la base de données grâce à l'étude Chemsex 53
Tableau 8 : Substances identifiées dans la poudre et données des cas mortels rapportés dans la littérature 54
Tableau 9 : Concentration d'ocfentanil dans les échantillons biologiques et données des cas mortels rapportés dans la littérature 54
Tableau 10 : Métabolites de l'OcF avec temps de rétention (TR), biotransformation, formule, masse exacte de l'ion précurseur $[M+H]^+$ et des fragments 56
Tableau 11 : Ratio de la surface des pics des métabolites / la surface du pic de l'OcF 56
Tableau 12 : Concentration en µg/L des composés identifiés par CL-SMHR dans les prélèvements biologiques 58
Tableau 13 : Métabolites du U-47700 avec temps de rétention (TR), biotransformation, formule, masse exacte de l'ion précurseur $[M+H]^+$ et des fragments 59
Tableau 14 : Comparaisons de mes données avec celles de la littérature 60
Tableau 15 : Composés identifiés dans les prélèvements de l'étude FERIATOX 63
Tableau 16 : Résultats des criblages toxicologiques pour l'ensemble des prélèvements de l'étude FERIATOX... 64
Tableau 17 : Résultats des criblages toxicologiques pour l'ensemble des prélèvements de l'étude MUSITOX ... 66
Tableau 18 : Molécules identifiées dans les DBS et cheveux de l'étude MUSITOX 66

Abréviations

Les acronymes des NPS, à deux exceptions (Fu-F et OcF), sont exclus de cette liste

$[M+H]^+$: Ion protoné
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
CAP : Centre antipoison
CD_3OD : Méthanol deutéré
$CDCl_3$: Chloroforme deutéré
CEIP : Centre d'évaluation et d'information sur la pharmacodépendance
CEIP-A : Centre d'évaluation et d'information sur la pharmacodépendance - Addictovigilance
CG : Contenu gastrique
CG-SM : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CH : Centre hospitalier
CHV : Cheveux
CHU : Centre hospitalier universitaire
CID : Collision induced dissociation (Dissociation par collision induite)
CL-SM : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
CL-SMHR : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution
CL-SM/SM : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
CNBAE : Compagnie nationale des biologistes et analystes experts
CPP : Comité de protection des personnes
CS : Cannabinoïde de synthèse
CYP : Cytochrome P450
DBS : Dried blood spot
DSS : Dried saliva spot
DMSO : Dimethylsulfoxide
DRAMES : Décès en relation avec l'abus de médicaments et de substances
DW : Drugwipe
EMCDDA : European monitoring centre for drugs and drug addiction
ERETIC : Electronic reference to access *in vivo* concentrations
ESI : Electrospray ionization
EWS : Early warning system (système d'alerte précoce européeen)
FID : Free Induction Decay
FTICR : Résonance cyclotronique Ionique à transformée de Fourier
Fu-F : Furanylfentanyl
G6P : Glucose-6-phosphate
G6PD : Glucose-6-phosphate deshydrogénase
GST : Glutathion S transferase
HCl : Acide chlorhydrique
HLM : Human liver microsomes (Microsomes hépatiques humains)
HV : Humeur vitrée
IML : Institut médico-légal

INCC : Institut national de criminalistique et de criminologie
m/z : Masse sur charge
$MgCl_2$: Chlorure de magnésium
MILDECA : Mission ministérielle de lutte contre les drogues et les conduites addictives
MRM : Multiple Reaction Monitoring (Suivi de réactions multiples)
MRP : Multidrug resistance proteins
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NH_4OH : Solution d'ammoniaque
NOS : Nouvel opioïde de synthèse
NPS : Nouveaux produits de synthèse
OcF : Ocfentanil
OEDT : Observatoire européen des drogues et toxicomanies
OFDT : Observatoire français des drogues et toxicomanie
ONUDC : Office des Nations unies contre la drogue et le crime
PDE-5 : Inhibiteur de la phosphodiestérase de type 5
P-gp : Glycoprotéine-P
PMA : Postes médicaux avancés
QNP : Quattro nuclei probe
RC : Research chemical
RDR : Réduction des risques
RMN : Résonance magnétique nucléaire
RMN ^1H : Résonance magnétique du proton
SC : Sang cardiaque
SINTES : Système d'identification national des toxiques et des substances
SFTA : Société française de toxicologie analytique
SP : Sang périphérique
TOF : Temps de vol (Time of flight)
TR : Temps de rétention
TRIS : Trishydroxyméthylaminométhane ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol
TSO : Traitement de substitution aux opiacés
UDPGA : Uridine-diphosphate-glucuronic acid
UGT : UDP-glucuronosyltransférases
UR : Urine

Introduction

Les nouvelles substances psychoactives, appelées aussi couramment nouveaux produits de synthèse (NPS), sont un phénomène émergent qui touche de nombreux pays. Ils désignent un éventail hétérogène de substances psychoactives qui imitent les effets de différents médicaments ou produits illicites pour échapper à la législation sur les « stupéfiants ». Leur usage et leur disponibilité sur l'Internet se sont rapidement accrus ces 10 dernières années. Ainsi en 2017, 51 nouveaux NPS ont été détectés pour la première fois en Europe, portant le nombre de NPS suivis par l'EMCDDA (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction) à plus de 670 [1]. Les premières substances identifiées en France remontent à 2008 et quatre familles de NPS semblent dominer aujourd'hui (quantitativement et en termes d'impact sanitaire et médico-légal) le marché français : les cannabinoïdes de synthèse (ou « *spices* »), les cathinones, les opioïdes de synthèse et les designer benzodiazépines. Toutefois, d'autres familles sont également représentées : benzofuranes, pipérazines, tryptamines, arylcyclohexamines, NBOMes, …
La complexité des NPS du point de vue analytique réside dans cette multitude et variété de substances, associées à une apparition régulière de nouveaux produits. C'est une véritable course contre la montre. La capacité d'identifier une exposition à un NPS dans des échantillons biologiques présente de nombreux challenges : ces nouvelles substances sont absentes des bibliothèques de spectrométrie de masse commerciales, leurs métabolisme sont souvent inconnus (avec pourtant des métabolites actifs), les doses actives sont régulièrement très faibles avec en conséquence, des concentrations sanguines et urinaires faibles (d'autant plus quand le prélèvement biologique est réalisé à distance de la prise).

L'objectif de ma thèse est de construire un outil de recherche et/ou dosage de NPS et de leurs métabolites grâce à des approches *in vitro*, *in silico* et *in vivo*. Il s'agit en particulier, d'augmenter la sensibilité de détection de la prise de NPS en ciblant les métabolites qui sont souvent les produits majeurs d'élimination des NPS.

Après avoir présenté les NPS et les principaux outils analytiques pouvant être mis en œuvre pour les détecter/identifier, j'exposerai la stratégie *in vitro*, *in silico* et *in vivo* que j'ai développée à travers l'exemple détaillé d'un nouvel opioïde de synthèse (NOS), le furanylfentanyl.
Après avoir présenté deux autres applications à des NOS, je déclinerai les différents aspects de la mise en œuvre de mon outil analytique à travers différentes applications souvent issues de collaborations : études de cas ponctuels d'intoxication, analyses de comprimés et autres produits non biologiques, études prospectives et rétrospectives dans des populations ciblées, ou non, études expérimentales, …

Partie 1 : Généralités

1 Les nouvelles substances psychoactives

1.1 Définition

Les nouvelles substances psychoactives appelées plus couramment NPS sont définies par l'Office des Nations unies contre la drogue et le crime (ONUDC) comme toute substance consommée, pure ou en préparation, à des fins abusives, n'étant contrôlée ni par la convention unique des Nations unies sur les stupéfiants de 1961, ni par celle sur les psychotropes de 1971 et qui peut représenter une menace pour la santé publique. En France selon l'Observatoire français des drogues et toxicomanies (OFDT), l'abréviation NPS est souvent utilisée pour définir les Nouveaux Produits de Synthèse. De nombreuses terminologies les désignent : *party pills*, *legal highs*, sels de bains ou *designer drugs* ou encore *research chemical* (RC)

Leurs structures chimiques peuvent être proches des substances traditionnelles même si parfois elles peuvent être différentes. Leur but est de mimer les effets des substances déjà connues, que ce soit des médicaments ou stupéfiants (Figure 1) et de contourner la législation.

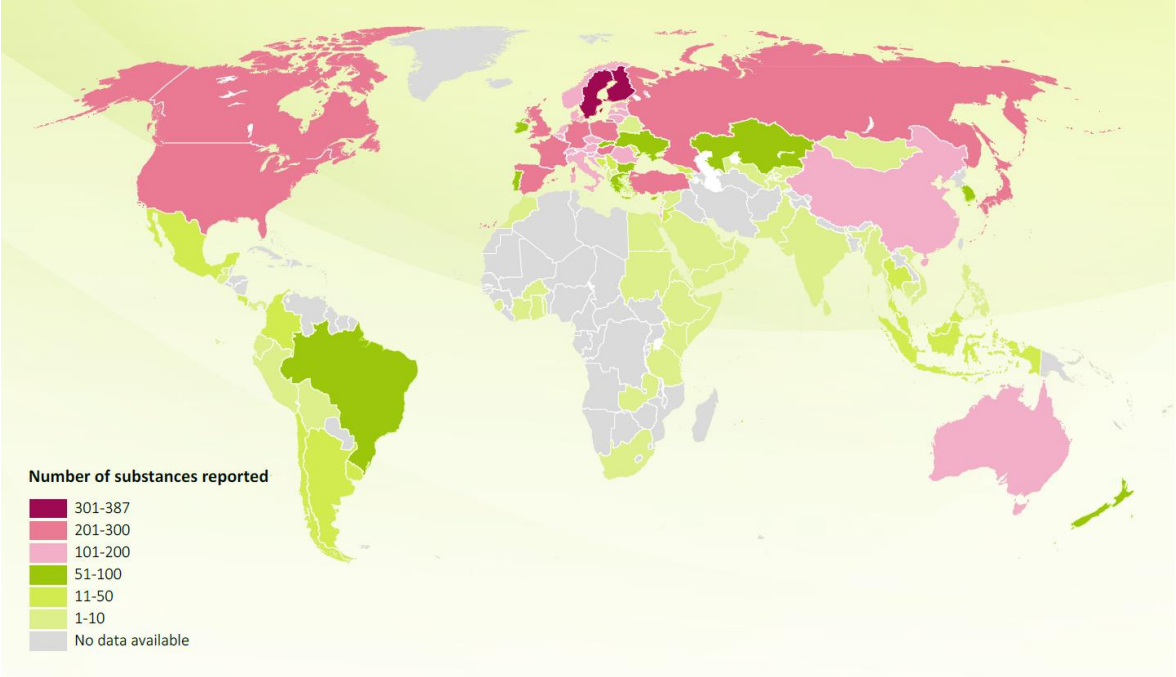
Effets psychoactifs	Molécules « traditionnelles »	NPS
Sédatif / Hypnotiques	Diazépam	Etizolam, Clonazolam
Dissociatifs	Phencyclidine, Kétamine	3-methoxyphencyclidine Deschlorkétamine
Hallucinogènes	LSD	25I-NBOMe
Stimulants	Cocaïne Amphétamine	4-Fluoroamphétamine Dimethylcathinone
Cannabinoïdes	Cannabis (THC)	AB-PINACA
Opioïdes	Morphine Héroïne	Furanylfentanyl Ocfentanyl

Figure 1 : Exemples de NPS mimant les effets psychoactifs de molécules « traditionnelles ».

Les formes galéniques et les modes d'administration sont également souvent proches de la substance à imiter. Par exemple :

- pour les cannabinoïdes de synthèse, la poudre est pulvérisée sur des débris végétaux ou sous forme d'e-liquide pour être ensuite fumés,
- pour les hallucinogènes voulant se rapprocher du LSD, ce sont des buvards, timbres sublinguaux imprégnés du composé hallucinogène (comme avec LSD),
- et pour les stimulants imitant la cocaïne et l'amphétamine, les NPS se présentent sous la forme de poudre pour être sniffés, injectés…

Depuis quelques années, les NPS sont devenus un phénomène mondial avec aujourd'hui plus de 110 pays et territoires de toutes les régions du monde ayant signalé un ou plusieurs NPS (Figure 2). Jusqu'en décembre 2017, plus de 800 substances ont été signalées par le système d'alerte précoce de l'ONUDC [2].



Source : UNODC, Early Warning Advisory on NPS

Figure 2 : Nombre de NPS identifiés en 2017 par pays

En 2017, l'EMCDDA (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction) suivait 670 NPS détectés en Europe depuis le début du phénomène [1].

Les NPS prolifèrent effectivement à un rythme soutenu et représentent un risque d'autant plus important pour la santé publique. Effectivement, les données de sécurité sur la toxicité de nombreux NPS ne sont pas disponibles ou très limitées et les informations sur les effets indésirables ou les risques à long terme sont encore largement inconnues. De plus, la pureté et la composition des produits contenant des NPS sont souvent inconnues voire mal maitrisées. Celles-ci exposent les utilisateurs à des risques élevés, comme en témoignent les hospitalisations d'urgence et les décès, parfois associés à une polyconsommation.

Les NPS sont généralement vendus sur Internet, mais dans certains pays autres que la France (Grande-Bretagne, Pays-Bas, …) il existe des magasins légaux appelés *head shops* ou *smart shops* qui en vendent directement au public. Sur les sites de vente, les NPS peuvent être présentés sous différentes dénominations, soit par leur nom chimique, soit par des noms commerciaux ne donnant ainsi aucune indication sur la composition réelle du produit vendu. Les vendeurs développent des stratégies commerciales (promotion, échantillon offert à tester) et des efforts marketing sont faits sur l'emballage pour donner un aspect attractif. L'esthétisme des sites est différent en fonction du public ciblé. Pour un public averti, les sites sont sobres, simples, généralement le nom chimique de la molécule apparaît clairement et est accompagné de la formule développée, du grammage et du prix. Pour un public novice,

les sites sont plus attractifs, colorés. Le nom des substances n'est pas toujours précisé, ce sont des noms avec plus de fantaisie, par exemple « Herbal encens », « party pills », « Bong Bastic », les sachets sont colorés, très graphiques. Il faut savoir que le Darkweb ou web caché regroupe également des sites de ventes de NPS non indexés par les moteurs de recherche du grand public [3,4].
Les produits commandés sont expédiés et livrés dans les boîtes aux lettres comme une lettre classique. Sur les emballages, il est très couramment inscrit la mention suivante « not for human consumption » (« non destiné à la consommation humaine ») ou « only for chemical research » (« usage réservé à la recherche »).
Selon l'EMCDDA, la Chine est le principal pays producteur de NPS. Ils y sont produits en grande quantité avant d'être expédiés vers l'Europe où ils seront transformés, conditionnés et vendus [1,5].
Internet n'est pas uniquement une source de vente de NPS. C'est également une source d'informations pour les usagers avec de nombreux forums témoignant des retours d'expérience de consommateurs appelés aussi « psychonautes » ou « aventuriers de drogues », pionniers à l'image d'**Alexander Shulgin**. Dans ces « trip reports », les psychonautes détaillent les quantités consommées, les effets ressentis, le mode d'administration et les règles à adopter pour réduire les risques.

Comparés aux drogues classiques, les NPS sont moins onéreux, de l'ordre de 10 à 20 € le gramme selon la molécule.
En France, la quasi-totalité des saisies des NPS est réalisée par les douanes aux aéroports, ces substances étant majoritairement transportées par fret.

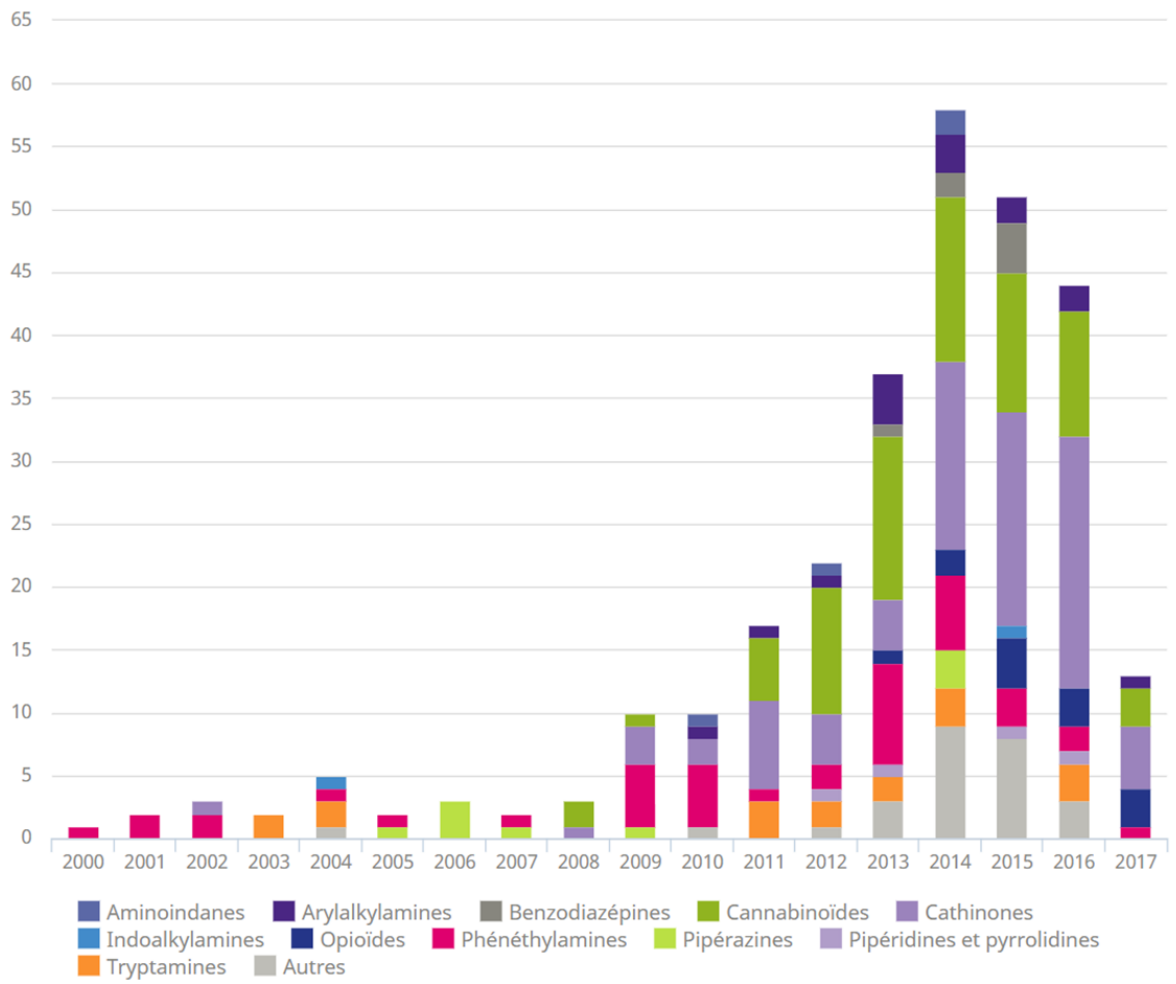
Alexander Shulgin

Alexander Shulgin est un chimiste, pharmacologue américain. Il est à l'origine de la démocratisation de la MDMA. Il a ensuite synthétisé de nombreuses drogues de synthèse qu'il a testées sur lui, sa femme et ses amis. Il est l'inventeur des « trip report ». Tous ses procédés de synthèse chimiques sont décrits dans ses 2 ouvrages, PiHKAL, Phenethylamines I Have Known And Loved: A Chemical Love Story (Les phényléthylamines que j'ai connues et aimées : Une histoire d'amour chimique) et TiHKAL, Tryptamines I Have Known And Loved: The Continuation (Les tryptamines que j'ai connues et aimées : La suite)

1.2 Etat des lieux en France

1.2.1 Données de l'OFDT

En France, l'OFDT, via le dispositif SINTES (Système d'identification national des toxiques et substances) recense les drogues et NPS qui circulent sur le territoire national. Les produits inclus dans ce dispositif sont recueillis directement auprès de l'usager par des coordinateurs du réseau SINTES. Les échantillons sont ensuite analysés par des laboratoires partenaires. L'OFDT est ensuite le relais français du système d'alerte précoce européen, l'Early warning system (EWS). Il communique également à l'observatoire européen des drogues et toxicomanies (OEDT appelé aussi EMCDDA) les nouveaux produits identifiés sur le territoire et les cas sanitaires graves en lien avec un usage de drogues.
Pour l'OFDT, l'émergence des NPS a réellement débuté en France en 2008 avec l'identification du JWH-018, le premier cannabinoïde de synthèse et de la méphédrone, la première cathinone, pour laquelle des cas de décès avaient été signalés en Grande-Bretagne [6]. Depuis 2008, chaque année de nombreux NPS sont identifiés en France (Figure 3). Deux familles de NPS se détachent, les cannabinoïdes de synthèse et les cathinones. Depuis 2013, une nouvelle famille émerge, il s'agit des nouveaux opioïdes de synthèse (NOS). Comme vous le verrez, cette famille constitue la colonne vertébrale de mon manuscrit de thèse.



Source : SCL, INPS, IRCGN, SINTES (OFDT)

Figure 3 : Nombre de NPS identifiés par famille de 2000 à 2017 en France

1.2.2 Règlementation

La règlementation des NPS est dépendante de chaque pays. En France, l'arrêté du 22 février 1990 liste les substances classées comme stupéfiant. Régulièrement de nouveaux NPS sont ajoutés à cette liste par des arrêtés ministériels.

La méphédrone a été le premier NPS classé comme stupéfiant dans l'arrêté du 7 juin 2010 modifiant l'arrêté du 22 février 1990. Deux ans plus tard, suite aux nouvelles cathinones qui circulent sur le marché français, l'arrêté est modifié. Ainsi, dans l'arrêté du 27 juillet 2012 la notion de « toute molécule dérivée de la cathinone » apparaît.

Une première liste de cannabinoïdes de synthèse est ajoutée dans l'arrêté du 19 mai 2015 puis complétée dans celui du 31 mars 2017.

Après avoir classé le AH-7921 rapidement après sa première identification le 24 septembre 2015, les dérivés du fentanyl ont été ajoutés dans l'arrêté 5 septembre 2017.

Le travail d'évaluation le plus récent mené par les Centres d'évaluation et d'information sur la pharmacodépendance (CEIP) visant à classer sur les listes des stupéfiants la diphénidine, éphénidine et méthoxphénidine suite aux nombreux cas d'intoxications a été validé lors de la commission des

stupéfiants et psychotropes de l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) [7].

1.3 Cas d'intoxication en France

Depuis quelques années, lors du congrès annuel de la Société française de toxicologie analytique (SFTA) une session est régulièrement dédiée aux NPS. De nombreux cas d'intoxications y sont rapportés impliquant des cathinones (3-MMC et l'α-PVP, seule ou en association, l'α-PHP et la 4-MEC) [8–11], des phénéthylamines (DOC et 25I-NBOMe) [12–14], une pipéridine dérivée du méthylphénidate (l'éthylphénidate) [15], une tryptamine (AMT) [16]. Des cas d'intoxications à la suite de polyconsommations de NPS de nature très variées sont également décrits, tels que des cas associant méthiopropamine, méthoxphénidine, diphénidine, D2PM, 5-MeO-DALT [17] ou méthoxetamine, MDPV et étizolam [18].
Malheureusement certaines intoxications ont une issue fatale pour le consommateur. De nombreux décès ont été rapportés impliquant des substances diverses et variées seules ou en association, telles que cathinones (3-MMC, α-PVP, 4-MEC) ou arylalkylamines (5-APB) [19–24].
Depuis 2012, l'enquête DRAMES (Décès en relation avec l'abus de médicaments et de substances) mise en place par l'ANSM est une étude annuelle prospective. Elle permet de recueillir, auprès d'experts toxicologues analystes volontaires membres de la CNBAE (Compagnie nationale des biologistes et analystes experts) et du réseau des CEIP-A (Centre d'évaluation et d'information sur la pharmacodépendance – Addictovigilance), des cas de décès liés à l'usage abusif de substances psychoactives. L'objectif est d'identifier les substances impliquées, d'évaluer leur responsabilité (voire, leur imputabilité) dans la survenue du décès. Dans cette étude DRAMES, 36 cas de décès impliquant les NPS ont été déclarés [25]. Il a été constaté une augmentation des décès liés à l'usage de NPS : en 2012 les NPS étaient impliqués dans moins de 1% des décès et en 2015 et 2016 dans 3% des cas. Quelques soient les années, les cathinones (3-MMC, 4-MEC, butylone, MDPV, méphédrone, méthylone, mexédrone, pentédrone, α-PVP) sont les plus souvent impliquées dans ces décès. D'autres familles sont également concernées : benzofuranes (5-APB, 5-APDB, 5-MAPB), arylcyclohexylamines (MXE, MXP), benzodiazépines designers (diclazépam, deschloroétizolam), NBOMe (25C-NBOMe), opioïdes de synthèse (ocfentanil), pipérazines (éthylphénidate), autres (3FPM, MPA).

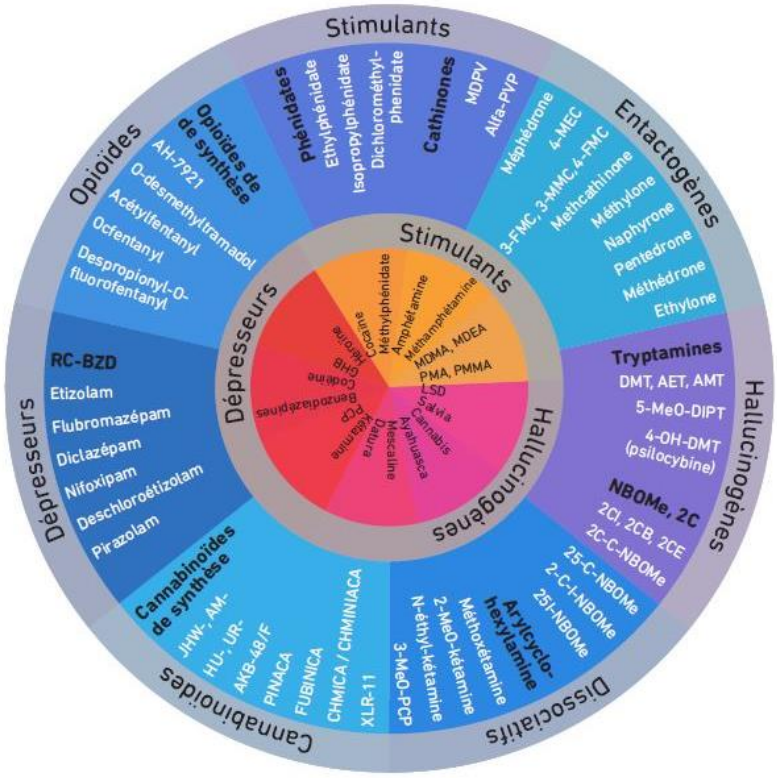
1.4 Classification

Aux vues de la multitude de NPS, plusieurs classifications peuvent être envisagées. Une classification selon leur structure chimique existe. Dans cette classification de nombreuses familles peuvent être recensées :

- Aminoindanes
- Arylalkylamines
- Benzodiazépines
- Cannabinoïdes de synthèse
- Cathinones
- Indolalkylamines
- Opioïdes de synthèse
- Phénéthylamines

- Pipérazines
- Pipéridines et pyrrolidines

Le CEIP-A de Paris a proposé une classification des NPS par leurs effets psychoactifs recherchés en les comparant aux substances psychoactives traditionnelles (Figure 4).



Cercle intérieur: Substances Psychoactives dites "classiques"
Cercle extérieur: Nouveaux Produits de Synthèse (NPS)

Source : Centre d'Addictovigilance de Paris

Figure 4 : The drug wheel, Nouvelle ère des drogues

Les substances stimulantes, telles que la cocaïne, l'amphétamine, le méthylphénidate et ses dérivés, intensifient l'activité du système nerveux sympathique, accélèrent le rythme cardiaque et induisent ainsi un sentiment d'euphorie ou/et d'éveil.

Les substances entactogènes amplifient la capacité d'empathie, la sensation de pouvoir s'exprimer librement, favorisent la communication. C'est le cas de la MDMA et de nombreuses cathinones.

Les hallucinogènes appelés aussi les psychédéliques, comme le LSD ou les dérivés de la tryptamine ou la famille de NBOMe, modifient les perceptions sensorielles (visuelles, auditives) entraînent des hallucinations, une exacerbation des sens : panique, anxiété …

Les substances dissociatives, principalement les dérivés de la kétamine, entraînent une perte de la sensation de soi-même avec sensation de « sortir de son corps ».

Les cannabinoïdes imitent les effets du tétrahydrocannabinol (THC), principale substance active du cannabis, les effets ressentis sont la relaxation, le calme, l'euphorie.

Parmi les dépresseurs, on retrouve les benzodiazépines et les « designer benzodiazépines » avec des propriétés sédatives, hypnotiques, anxiolytiques...

Et une dernière famille, celle des opioïdes, qui est dérivée de la morphine, de l'héroïne et du fentanyl, qui est présentée ci-dessous.

1.5 Les nouveaux opioïdes de synthèse

L'émergence des nouveaux opioïdes de synthèse (NOS) est très récente en Europe. Les effets recherchés sont une sensation de bien-être, d'invincibilité. Cette famille est marquée par des risques d'addiction et de toxicité aigüe élevés. En 2013, le premier NOS, le AH-7921, a été identifié en France. Depuis, chaque année, de nouveaux opioïdes de synthèse sont identifiés. A ce jour, une vingtaine de NOS a été identifiée dont la majorité sont des analogues du fentanyl (Figure 5).

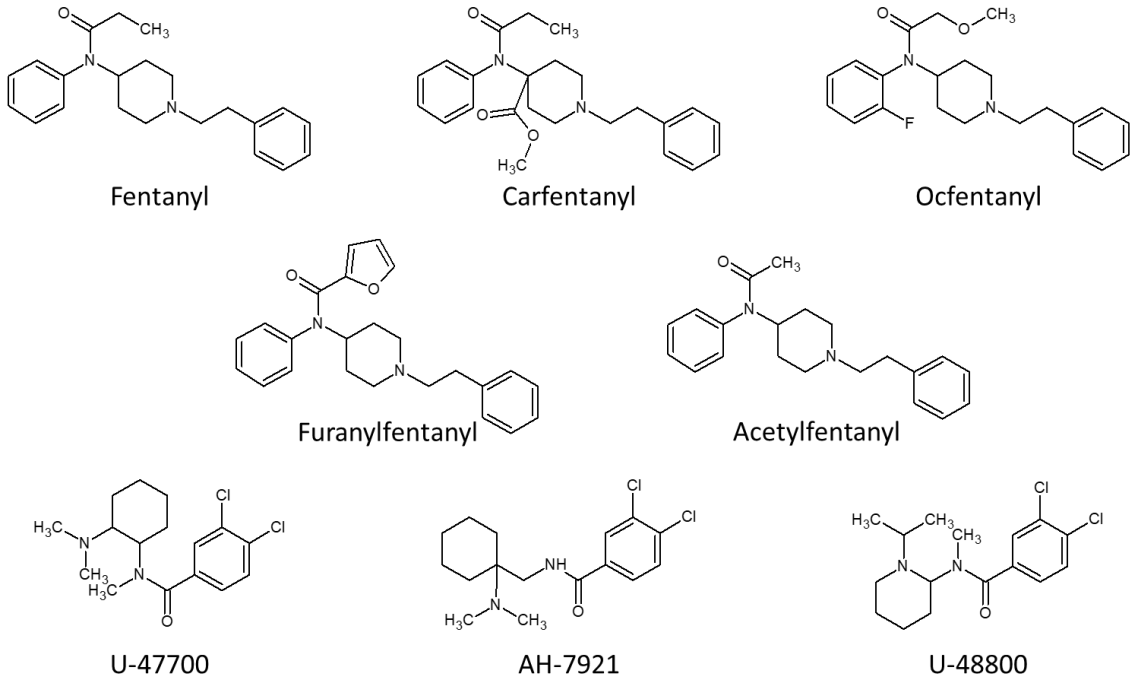


Figure 5 : Structures de quelques nouveaux opioïdes de synthèse

Depuis avril 2015, le système d'alerte précoce européeen (Early Warning System – EWS) alerte régulièrement sur des cas de décès en Belgique impliquant des NOS : ocfentanil, fentanyl, U-47700, acrylfentanyl, methoxyacetylfentanyl. Et dernièrement, ce système alerte sur le contenu d'une poudre circulant en Belgique contenant de l'ocfentanil et du W-18.

L'augmentation du nombre de nouveaux opioïdes et des nombreux cas d'intoxication et de décès alarment et préoccupent les services de santé et les services répressifs de nombreux pays [1,5].

En France, des cas d'intoxication au U-47700 [26] ou de décès dus à l'usage d'ocfentanil [25] ont déjà été rapportés dans la littérature.

Ces substances sont efficaces à très faibles de doses et sont ainsi faciles à transporter [27]. Par exemple, l'un des NOS les plus puissants est le carfentanyl. C'est un anesthésique utilisé dans le domaine vétérinaire pour de gros animaux (rhinocéros, éléphants). Il est 10 000 fois plus puissant que la morphine [28].

Les doses actives étant faibles et par conséquent les concentrations circulantes sont faibles dans le sang, par exemple les concentrations de carfentanil *post-mortem* sont de l'ordre de 0,4 à 1,6 µg/L [29] et dans les urines , le U-47700 a été dosé à 0,1 µg/L [30].

Enfin, dans cette famille de NPS, les substances mères sont régulièrement fortement métabolisées. Ainsi, les méthodes analytiques employées pour caractériser une exposition aux NOS doivent présenter des limites de détection suffisamment basses (en lien avec les faibles concentrations biologiques observées) et des biomarqueurs adaptés (substance mère ou métabolites majoritaires).

De par leur dangerosité et ces difficultés analytiques, il m'a semblé logique d'axer la présentation de mes travaux sur cette famille.

2 Les outils analytiques

2.1 La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse rapportée à leur charge électrique. De plus, la spectrométrie de masse permet également de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant. Le principe général consiste à séparer en phase gazeuse les molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) [31].

Un spectromètre de masse est constitué des parties suivantes :
- une source pour introduire et ioniser la substance à analyser
- un analyseur qui sépare les ions suivant leur rapport m/z
- un détecteur qui transforme les ions en signal électrique et amplifie le signal obtenu pour qu'il puisse être traité informatiquement.

Le couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse (CL-SM) est délicat car la spectrométrie de masse nécessite des ions en phase gazeuse et l'élimination du solvant. L'électrospray (ESI) est actuellement la méthode d'ionisation la plus fréquemment utilisée pour le couplage CL-SM permettant d'obtenir des ions en phase gazeuse à partir de molécules en solution.

2.2 Principe de l'électrospray

La phase mobile traverse un capillaire porté à un haut potentiel électrique, de l'ordre de quelques kV. Le champ électrique appliqué à la sortie du capillaire provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées, d'où le nom d'électrospray, qui traversent simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse. Sous l'action d'un flux d'azote chauffé (N_2), la phase mobile s'évapore, provoquant une diminution rapide de la taille des gouttelettes jusqu'à ne plus obtenir que des ions désolvatés de type $[MH]^+$ ou $[MH]^-$ par gain ou perte d'un proton (Figure 6).

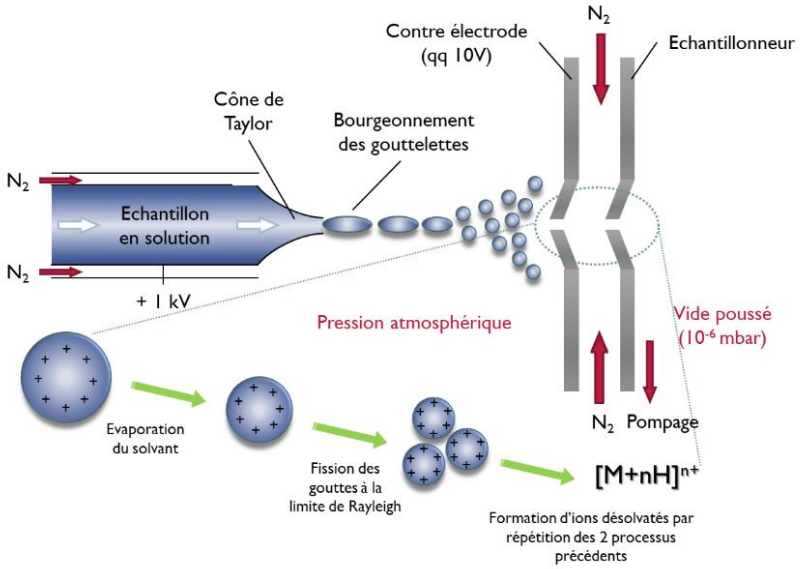


Figure 6 : Principe de l'électrospray

Les ions ainsi formés sont ensuite guidés à l'aide de potentiels électriques appliqués sur deux cônes successifs : cône échantillonneur et cône d'extraction. Durant ce parcours à pression élevée, les ions subissent de multiples collisions avec les molécules de gaz et de solvant, ce qui complète leur désolvatation. En modulant la tension au niveau du cône échantillonneur, il est possible de faire varier l'énergie des collisions et provoquer ainsi une fragmentation plus ou moins importante des ions dans la source. Ce phénomène est appelé dissociation par collision induite ou CID. (Figure 7)
Ainsi en utilisant ce processus, la source électrospray peut être utilisée pour obtenir des informations structurales caractéristiques d'un soluté.

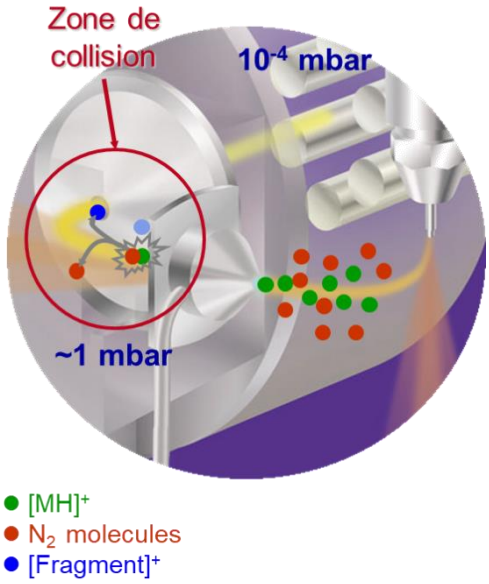


Figure 7 : Dissociation par Collision Induite (CID)

2.3 Les analyseurs

Les analyseurs permettent de séparer les ions en fonction du rapport masse/charge (m/z). Il existe des analyseurs basse résolution (quadripôle, piège à ions) et des analyseurs haute résolution, permettant de mesurer la masse exacte des analytes : le secteur magnétique couplé à un secteur électrique, temps de vol (TOF), détecteur par résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FTICR) et l'Orbitrap.
Dans mes travaux, deux types de spectromètres de masse sont utilisés, un triple quadripôle et un spectromètre haute résolution de type TOF.

2.3.1 Le quadripôle

Le quadripôle utilise la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon leur m/z. Il est constitué de quatre électrodes cylindriques parfaitement parallèles associées électriquement 2 par 2. Les deux électrodes opposées sont au même potentiel. Un potentiel sinusoïdal est appliqué à celles-ci ce qui permet de focaliser les ions. Un ion positif sera attiré vers une électrode

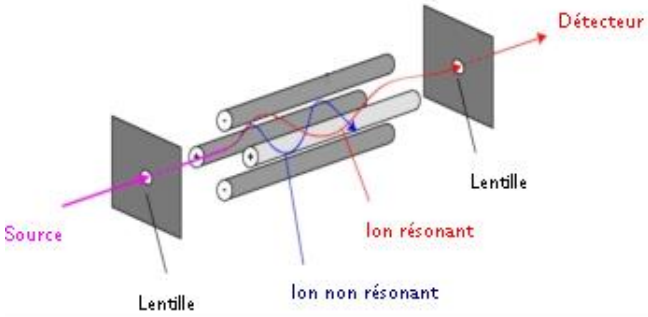


Figure 8 : Schéma d'un quadripôle

négative et inversement. Si le potentiel de celle-ci change avant que l'ion ne soit déchargé sur elle, il changera de direction et entrera en résonance. Ainsi, il traversera l'analyseur. (Figure 8)

2.3.2 Le temps de vol

L'analyseur à temps de vol, appelé « Time Of Flight » ou plus couramment TOF est un analyseur de **haute résolution**. Cet analyseur mesure le temps que les ions mettent pour parcourir le tube de vol. A la sortie de la source, les ions de m/z différents sont propulsés avec une même énergie d'accélération dans le tube de vol. Ainsi, les ions les plus légers atteignent plus rapidement le détecteur que les ions les plus lourds (Figure 9). En connaissant la longueur du tube de vol, la mesure du temps de parcours permet de déterminer la masse exacte de chaque ion.

La spectrométrie de masse haute résolution

La résolution d'un spectromètre de masse détermine la finesse des pics et donc la capacité à distinguer des pics proches. Le quadripôle est considéré comme de basse résolution et permet de déterminer une masse nominale (ex : Caféine : $C_8H_{10}N_4O_2$ = 194,19 Da). Tandis que la résolution des TOF est plus élevée et permet de déterminer une masse exacte (ex : Caféine = 194,0803 Da).

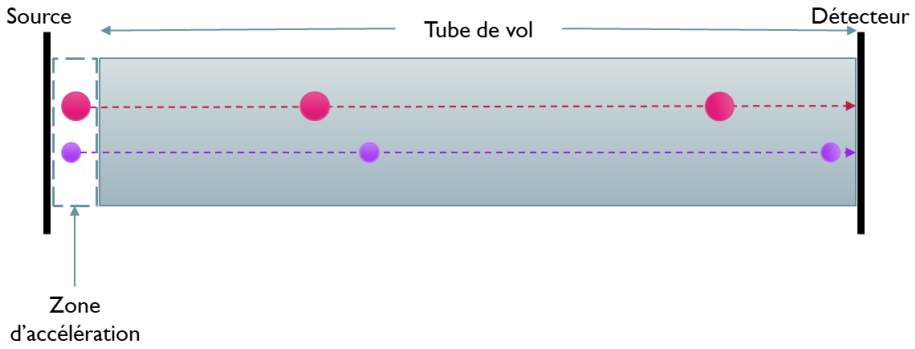


Figure 9 : Principe du TOF

2.4 Le screening

Parmi les principales activités de l'Unité Fonctionnelle de Toxicologie du CHU de Lille, le screening (ou criblage) toxicologique (recherche et identification des xénobiotiques, composés étrangers à l'organisme) est une demande courante réalisée (i) pour les services d'urgence ou de réanimation des centres hospitaliers dans le cas d'intoxication aiguë et (ii) dans le cadre d'expertises médico-légales afin de rechercher les causes de la mort (les tentatives d'autolyse sont souvent le fait d'ingestion de quantité parfois importante de divers principes actifs). Il s'agit donc de rechercher la présence de principes actifs (et de métabolites de principes actifs) de médicaments, stupéfiants et pesticides dans des prélèvements biologiques tels que le sérum, l'urine, le sang total ou le liquide gastrique. Deux approches de screening sont possibles : le screening non ciblé et le screening ciblé.

2.4.1 Le screening non ciblé en masse exacte

Le screening non ciblé ou screening large consiste à rechercher et identifier des molécules présentes dans un échantillon en comparant leurs spectres à ceux d'une librairie ou base de données. L'acquisition se fait en mode « full scan » appelé aussi balayage.

Cependant et contrairement à ce qui existe pour la chromatographie gazeuse avec détection par spectrométrie de masse (CG-SM), il n'existe pas de librairie de spectres universels pour le couplage CL-SM. La principale raison est que les géométries des sources d'ionisation sont variables d'un constructeur à l'autre et induisent des différences dans les spectres de fragmentation. Nonobstant, depuis plusieurs années, des systèmes de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (TOF, Orbitrap) se développent permettant ainsi de nouveaux champs d'investigation dans le cadre du screening toxicologique. [32–36]

Le laboratoire a acquis depuis plusieurs années un Xevo® G2-QTOF (Waters) et développé une méthode de screening ainsi qu'une base de données de spectres en masse exacte. [37]

L'acquisition est faite en mode MSe dans une gamme de masse allant de 50 à 1000 m/z. Ce mode effectue une double acquisition afin de collecter les informations de masses exactes, ions précurseurs et leurs fragments (Figure 10) :

- Fonction 1 : acquisition à faible énergie de collision (6 eV) afin d'obtenir le spectre de masse de l'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$
- Fonction 2 : acquisition à haute énergie de collision (rampe de 10 à 40 eV) dans le but de générer des fragments.

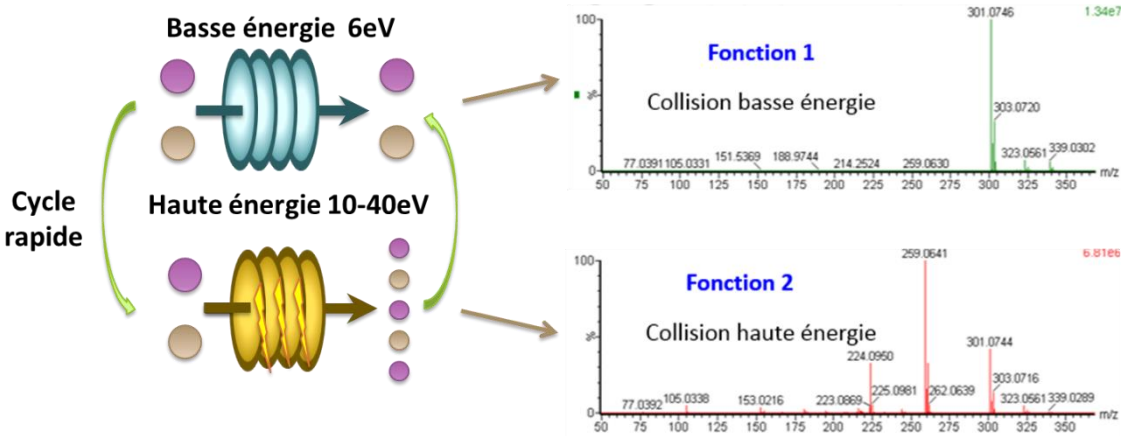


Figure 10 : Principe du mode MSe

Pour permettre l'identification des composés dans un échantillon, il est nécessaire de disposer d'une base de données renfermant des informations acquises dans les mêmes conditions analytiques.

La caractérisation repose sur la connaissance : d'une formule brute (permettant de calculer la masse exacte), d'un temps de rétention chromatographique et d'un ou plusieurs fragments spécifiques obtenus après collision.

Cette approche présente l'avantage de pouvoir retraiter rétrospectivement des données acquises en cas d'informations différées (informations sur les circonstances de l'intoxication, molécules dont les informations spectrales étaient initialement indisponibles, etc…).

2.4.2 Le screening ciblé

Dans l'Unité Fonctionnelle de Toxicologie du CHU de Lille, le screening ciblé est mis en œuvre dans différents contextes, tels que les cas d'intoxications aiguës pour des substances ayant des taux toxiques faibles mais également dans le cadre de la soumission chimique afin de rechercher spécifiquement des traces de substances psychoactives. Ainsi, le screening ciblé consiste à rechercher spécifiquement des substances d'intérêt avec un maximum de sensibilité et spécificité.

L'acquisition se fait en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring/Suivi de réactions multiples). L'ion parent d'intérêt est sélectionné dans le premier quadripôle (Q1), puis fragmenté en ions fils dans la cellule de collision, l'un de ses ions fils sera suivi dans le second quadripôle (Q2) (Figure 11).

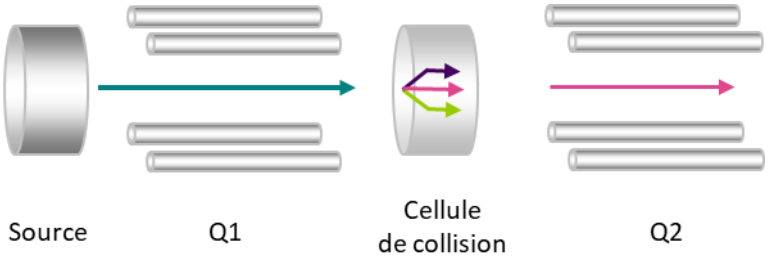


Figure 11 : Détection en mode MRM

Chaque molécule présente une fragmentation qui lui est propre. Sur la base de ces fragments spécifiques, il est donc possible d'améliorer l'identification d'un composé au sein d'un mélange complexe. Ce mode d'acquisition suit simultanément une ou plusieurs transition(s) et ne génère pas de spectre de fragmentation.

Afin de déterminer les transitions optimales et spécifiques pour chaque composé, nous utilisons préalablement le mode de daughter scan (ion fils). Dans ce mode d'acquisition de données, il s'agit de rechercher les ions fragments, ou fils d'un ion précurseur particulier. L'ion d'intérêt est sélectionné dans le premier quadripôle (Q1). Puis il est soumis à des énergies accélératrices (en eV) dans la cellule de collision qui provoque sa fragmentation. Le second analyseur (Q2) effectue un balayage sur une gamme de m/z définie ce qui permet d'obtenir un spectre de masse (Figure 12). Ainsi, les fragments obtenus après collision dans la cellule de collision proviennent de l'ion sélectionné dans le premier quadripôle.

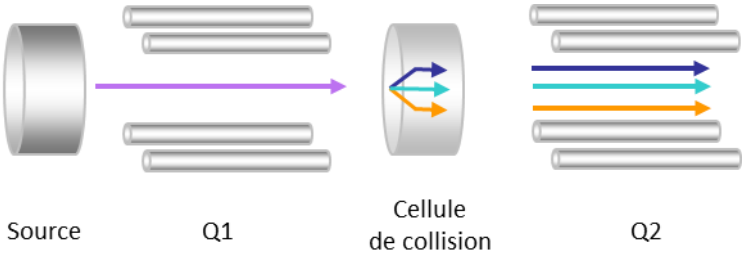


Figure 12 : Détection en mode Daughter scan

2.5 Résonance magnétique nucléaire

2.5.1 Principe

La résonance magnétique nucléaire (RMN) permet de contribuer à la détermination de la composition et de la structure d'un échantillon. La RMN repose sur les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques tels que l'hydrogène (^{1}H), le carbone (^{13}C), le phosphore (^{31}P), le fluor (^{19}F), l'oxygène (^{17}O) ou l'azote (^{14}N).

Ces noyaux ont la particularité d'être dotés d'un moment magnétique appelé également spin, assimilable à un barreau aimanté.

En l'absence d'un champ magnétique extérieur, les spins de ces atomes s'orientent de manière aléatoire à l'intérieur de l'échantillon (Figure 13 [A]). Dès qu'un champ magnétique intense est appliqué à l'échantillon, ces atomes s'orientent dans la direction du champ magnétique extérieur à l'image de l'aiguille d'une boussole dans le champ magnétique terrestre (Figure 13 [B]). La somme des champs magnétiques produits par les moments magnétiques constitue l'aimantation de l'échantillon qu'il est possible de mesurer par RMN.

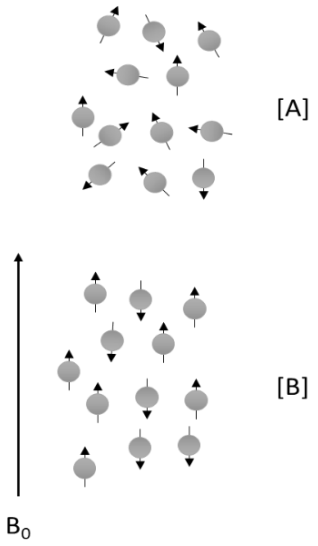


Figure 13 : Orientation des spins en fonction de la situation

Pour mesurer cette aimantation, il faut modifier son orientation par rapport au champ magnétique externe en utilisant un apport d'énergie sous forme d'ondes radiofréquences créées par une bobine supraconductrice excitatrice. Ce signal obtenu, mesuré en fonction du temps et appelé FID (Free Induction Decay ou signal d'induction libre), est traité informatiquement par transformée de Fourier pour obtenir un spectre RMN en fonction de la fréquence (Hz) (Figure 14).

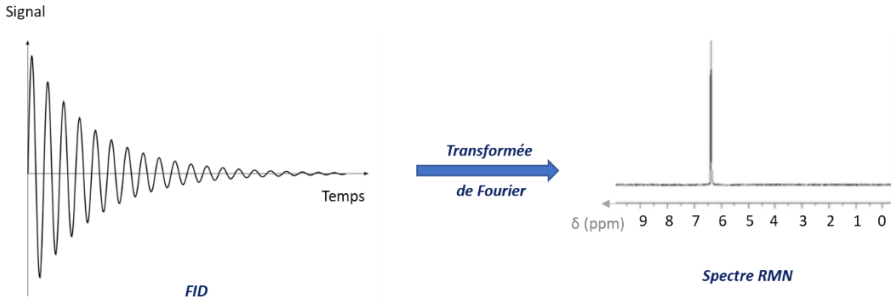


Figure 14 : Signal FID et spectre RMN

2.5.2 Description de l'appareil

Un appareil de RMN se présente comme un cylindre constitué d'une succession de couches.

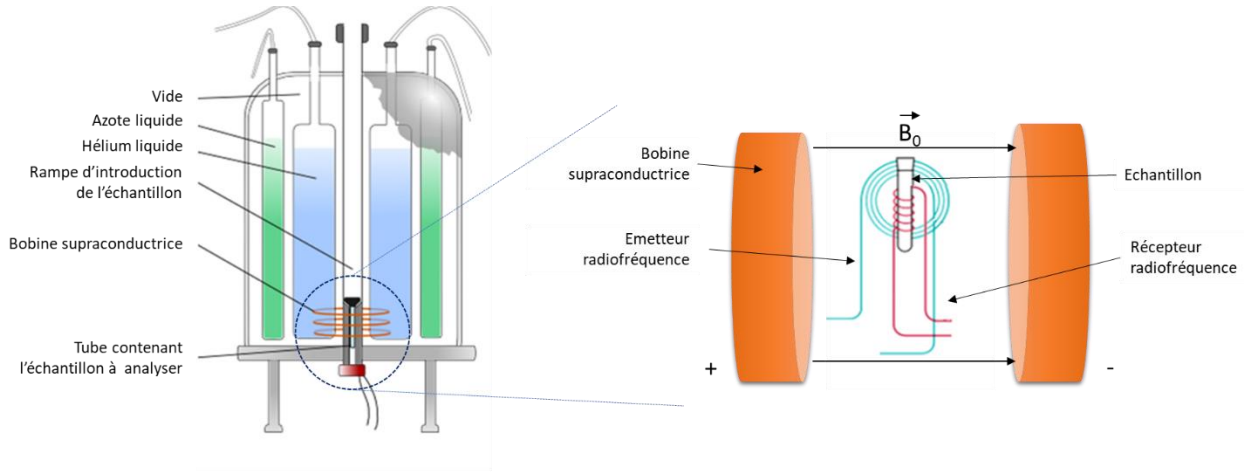


Figure 15 : Schéma d'un spectromètre RMN

La **bobine supraconductrice** utilisée pour créer un champ magnétique (B_0) de plusieurs Teslas (100 000 fois le champ magnétique terrestre) doit être maintenue à une température très basse (-273°C). Pour cela, la bobine est placée dans une enceinte d'hélium liquide. Cette enceinte est entourée d'une zone de vide et ensuite d'une seconde enceinte contenant de l'azote liquide. Ces zones de vide permettent d'éviter les déperditions de chaleur.

L'échantillon est inséré dans la rampe d'introduction de l'échantillon au centre de l'appareil à température ambiante (Figure 15).

Pour obtenir un spectre RMN, l'échantillon est donc soumis à des impulsions de radiofréquence. Le signal émis par les noyaux en résonance en retournant à leur état d'équilibre est mesuré sous forme d'un courant induit dans une bobine. Grâce à un traitement mathématique, un spectre RMN est alors généré.

> ***Bobine supraconductrice***
>
> Un matériau supraconducteur permet de conduire un courant électrique sans perte de résistance électrique (de chaleur). Pour atteindre cette performance, il est nécessaire d'être à des températures très faibles entre -118°C et -279°C. Les chercheurs utilisent une autre échelle : le Kelvin (K) (-273 K = 0°C)

Classiquement l'échantillon à analyser sous forme de poudre est mis en solution dans un solvant dépourvu de l'atome à analyser. Dans le cas de l'analyse du proton (RMN ^1H), les solvants couramment utilisés sont le méthanol deutéré ou chloroforme deutéré, respectivement CD_3OD ou $CDCl_3$.

2.5.3 Méthode quantitative

La méthode ERETIC (Electronic REference To access *In vivo* Concentrations) est une méthode alternative aux méthodes de dosage avec étalonnage interne ou ajouts dosés. Elle a été développée pour quantifier les composés *in vivo* sans nécessité d'ajout d'un composé de référence dans l'échantillon [38].

Cette méthode est basée sur une référence électronique. En effet, un pic correspondant à un pseudo signal RMN (Pseudo-FID) produit par un générateur de signal électronique est ajouté au sein du spectre du composé à quantifier.
En pratique, le composé utilisé dans cette méthode est la caféine. Une calibration est effectuée avec 15 mg de caféine dans 600 µL de $CDCl_3$ et un point de contrôle est réalisé avec 10 mg de la même substance dans 600 µL de $CDCl_3$.

Partie 2 : Travaux

1 Objectif des travaux

Les NPS constituent un phénomène qui prend de l'ampleur depuis quelques années et qui préoccupe de plus en plus les pouvoirs publics (sanitaires, en particulier).
L'objectif de ma thèse est de développer des outils analytiques pour améliorer la mise en évidence des biomarqueurs d'une exposition aux NPS.
Mes travaux qui reposent sur des approches *in vivo*, *in silico* et *in vitro* vont permettre d'établir des diagnostics lors d'intoxication aiguë et de confronter ces données biologiques à celles de la clinique observée. Cet outil doit permettre (i) l'amélioration de la prise en charge des patients et (ii) une meilleure connaissance de ces substances et de leurs dangers afin d'établir des bases de réflexion pour les autorités sanitaires. Cela permettrait la mise en œuvre d'actions de prévention auprès des usagers et également de prévoir des mesures sanitaires et réglementaires, comme par exemple par le classement sur la liste des stupéfiants. Dans ce second objectif, c'est par des collaborations variées qu'il est possible d'appréhender la connaissance des NPS consommés (dans le temps, dans des populations spécifiques ou non) à la fois par l'analyse d'échantillons non biologiques dans un contexte de veille et par des études épidémiologiques.

Dans un premier temps, je vais illustrer la stratégie mise en place combinant les approches *in vivo*, *in silico*, *in vitro* avec l'étude détaillée d'un nouvel opioïde de synthèse, le furanylfentanyl (Fu-F).
Dans une seconde partie, je présenterai les nombreuses et diverses applications de cet outil analytique.

2 Stratégie *in vitro*, *in silico* et *in vivo* : exemple du Fu-F [39]

2.1 Analyse de poudre

ARTICLE 1 (page 95)

L'Unité Fonctionnelle de Toxicologie du CHU de Lille est partenaire du dispositif SINTES piloté par l'OFDT pour effectuer les analyses d'échantillons de poudre, comprimés (≈ 140 échantillons / an).
Dans ce cadre, nous avions reçu un échantillon de quelques milligrammes d'une poudre blanche. La feuille de suivi jointe avec l'échantillon indiquait qu'il pouvait s'agir d'un opioïde de synthèse, le U-47700 (Figure 16).

OFDT OBSERVATOIRE FRANÇAIS DES DROGUES ET DES TOXICOMANIES
SINTES

Numéro de questionnaire
Feuillet blanc : à conserver
Feuillet bleu : à envoyer à l'OFDT
Feuillet rose : à envoyer au laboratoire

Laboratoire d'analyse
☒ Lille ☐ Caen ☐ Paris ☐ Marseille ☐ Autre : .....

A **INFORMATIONS GÉNÉRALES**

. Produit collecté
Date de collecte 03/05/16
Aspect ☐ comprimé ☒ poudre ☐ gélule ☐ autre .....
Couleur blanche Logo (si comprimé) .....
Quantité achetée ou reçue par l'usager 1 g ou unités
Coût total de cette quantité 115 €
Appellation sous laquelle le produit été acheté ou donné à l'usager U-47700
Contenu supposé avant consommation Opioïdes
☒ Nouveau produit de synthèse (NPS) / Research Chemicals (RC)

. Mode d'approvisionnement
☐ Revendeur habituel
☐ Revendeur occasionnel
☒ Internet (acheté directement par l'usager ☒ Oui ☐ Non)
☐ Autre

. Provenance et diffusion (provenance géographique, accessibilité, identification d'un groupe particulier d'usagers, disponibilité dans la région, etc)
2ème achat de ce produit
Réception par la Poste

Figure 16 : Questionnaire reçu avec l'échantillon

2.1.1 TOF

Dix mg de poudre ont été mis en solution dans 1 mL de méthanol et une dilution supplémentaire au 1/10 000e a été réalisée également dans du méthanol. Cent µL de cette solution en présence d'étalons internes, méthylclonazepam et β-hydroxyéthylthéophylline, ont été évaporés sous azote à froid. Le résidu sec a été repris par 100 µL de phase mobile composée d'un tampon formiate d'ammonium à 5 mM pH 3 et d'acétonitrile avec 0,1 % d'acide formique (87/13;v/v). Quinze µL ont été injectés dans le système Xevo® G2-QTOF (Waters) muni d'une colonne Acquity™ UPLC HSS C_{18} (150 x 2 mm, 1,8 µm) (Waters), thermostatée à 50°C. La séparation a été faite à l'aide d'un gradient tampon formate d'ammonium 5 mM à pH 3 / acétonitrile + 0,1 % d'acide formique avec un débit de 0,4 mL/min ; le temps d'analyse est de 15 min (Tableau 1)[37,40–42].

Tableau 1 : Gradient UPLC

Temps (min)	Tampon %	Acétonitrile %
0	87	13
0,50	87	13
10,00	50	50
10,75	5	95
12,25	5	95
12,50	87	13
15,00	87	13

Le Xevo® G2-QTOF (Waters) utilisé pour la détection est équipé d'une interface d'ionisation de type Z-spray, les paramètres du TOF sont les suivants :

- Mode d'ionisation : ESI +
- Tension de cône : 20 V
- Température de source : 140 °C
- Température de désolvatation : 500 °C
- Débit de gaz de désolvatation (Azote) : 900 L/h
- Gaz de collision : Argon

L'acquisition des données a été réalisée en mode MSe dans les conditions suivantes :

- Fonction 1 : Gamme de masse de 100 à 1000 m/z sans énergie de collision
- Fonction 2 : Gamme de masse de 50 à 1000 m/z avec une rampe d'énergie de collision de 10 à 40 eV
- Le temps de balayage est de 0,2 s par fonction

Après l'acquisition du chromatogramme (Figure 17), une analyse des composés présents dans l'échantillon a été effectuée avec le logiciel POSIT±VE qui compare les spectres du chromatogramme avec ceux de la base de données spectrales contenant 1430 molécules (stupéfiants, médicaments, NPS et pesticides).

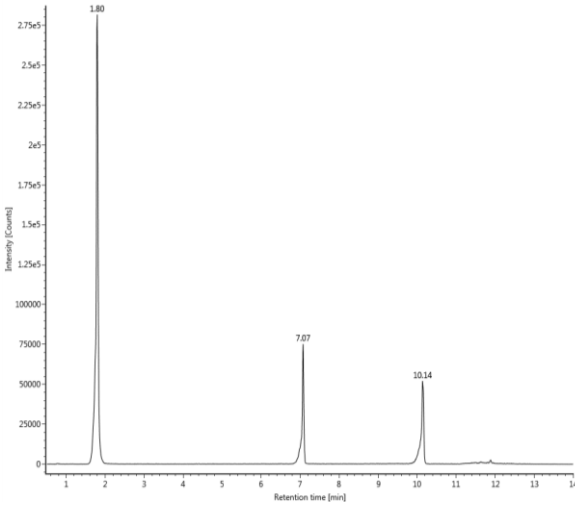


Figure 17 : Chromatogramme de la poudre blanche analysée sur le Xevo® G2 TOF

Seuls les pics correspondants aux étalons internes ont été identifiés par le logiciel : la β-hydroxyéthylthéophylline au temps de rétention (TR) de 1,80 min et le méthylclonazepam au TR de 10,14

min. Le pic au TR de 7,07 min n'a pas été identifié parmi les composés présents dans la base de données spectrales.

Une investigation manuelle des spectres (Figure 18) s'est alors avérée nécessaire pour tenter d'identifier ce composé inconnu.

Cette investigation s'est déroulée en 2 étapes :

- L'analyse de l'ion $[M+H]^+$
- L'analyse de la fragmentation

L'analyse du spectre de la fonction sans énergie de collision a permis de déterminer la formule brute du composé. Consécutivement, un outil intégré au logiciel MassLynx 4.1 a permis de proposer les formules brutes les plus probables mathématiquement en comparant la masse exacte et le profil isotopique soumis aux différentes propositions.

Pour ce pic inconnu, l'ion $[M+H]^+$ = 375,2075 était majoritaire sur l'ensemble de la gamme de masse acquise de 100 à 1000 m/z (Figure 18 [A]). La proposition faite pour ce $[M+H]^+$ = 375,2075 avec une erreur de 0,2 mDa était la formule suivante : $C_{24}H_{26}N_2O_2$, ce qui a permis d'exclure la molécule suspectée, le U-47700 ayant pour formule brute $C_{16}H_{22}Cl_2N_2O$.

Cette formule brute n'a pas suffi pour identifier le composé inconnu. Elle a été soumise à plusieurs bases de données de molécules accessibles en ligne (**PubChem** et **ChemSpider**) afin de trouver une formule développée à cette formule. Des dizaines voire des milliers de molécules candidates ont été proposées.

Pour diminuer le nombre de propositions, les fragments obtenus sur la fonction avec collision (Figure 18 [B]) ont été recherchés dans notre base de données du TOF afin de déterminer si des fragments étaient communs à d'autres molécules.

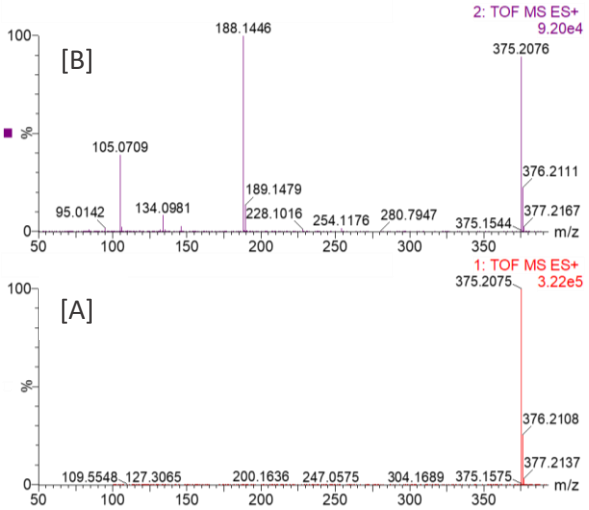


Figure 18 : Spectres de masse haute résolution de la poudre blanche analysée sur le Xevo® G2 TOF sans collision [A] et avec collision [B]

Les 2 fragments majoritaires du composé inconnu, 188,1452 et 105,0717, étaient communs avec le fentanyl. Le fentanyl est un opioïde de synthèse, tout comme la molécule initialement suspectée le U-47700. Tous ces éléments étaient en faveur de la présence d'un analogue du fentanyl (Figure 19 [A]). La recherche des formules développées s'est donc focalisée sur les analogues du fentanyl. Parmi eux, une molécule pouvait correspondre, il s'agissait du furanylfentanyl (Fu-F) (Figure 19 [B]).

PubChem et Chemspider

PubChem et Chemspider sont des bases de données de structures chimiques de petites molécules accessibles gratuitement en ligne. Elles sont composées de plusieurs millions de composés. De nombreuses informations y sont collectées : formules, noms, propriétés physico-chimiques et pharmacologiques, fournisseur, parfois des spectres UV, RMN, de masse.

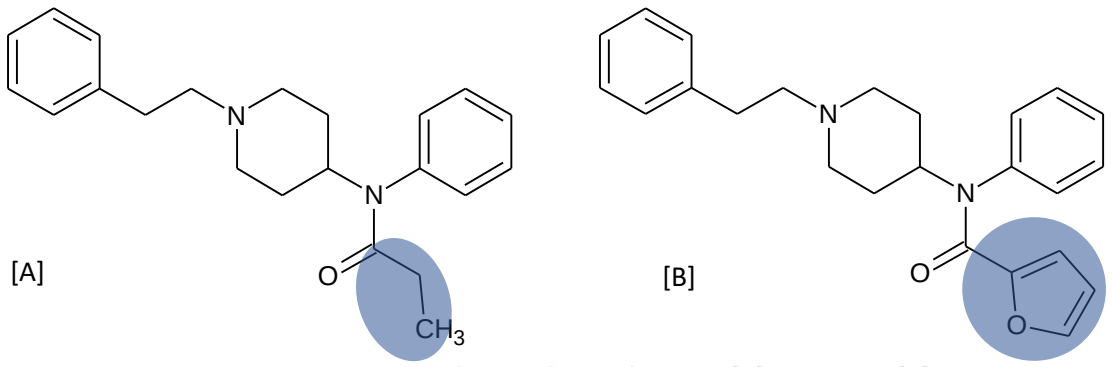
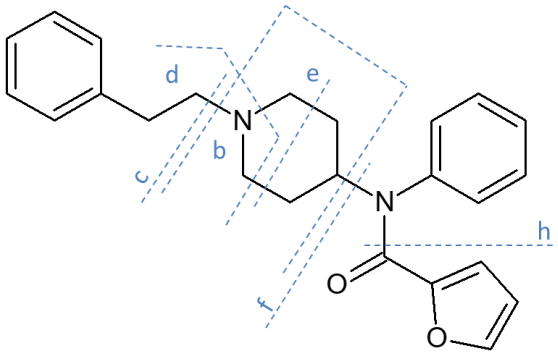


Figure 19 : Formules développées du fentanyl [A] et du Fu-F [B]

MassFragment, un 2e outil intégré à MassLynx, a alors été utilisé afin de vérifier la cohérence entre les fragments obtenus et la formule développée d'une molécule proposée, en appliquant des règles de fragmentation connues.

Le Fu-F a ainsi été soumis avec le spectre du pic inconnu. Pour chaque ion du spectre, MassFragment a proposé une fragmentation de la molécule (Figure 20). Les différences entre les masses théoriques des fragments proposés par le logiciel et celles mesurées étaient toutes inférieures à 3 mDa.



	Ion	Fragmentation
b	84,0813	Clivage du cycle pipéridine
c	105,0704	Clivage entre le cycle pipéridine et le phénéthyle
d	134,0970	Dégradation du cycle pipéridine
e	146,0970	Dégradation du cycle pipéridine
f	188,1439	Clivage entre le cycle pipéridine et le groupement N-phenylfurane-2-carboxamide
h	281,2018	Clivage du groupement furane-2-carboxamide

Figure 20 : Schéma de fragmentation du Fu-F

L'ensemble de ces différents éléments ($[M+H]^+$, fragments), laissait à penser avec quasi-certitude qu'il pouvait effectivement s'agir du Fu-F. Une recherche bibliographique a tout de même été réalisée afin de vérifier cette hypothèse. Cependant, peu de données étaient disponibles. Concernant les données acquises en masse exacte, aucune publication ne présentait les fragments [43]. La recherche a donc été élargie à la spectrométrie de masse en tandem. Les transitions décrites, 375,1 > 188,2 et 375,1 > 105 étaient cohérentes avec les 2 fragments majoritaires obtenus sur la fonction 2, 188,1 et 105, 1. [44]

2.1.2 RMN ^1H

Une analyse par RMN a été secondairement mise en œuvre pour confirmer la nature de la substance, mais également pour déterminer la pureté de l'échantillon de la poudre.

Le spectre RMN ^1H a été enregistré sur un spectromètre AVANCE™ 300 (Bruker Biospin) fonctionnant à 300 MHz équipé d'une sonde à quadruple noyau (QNP) de 5 mm à 295 K.
Le spectre RMN ^1H a été enregistré dans les conditions suivantes :

- Nombre de scans = 64
- Nombre de points = 32
- Largeurs spectrales = 4800 Hz
- Temps d'acquisition = 3,42 s
- Délai de relaxation = 2 s
- Angle de basculement = 30 °

Le signal FID mesuré a été transformé (élargissement de 0,3 Hz) et la ligne de base a été corrigée.

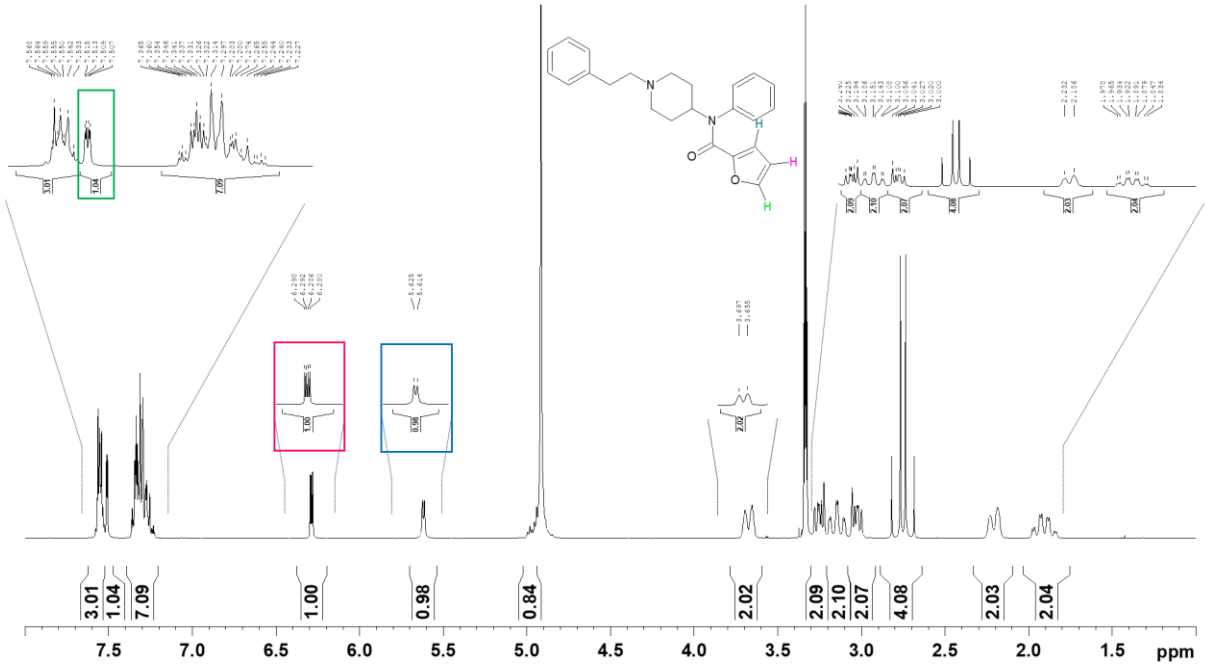


Figure 21 : Spectre RMN ^1H de la poudre blanche analysée

Le spectre RMN ^1H obtenu est composé de plusieurs signaux plus ou moins complexes sous forme de doublet, de triplet, de multiplet (Figure 21). Par exemple, sur le spectre RMN les signaux correspondants aux 3 protons du groupement du furanyl sont encadrés avec une couleur respective (vert, rouge, bleu) pour les 3 protons correspondants sur la formule.

L'analyse par RMN du proton a permis de confirmer le Fu-F proposé par l'analyse du spectre de masse exacte.
En utilisant la méthode ERETIC décrite précédemment, la teneur de Fu-F dans cet échantillon de poudre a été déterminée à 73 %.

2.2 Production des métabolites *in vitro*

Les NPS, comme la plupart des xénobiotiques, sont fréquemment hydrophobes et/ou possèdent des groupements chimiques réactifs. Afin de les rendre plus hydrophiles pour être excrétés hors de l'organisme ou pour neutraliser leur groupement réactif, ils subissent un métabolisme *in vivo* [45].
Le métabolisme des xénobiotiques se décompose en 3 phases qui aboutissent au final à l'élimination des substances exogènes dans la bile et l'urine [46].

- Phase I : Etape de fonctionnalisation (oxydation, réduction, hydrolyse) effectuée essentiellement par les cytochromes P450 (CYP). Les cytochromes responsables du métabolisme des xénobiotiques sont localisés essentiellement dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes [47].
- Phase II : Etape de conjugaison Glutathion S transférase (GST), UDP-glucuronosyltransférases (UGT) catalysent les réactions de transfert, généralement après fonctionnalisation.
- Phase III : Les enzymes de phase III sont des transporteurs membranaires (Glycoprotéine-P (P-gp), multidrug resistance proteins (MRP) …) qui éliminent de la cellule les xénobiotiques ou leurs métabolites conjugués.

Les études de métabolisme font appel à différentes méthodes *in vivo* ou *in vitro*. L'approche *in vivo* consiste à recueillir les échantillons biologiques, urine ou sang, après l'administration d'un xénobiotique à l'animal ou l'homme.
Le modèle animal ne peut donner qu'une idée du métabolisme à prévoir chez l'homme, puisque la nature et la répartition des enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques diffèrent entre les espèces [48].
Les méthodes *in vitro*, en particulier le modèle hépatique, sont fréquemment utilisées pour ces études de métabolisme. Elles incluent principalement l'utilisation de coupes d'organe, d'hépatocytes et de microsomes [49]. Deux modèles *in vivo* ont été mis en œuvre pour l'étude du métabolisme de FuF : une lignée cellulaire avec les cellules Hepa-RG et les microsomes.

2.2.1 Lignée cellulaire : Hepa-RG

Les **cellules Hepa-RG** sont ensemencées à une densité de $2{,}5.10^4$ cellules par cm^2 dans un flacon maintenu à 37°C sous une atmosphère humide avec 5 % de CO_2. Le milieu de culture utilisé est le milieu de William's E medium (Gilco) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal, 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine, 5 µg/mL d'insuline, 2 mM de glutamine et 50 µM d'hydrocortisone hémissuccinate. Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 à 3 jours.
Après deux semaines de prolifération, le milieu de culture est supplémenté avec 1,7 % de dimethylsulfoxide (DMSO) pendant deux semaines afin de favoriser la différenciation cellulaire. Les cellules différenciées sont ensuite ré-ensemencées à une densité de 6.10^5 cellules/puit dans des plaques de 12 puits.

Cellules Hepa-RG

Les cellules HepaRG ont été isolées à partir d'une tumeur d'Edmoson de grade I (carninome hépatocellulaire) développée suite à une hépatite C chronique. Ces cellules ont la particularité d'être capable de se différencier en hépatocytes et en cellules biliaires. Cette lignée cellulaire présente à elle-même un système métabolique proche du foie *in vivo* [11,12] .

Plusieurs paramètres ont été testés avec les cellules Hepa-RG :

- Concentrations : 10 µM, 50 µM et 100 µM
- Temps d'incubation : 6 H, 24 H et 48 H
- Avec ou sans éthanol

La présence d'éthanol a été testée afin d'explorer une possibilité de production de métabolites spécifiques due à la réaction avec l'éthanol (comme par exemple, la cocaïne associée à une consommation d'éthanol, produit du cocaéthylène ou le méthylphénidate qui peut se transformer en éthylphénidate).[50]

Ces différentes conditions ont été « réparties » sur 2 plaques de 12 puits. Une plaque a été dédiée aux tests avec éthanol pour éviter les éventuelles contaminations des tests sans éthanol.
Pour chaque condition, des contrôles négatifs ont été réalisés en incubant le milieu de culture sans Fu-F (Figure 22).

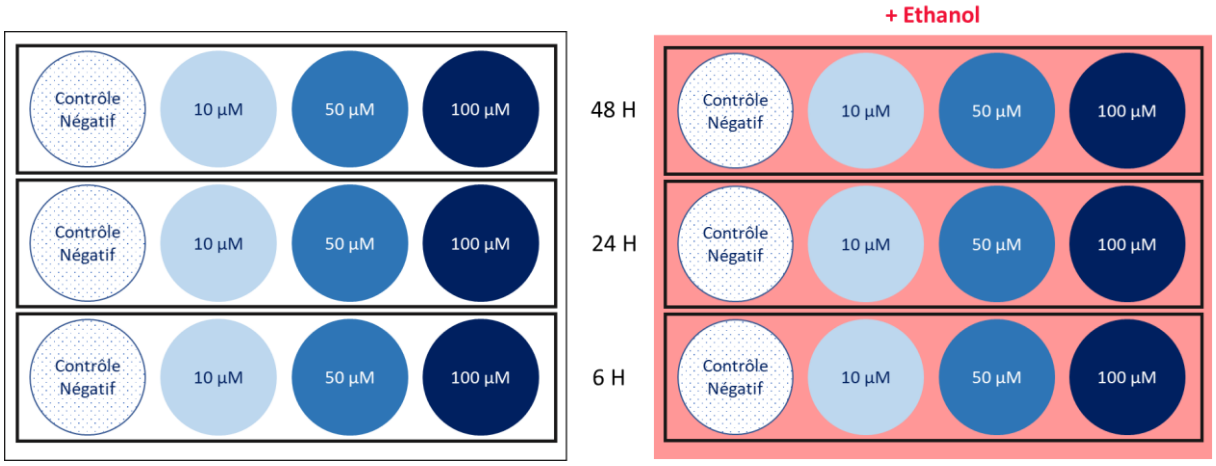


Figure 22 : Schéma des 2 plaques 12 puits pour les différents tests réalisés avec Hepa-RG

Tous les milieux de culture supplémentés de Fu-F aux différentes concentrations avec ou sans éthanol ont été préparés à H 0 (Figure 23). Au moment du renouvellement du milieu de culture supplémenté à H 0, H 24 et H 42, un aliquot de 500 µL de chaque milieu de culture a été prélevé et stocké à -20°C afin de vérifier qu'il n'y ait pas eu de dégradation du Fu-F au cours du temps.
La particularité de ce plan expérimental réside dans le fait que toutes les incubations (T = 6 H, 24 H et 48 H) doivent être stoppées simultanément en fin d'expérience (H 48) et par conséquent, ce sont les mises en incubation qui sont décalées dans le temps. Ainsi, à H 0, les milieux de culture des puits de la 1re ligne (48 H) de chaque plaque (Figure 22) sont remplacés par les milieux de culture à tester (contrôle négatif, 10 µM, 50 µM et 100 µM de Fu-F). De la même manière, à H 24 pour la seconde ligne (T= 24 H) et à H 42 pour la dernière ligne (T = 6 H). A H 48, tous les milieux sont récupérés et stockés à -20°C jusqu'à l'analyse.

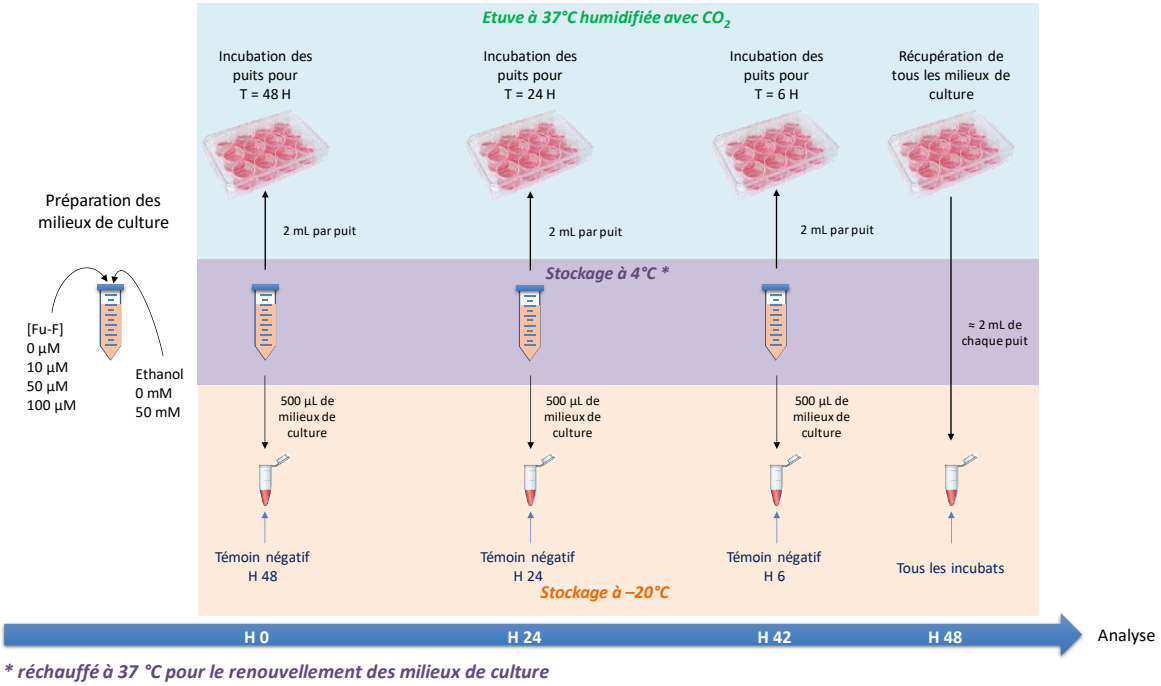


Figure 23 : Protocole réalisé pour les différents tests d'incubation du Fu-F avec Hepa-RG

2.2.2 Microsomes

Le pool de microsomes hépatiques humains (HLM) à une concentration de 20 mg de protéines/mL, incluant 11 femmes et 25 hommes, âgés de 31 à 80 ans, a été obtenu auprès de Biopredic (La Bretèche, Saint Grégoire, France) et conservé à - 80°C jusqu'à utilisation.

A l'identique des tests sur cellules Hepa-RG, 3 concentrations de Fu-F ont été testées, 10 µM, 50 µM et 100 µM.

Cinquante µL des différentes concentrations de solutions méthanoliques de Fu-F ont été évaporés sous azote. Ensuite, 50 µL d'une solution de cofacteurs (UDPGA à 5 mM, NADPH à 1,3 mM, G6P 3,3 mM et G6PD à 0,5 U/mL) dans un tampon TRIS à 0,1 M ont été ajoutés. Puis 50 µL d'une solution de microsomes à 2 mg de protéines/mL dans une solution de TRIS-HCl-$MgCl_2$ pré-activés avec de l'alaméthicine dans de la glace ont été ajoutés. Les échantillons ont été placés dans un bain-marie à 37°C pendant 1h. La réaction enzymatique a été stoppée par 100 µL de méthanol. Les échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'à leur analyse [51–53].

2.2.3 Analyses sur le TOF

L'ensemble des échantillons Hepa-RG et microsomes a été analysé avec une méthode de chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse haute résolution (CL-SMHR).

Une étape de préparation des échantillons a été réalisée avant l'injection sur le système analytique. A 100 µL d'échantillon (incubats des microsomes ou milieux de cultures des cellules Hepa-RG) ont été ajoutés 100 µL de méthanol contenant les étalons internes (méthylclonazepam à 1,25 mg/L et β-hydroxyéthylthéophylline à 16 mg/L) et 400 µL d'acide sulfosalicylique à 3 %. Les échantillons ont ensuite

été centrifugés à 4°C pendant 14 min à 32000 g. Soixante-quinze µL des surnageants ont été injectés dans le système chromatographique.

Le système analytique était composé de 2 pompes binaires permettant de réaliser une extraction de l'échantillon et ensuite une séparation chromatographique. L'échantillon était chargé dans une colonne OASIS® HLB en ligne (2,1 x 30 mm, 20 µm) (Waters) avec une solution d'ammoniaque à 0,2 % (NH_4OH) avant d'être élué à contre-courant par le gradient de phase mobile composé de tampon formiate d'ammonium 5 mM pH 3 (A) et d'acétonitrile (B). Les colonnes analytiques étaient thermostatées à 50°C et la durée d'analyse était de 18 min (Figure 24). Ces conditions analytiques sont les conditions de notre méthode de référence pour le screening des matrices biologiques [11,51,53–55].

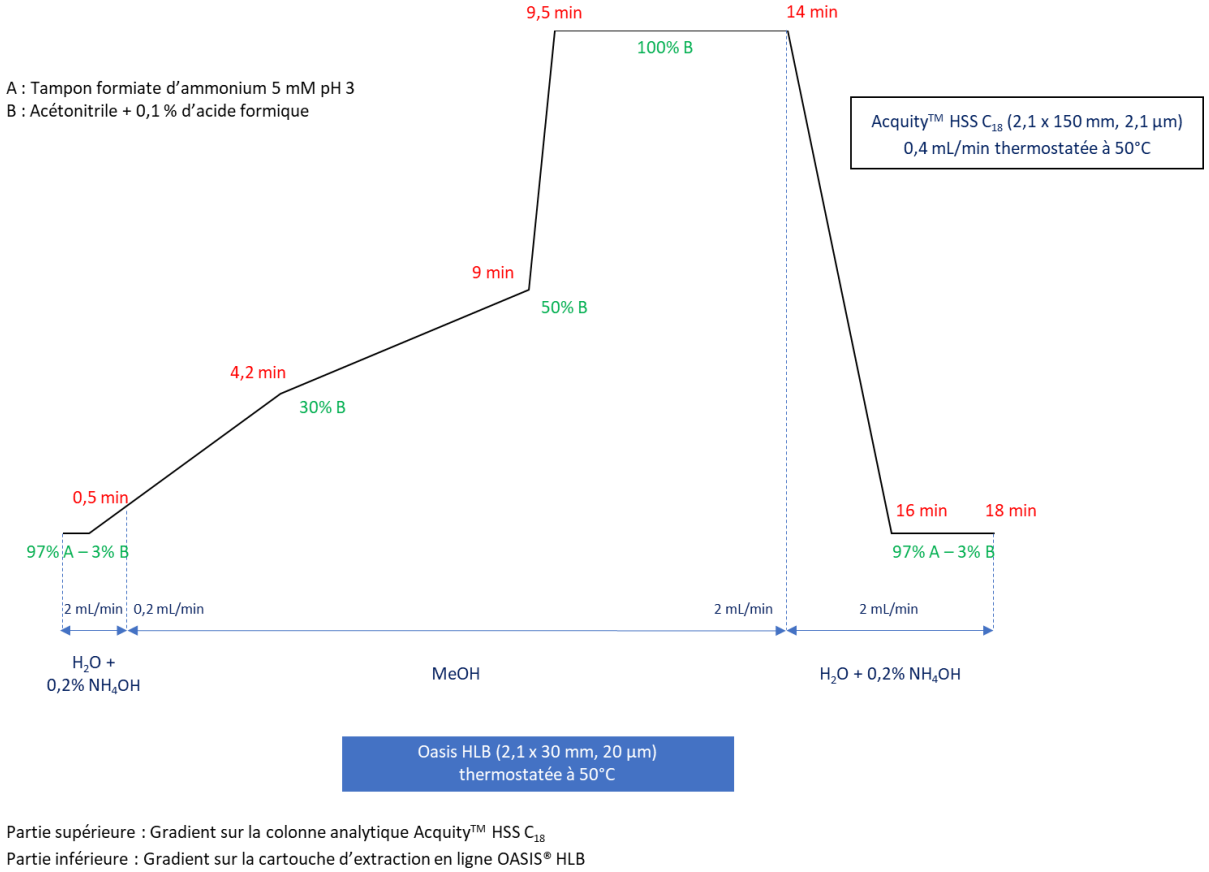


Figure 24 : Conditions chromatographiques de l'UPLC

Les paramètres d'acquisition sont identiques à ceux utilisés pour l'analyse de la poudre (*cf.* le paragraphe 1.1.1. TOF).

2.2.4 Résultats des données in vitro

L'interprétation des données acquises a été réalisée avec le logiciel Metabolynx™. Cet outil permet de prédire *in silico* les biotransformations possibles. Après avoir renseigné la formule brute et la formule développée du Fu-F, les biotransformations envisagées étaient pour la phase I l'hydroxylation, la O- ou N-désalkylation, la désamination et pour la phase II la glucuronoconjugaison (Figure 26).

En pratique, le logiciel calcule le $[M+H]^+$ de chaque métabolite candidat et recherche la présence de cet ion dans la fonction sans énergie de collision. Ce processus automatisé de profilage des métabolites a été complété par l'étude de la fragmentation des pics candidats sur la fonction 2 [52].

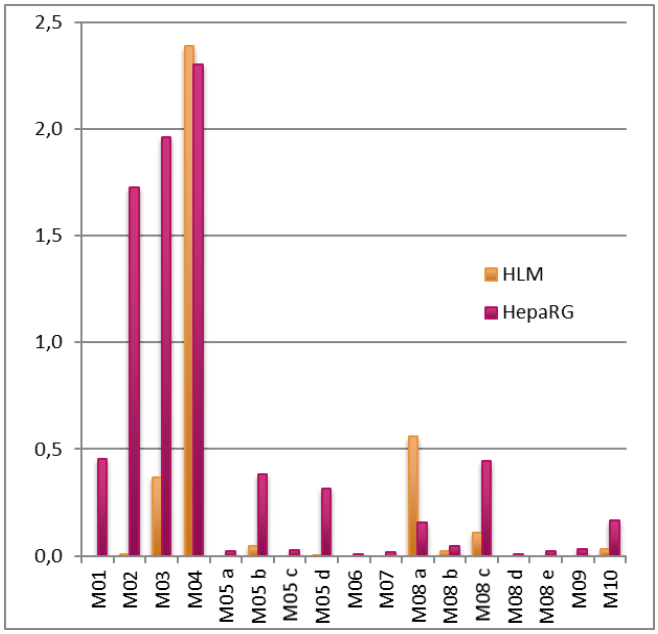


Figure 25 : Ratio des aires des métabolites/aire du Fu-F à 100 µM avec HLM et à 100 µM pendant 24 h avec Hepa-RG

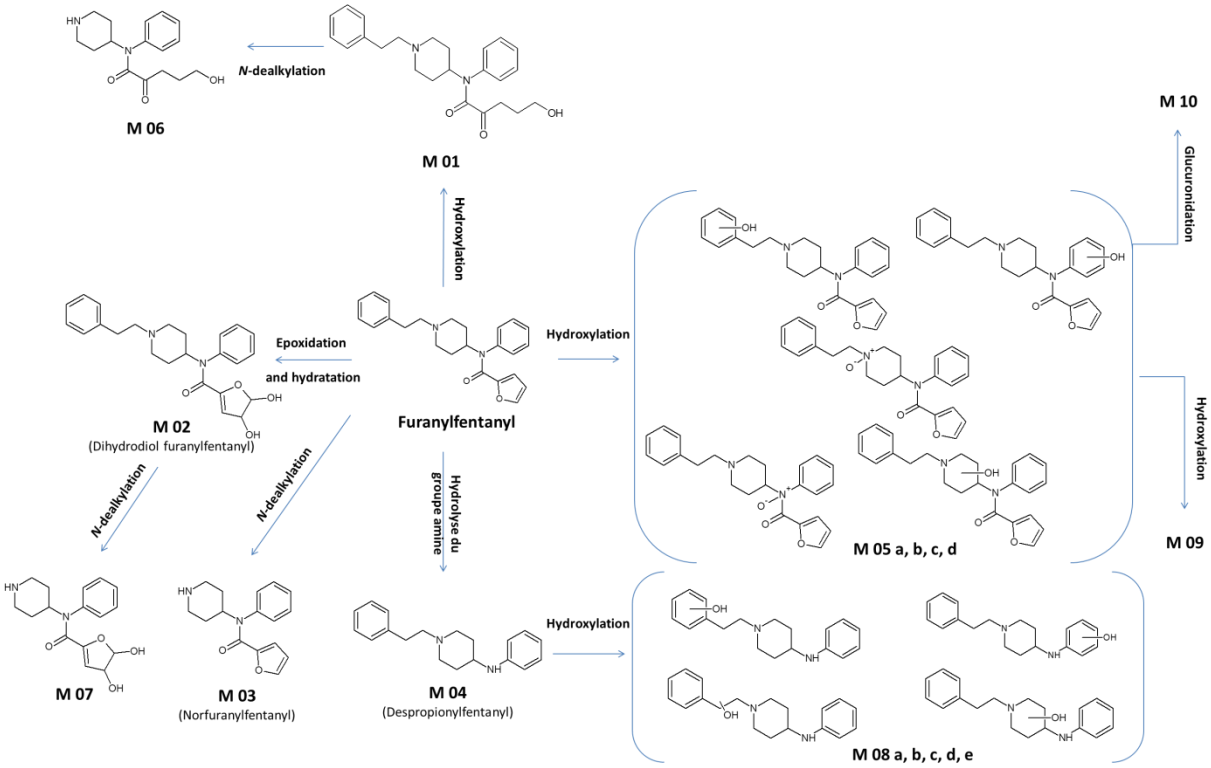
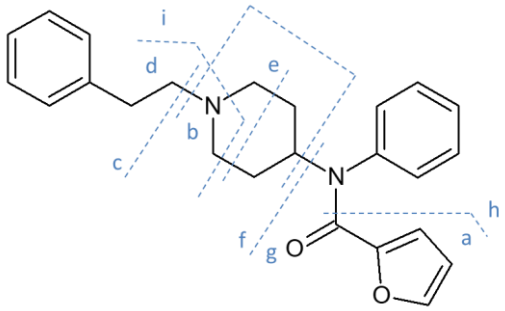


Figure 26 : Voies métaboliques du Fu-F proposées à partir de l'analyse in vitro

L'analyse des chromatogrammes des milieux de culture des cellules Hepa-RG et des microsomes a permis de mettre en évidence de nombreux métabolites. Concernant les concentrations, une production de métabolites satisfaisante a été observée après incubation de Fu-F à 100 µM avec HLM et à 100 µM pendant 24 h avec Hepa-RG (Figure 25).
Il est à noter qu'aucune différence dans le taux de production des métabolites ou la nature des métabolites n'a été observée dans les incubats avec Hepa-RG avec ou sans la présence d'éthanol.
Ce résultat n'est pas en faveur de l'hypothèse d'une production spécifique de métabolites en cas de co-consommation d'éthanol avec du Fu-F.
L'ensemble des métabolites observés (n=17) est présenté dans le Tableau 2 associé à la Figure 27 : Schéma de fragmentation des métabolites du Fu-F pour le schéma de fragmentations des métabolites.



	Fragmentation
a/h	Clivage du groupement furane-2-carboxamide
b	Clivage du cycle pipéridine
c	Clivage entre le cycle pipéridine et le phénéthyle
d/e/i	Dégradation du cycle pipéridine
f/g	Clivage entre le cycle pipéridine et le groupement N-phenylfurane-2-carboxamide
j	Elimination d'H_2O

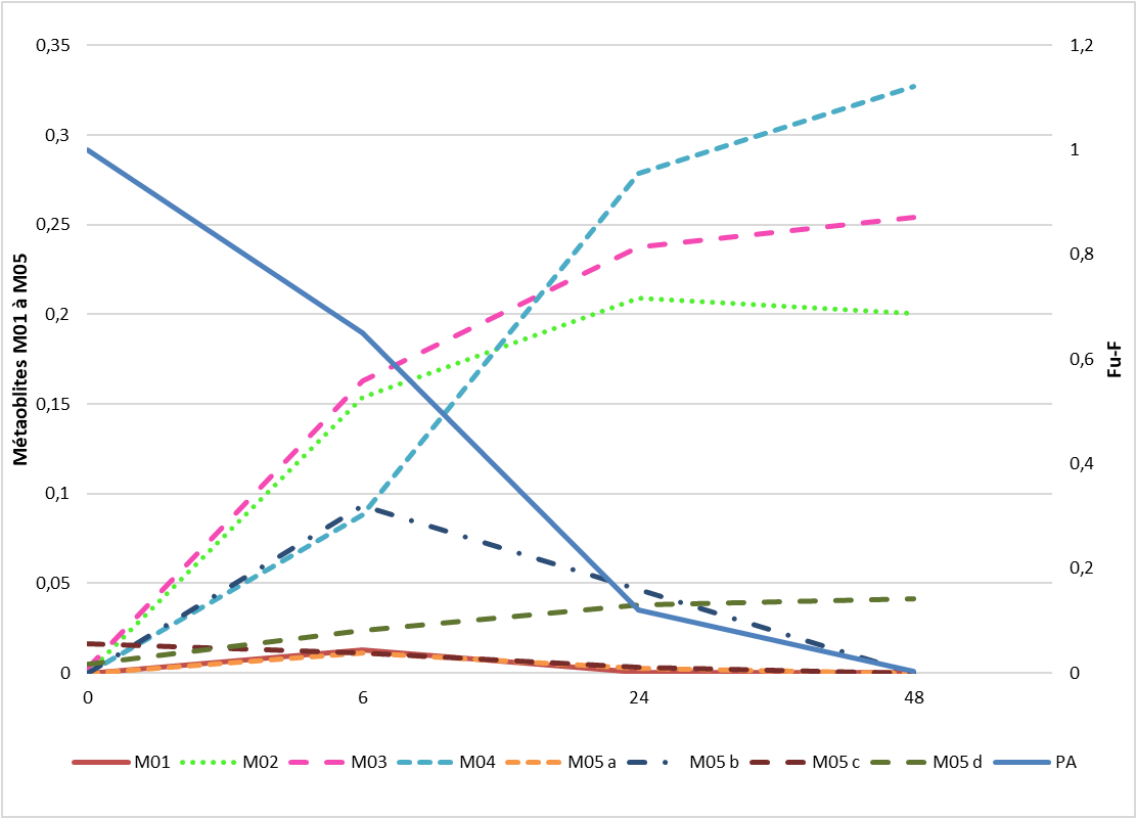
Figure 27 : Schéma de fragmentation des métabolites du Fu-F

De ces expériences *in vitro,* 3 métabolites se sont avérés majoritaires (sur la base de l'intensité des aires de leurs pics chromatographiques) : M02 (dihydrodiol-Fu-F), M03 (norFu-F) et M04 (despropionyl-fentanyl).
M02 (dihydrodiol-Fu-F) est le produit de l'époxydation et hydratation du groupe furanyle. Ce métabolite était le deuxième métabolite le plus dominant du Fu-F tel que décrit par Watanabe *et al*. qui utilisait des expériences *in vitro* avec un pool d'hépatocytes humains [56].
M03 (norFu-F) résulte de la N-désalkylation de Fu-F et sa production est cohérente avec la voie métabolique du fentanyl et des dérivés du fentanyl. Ce nor-métabolite a été également détecté « significativement » en utilisant un pool d'hépatocytes humains [56].
M04, ou despropionyl-fentanyl [1-(2-phényléthyl)-4-Nanilinopipéridine], est un métabolite connu du fentanyl résultant de l'hydrolyse de l'amide du fentanyl et qui a été rapporté par Van Rooy *et al.* [57]. Dans notre étude, M04 est le principal métabolite produit en utilisant les HLM ou les cellules Hepa-RG. De même, Watanabe *et al.* rapporte le M04 comme étant le principal métabolite de Fu-F produit *in vitro* en utilisant un pool d'hépatocytes humains [56].
D'autres métabolites (Tableau 2) sont les produits d'hydroxylation ou dihydroxylation du Fu-F (M01, M05a à M05d, M09) ou du despropionylfentanyl (M08a à M08e) et du N-désalkylation (M06, M07).
Un seul métabolite de phase II (M10) a été détecté dans cette étude et correspond à une forme glucuronoconjuguée d'un Fu-F hydroxylé. Aucun métabolite sulfate n'a été observé, bien que les cellules Hepa-RG ont été signalées comme étant capables de sulfoconjugaison [29]. En revanche, Watanabe *et al*. a observé un métabolite sulfate du despropionylfentanyl (M08-SO_4) en utilisant le pool hépatocytes humains [56].

Tableau 2 : Métabolites du Fu-F avec temps de rétention (TR), biotransformation, formule, masse exacte de l'ion précurseur $[M+H]^+$ et des fragments

	Nom	Biotransformation	Formule	$[M+H]^+$	TR	Fragmentation (Figure 20)									
						a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
Fu-F	Furanylfentanyl	-	$C_{24}H_{26}N_2O_2$	375,2067	6,45		84	105	134	146	188		281		
M01	HO-Fu-F	hydroxylation (et clivage) du cycle furane	$C_{24}H_{30}N_2O_3$	395,2329	5,35			105	134	146	188				
M02	Dihydrodiol-Fu-F	dihydrodiol furanyl fentanyl	$C_{24}H_{28}N_2O_4$	409,2122	5,41			105	134	146	188	188			
M03	NorFu-F	*N*-désalkylation	$C_{16}H_{18}N_2O$	271,1441	4,55	95	84				188				
M04	Despropionyl-fentanyl	hydrolyse	$C_{19}H_{24}N_2$	281,2012	6,36		84	105	134	146	188				
M05a	HO-Fu-F (a)	hydroxylation	$C_{24}H_{26}N_2O_3$	391,2016	5,51			121			204				
M05b	HO-Fu-F (b)	hydroxylation	$C_{24}H_{26}N_2O_3$	391,2016	5,90						204			240	373
M05c	HO-Fu-F (c)	hydroxylation	$C_{24}H_{26}N_2O_3$	391,2016	6,80						204			240	
M05d	HO-Fu-F (d)	hydroxylation	$C_{24}H_{26}N_2O_3$	391,2016	7,18			105			204			240	
M06	Nor-HO-Fu-F	N-désalkylation et hydroxylation (et clivage) du cycle furane	$C_{16}H_{22}N_2O_3$	291,1703	3,43	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
M07	NorDihydrodiol-Fu-F	N-désalkylation of dihydrodiol furanyl fentanyl	$C_{16}H_{20}N_2O_4$	305,1496	3,43	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
M08a	HO-Despropionyl-fentanyl (a)	hydrolyse et hydroxylation	$C_{19}H_{24}N_2O$	297,1970	4,16			105	134	146	188				
M08b	HO-Despropionyl-fentanyl (b)	hydrolyse et hydroxylation	$C_{19}H_{24}N_2O$	297,1970	5,30			121			204				281
M08c	HO-Despropionyl-fentanyl (c)	hydrolyse et hydroxylation	$C_{19}H_{24}N_2O$	297,1970	5,68				134	146	204				
M08d	HO-Despropionyl-fentanyl (d)	hydrolyse et hydroxylation	$C_{19}H_{24}N_2O$	297,1970	6,51	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
M08e	HO-Despropionyl-fentanyl (e)	hydrolyse et hydroxylation	$C_{19}H_{24}N_2O$	297,1970	7,01	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
M09	Di-HO-Fu-F	di-hydroylation	$C_{24}H_{26}N_2O_4$	407,1965	6,57	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
M10	Glu-HO-Fu-F	hydroxylation, glucuronidation	$C_{30}H_{34}N_2O_9$	567,2343	5,11									240	391

** schémas de fragmentation non disponibles en raison d'une production in vitro trop faible*



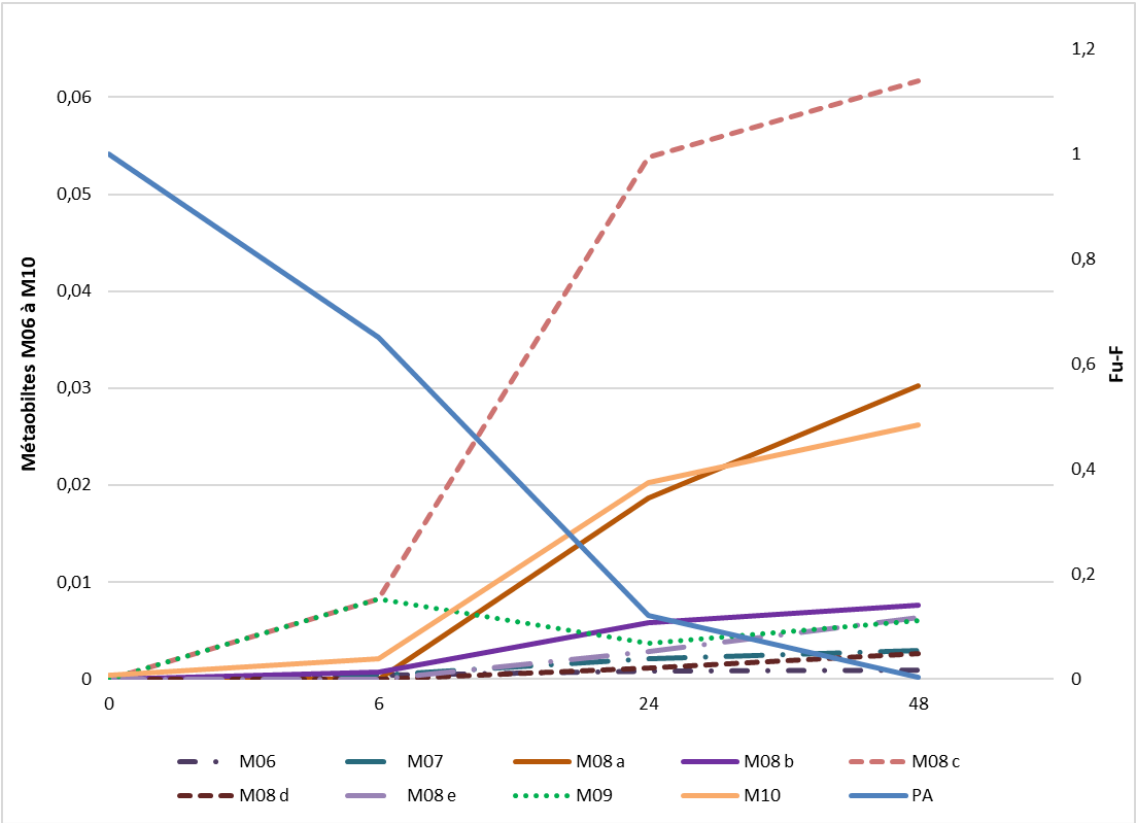


Figure 28 : Ratio des aires des métabolites du Fu-F/aire du Fu-F à H0 sur l'ensemble de la cinétique de 0 H à 48 H.

Les cellules Hepa-RG produisent un nombre plus important de métabolites (n=17) que les microsomes (n=9) (Figure 25).
En se focalisant sur les résultats obtenus sur l'ensemble de la cinétique avec Hepa-RG (6 H, 24 H et 48 H), nous pouvons remarquer que les métabolites M02, M03 et M04 sont les métabolites majeurs (Figure 28). Ce sont les premiers métabolites produits dès 6 H, les concentrations maximales sont atteintes à 48 H pour M03 et M04 tandis que pour M02, elle est atteinte à 24 H. D'autres métabolites tels que M08a, M08b, M08c et M10 sont des métabolites secondaires. Ils sont produits dans un deuxième temps après 6 H et essentiellement entre 24 H et 48 H mais leurs concentrations demeurent inférieures à celles des métabolites M02, M03, M04 produits également par HLM. L'appréciation d'une contribution « limitée » des Hepa-RG (*versus* HLM) dans le contexte de l'identification des métabolites majeurs des NPS a déjà été rapportée [58] .

2.2.5 Comparaison avec les données in vivo

N'ayant pas eu de cas d'intoxication et/ou d'exposition au Fu-F à analyser, les métabolites identifiés par l'approche *in vitro* (Hepa-RG et HLM) ont été comparés aux données *in vivo* disponibles dans la littérature (Tableau 3). M02 a été observé à des concentrations similaires à Fu-F dans 44 échantillons d'urine sur 51 obtenus auprès des utilisateurs de Fu-F [59]. Bien que M02 n'a pas été observé par Labutin *et al.* dans un échantillon d'urine d'un utilisateur de Fu-F, deux métabolites hydroxylés de M02 ($C_{24}H_{28}N_2O$ m/z = 425,2070) ont été détectés dans ce cas [60].
Concernant M03, les résultats *in vitro* ne sont pas en accord avec les observations *in vivo* : M03 a été détecté seulement dans 1 des 4 échantillons d'urine des utilisateurs de Fu-F [56]. Goggin et *al.* signalait la présence de M03 dans seulement 4 sur les 51 échantillons d'urine à des concentrations plus faibles que ceux de Fu-F [59].
M04 a été observé *in vivo* dans des échantillons d'urine d'utilisateurs de Fu-F [56]. Il a été observé à des concentrations similaires à celles du Fu-F dans 42 échantillons d'urine sur 51 [59] et sa présence était également rapportée par Labutin *et al.* dans un échantillon d'urine d'un utilisateur de Fu-F [60]. Un métabolite de type M08 a été observé dans l'urine d'un utilisateur de Fu-F [60].
Watanabe *et al.* produit un métabolite sulfate du despropionylfentanyl hydroxylé (M08-SO_4) en utilisant le pool d'hépatocytes humains, qui a également été détecté dans l'urine de Fu-F utilisateurs [56]. Un autre métabolite sulfate (m/z = 377,1534, $C_{19}H_{25}N_2O_4S$), identifié comme étant un despropionylfentanyl-SO_4 (M04-SO_4), a été trouvé dans 42 échantillons d'urine sur 51 par Goggin *et al.* à des concentrations relativement élevées (concentration urinaire moyenne de 90 µg/L contre 34 µg/L pour Fu-F) [59].
Au total, nos données récoltées *in vitro* sont cohérentes avec les données publiées sur d'autres métabolites de dérivés du fentanyl [61–64]. Ainsi par exemple, le métabolisme du carfentanil, un autre puissant analogue du fentanyl actuellement utilisé en médecine vétérinaire, a été décrit avec des réactions similaires, N-désalkylation et hydroxylation de la pipéridine comme les principales étapes métaboliques [61]. D'un point de vue expérimental, la concentration à 100 µM de Fu-F a été déterminée pour être la plus efficace pour la production de métabolites à la fois par les HLM et Hepa-RG. Elle est de même ordre que la concentration de Fu-F utilisée par Watanabe *et al*. [25] (10 µM) avec un pool d'hépatocytes humains [56]. Cette concentration utilisée pour les incubations de Fu-F est également similaire aux concentrations rapportées (allant de 5 à 250 µM) dans des études équivalentes sur le

métabolisme du fentanyl et autres dérivés : soit 10 µM pour le fentanyl [62], 100 µM pour le butyrfentanyl [63], 250 µM pour le 3-méthylfentanyl et l'isofentanyl [64] et 5 µM pour le carfentanil [61].

Tableau 3 : Comparaisons des données in vitro pour les métabolites du FuF avec celles de la littérature

	Name	Biotransformation	Formula	$[M+H]^+$	TR	**[56]**	**[59]**	**[60]**
Fu-F	Furanylfentanyl	-	$C_{24}H_{26}N_2O_2$	375,2067	6,45	✓	✓	✓
M01	HO-Fu-F	hydroxylation (et clivage) du cycle furane	$C_{24}H_{30}N_2O_3$	395,2329	5,35			
M02	Dihydrodiol-Fu-F	dihydrodiol furanyl fentanyl	$C_{24}H_{28}N_2O_4$	409,2122	5,41	✓	✓	
M03	NorFu-F	*N*-désalkylation	$C_{16}H_{18}N_2O$	271,1441	4,55	✓		
M04	Despropionyl-fentanyl	hydrolyse	$C_{19}H_{24}N_2$	281,2012	6,36	✓	✓	✓
M05a	HO-Fu-F (a)	hydroxylation	$C_{24}H_{26}N_2O_3$	391,2016	5,51	✓*		
M05b	HO-Fu-F (b)	hydroxylation	$C_{24}H_{26}N_2O_3$	391,2016	5,90	✓*		
M05c	HO-Fu-F (c)	hydroxylation	$C_{24}H_{26}N_2O_3$	391,2016	6,80	✓*		
M05d	HO-Fu-F (d)	hydroxylation	$C_{24}H_{26}N_2O_3$	391,2016	7,18	✓*		
M06	Nor-HO-Fu-F-	*N*-désalkylation et hydroxylation (et clivage) du cycle furane	$C_{16}H_{22}N_2O_3$	291,1703	3,43			
M07	NorDihydrodiol-Fu-F	*N*-désalkylation of dihydrodiol furanyl fentanyl	$C_{16}H_{20}N_2O_4$	305,1496	3,43	✓		
M08a	HO-Despropionyl-fentanyl (a)	hydrolyse et hydroxylation	$C_{19}H_{24}N_2O$	297,1970	4,16	✓*		✓*
M08b	HO-Despropionyl-fentanyl (b)	hydrolyse et hydroxylation	$C_{19}H_{24}N_2O$	297,1970	5,30	✓*		✓*
M08c	HO-Despropionyl-fentanyl (c)	hydrolyse et hydroxylation	$C_{19}H_{24}N_2O$	297,1970	5,68	✓*		✓*
M08d	HO-Despropionyl-fentanyl (d)	hydrolyse et hydroxylation	$C_{19}H_{24}N_2O$	297,1970	6,51	✓*		✓*
M08e	HO-Despropionyl-fentanyl (e)	hydrolyse et hydroxylation	$C_{19}H_{24}N_2O$	297,1970	7,01	✓*		✓*
M09	Di-HO-Fu-F	di-hydroxylation	$C_{24}H_{26}N_2O_4$	407,1965	6,57			
M10	Glu-HO-Fu-F	hydroxylation, glucuronidation	$C_{30}H_{34}N_2O_9$	567,2343	5,11			

** au moins un de ces isomères*

Le but de ce travail était de caractériser autant que possible les métabolites de Fu-F en utilisant deux approches *in vitro* différentes, c'est-à-dire la lignée cellulaire Hepa-RG et les HLM. Les deux approches semblent être complémentaires (Figure 25) et en cohérence avec des données précédemment rapportées concernant le métabolisme de Fu-F [56]. Les principales enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques, sont les CYP et les UGT [65]. Cependant, d'autres réactions enzymatiques importantes, telles que la sulfoconjugaison, la méthylation, l'acétylation ou la conjugaison au glutathion, peuvent se produire et ne sont pas étudiées en utilisant l'incubation avec les HLM seuls. A cet effet, l'association avec l'utilisation de Hepa-RG est intéressante car dans les cellules Hepa-RG différenciées, les taux des cytochromes P450 (CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6, CYP1A2, CYP2B6 et CYP2E1) ainsi que l'expression des enzymes de phase II sont similaires à ceux habituellement trouvés dans les cultures d'hépatocytes humains [66]. Ils constituent ainsi un modèle approprié pour l'étude du métabolisme hépatique des xénobiotiques [67–69].

2.2.6 Conclusion

Les études sur le métabolisme jouent un rôle important en toxicologie médico-légale. L'identification des métabolites est importante dans le défi de la détection analytique des NPS. La détection de la molécule mère seule peut conduire à des résultats faussement négatifs soit parce que le délai entre la consommation et le prélèvement est trop long soit en raison de la concentration dans le sang ou l'urine très basse généralement observée *in vivo*.
D'un point de vue analytique, il est reconnu que la CL-SMHR, contribuant grandement à l'identification de composés inconnus, montre la meilleure performance dans les études comparatives pour les tests de criblage de xénobiotiques [70,71]. Les deux approches *in vitro* (HLM et Hepa-RG), utilisées dans cette étude, sont complémentaires. Les cellules Hepa-RG produisent plus de métabolites du Fu-F que les HLM. Cependant, ces métabolites du Fu-F supplémentaires semblent être d'un intérêt mineur pour les applications *in vivo*, car ils ont été rarement observés dans les urines d'utilisateur de Fu-F [56,59,60].
En considérant les inconvénients potentiels de la mise en œuvre de la culture cellulaire, les HLM apparaissent être un outil acceptable pour une étude aisée et rapide du métabolisme *in vitro* d'un NPS, en particulier pour les laboratoires médico-légaux manquants d'équipements et d'installations adaptés à la culture cellulaire.
C'est la raison pour laquelle, dans l'ensemble de mon travail de thèse (et les autres études qui vous seront présentées dans la suite de ce manuscrit), les études de métabolisme *in vitro* ont reposé sur l'utilisation de microsomes.

Concernant cette étude du Fu-F, mes données *in vitro* suggèrent que les métabolites abondants et/ou spécifiques* du Fu-F pourraient être le dihydrodiol-Fu-F*, norFu-F* et despropionyl-fentanyl. Ces résultats sont cohérents avec ceux récemment obtenus *in vitro* par Watanabe *et al.* [56]. Cependant, le norFu-F semble être rarement observé dans d'authentiques échantillons d'urine [56,59]. En outre, les métabolites sulfoconjugués qui ne sont pas produits *in vitro* ici semblent être présents dans l'urine d'utilisateurs de Fu-F [59].
Au total, le dihydrodiol-Fu-F et le despropionyl-fentanyl pourraient être proposés comme métabolites fiables à enregistrer dans les bibliothèques de CL-SMHR afin d'améliorer la détection des utilisateurs du Fu-F, bien que des confrontations avec des données *in vivo* (provenant de cas d'intoxication) demeurent nécessaires pour confirmer définitivement la pertinence des métabolites sanguins et urinaires du Fu-F.

2.3 Applications

L'approche *in vivo, in silico, in vitro* que nous venons de détailler avec l'exemple du Fu-F, s'est déployée selon différents axes intimement imbriqués au cours de mon travail de thèse.
La présentation de ces axes vous est proposée comme suit :

- Nous venons de le voir, l'approche *in vitro* repose sur la nécessité de disposer des substances pures. A ce titre, l'analyse de poudres ou autres produits non biologiques susceptibles de contenir des NPS constitue le socle de mon travail et vous sera présentée en premier lieu.
- De par la position du laboratoire, nous sommes régulièrement sollicités et confrontés à des cas ponctuels d'intoxications/expositions aux NPS dans des contextes médicaux ou médico-légaux : je vous propose de présenter cet aspect contributif *in vivo* dans une seconde partie, avec 2 exemples dans la thématique des NOS.
- Une troisième partie sera consacrée aux applications de mon travail dans le cadre d'études clinico-biologiques et épidémiologiques.
- Enfin, je terminerai en vous proposant une série de cas d'intoxications, des études expérimentales dans le domaine des « designer benzodiazépines », avant d'élargir le champ d'application de mon projet à d'autres matrices, d'autres temps et d'autres substances.

2.3.1 Analyse de poudre

Au-delà de son intérêt épidémiologique, cette activité générale d'analyse de produits nous offre de disposer de substances toutes nouvellement « distribuées et disponibles » auprès des usagers. Ainsi, nous disposons de la faculté d'identifier des NPS non encore répertoriés par les systèmes de veille sanitaire.

2.3.1.1 SINTES

Comme précisé précédemment avec l'analyse de la poudre du Fu-F, depuis plusieurs années l'Unité Fonctionnelle de Toxicologie du CHU de Lille est l'un des laboratoires partenaires du dispositif SINTES piloté par l'OFDT pour effectuer les analyses d'échantillons de natures diverses (poudre, buvard, liquide, débris végétaux, comprimés, etc…). Les échantillons reçus sont accompagnés d'un questionnaire avec des informations sur le produit collecté (nom de la molécule suspectée, lieu d'achat, prix, effets ressentis). Il peut s'agir de drogues « classiques » (cannabis, amphétamines, cocaïne et opiacés) ou de NPS.
Les résultats présentés ci-dessous concernent uniquement les échantillions SINTES reçus au laboratoire et analysés par mes soins (CL-SMHR et RMN si besoin).

La Figure 29 présente la répartition (effectifs), basée sur les informations déclarées dans le questionnaire, entre les drogues « classiques » et les NPS de 2015 à mai 2018, mais également (zones hachurées) les discordances après analyse entre le composé suspecté et le composé identifié.

La répartition est relativement homogène sur ces 4 années entre les drogues « classiques » (54 à 62%) et les NPS (38 à 46%). Concernant les discordances entre les molécules suspectées et celles identifiées, elles sont présentes dans les 2 catégories, drogues « classiques » et NPS mais beaucoup plus marquées pour les NPS. Par exemple en 2016, dans 21 échantillons sur 48 (44%), le NPS suspecté n'a pas été confirmé contre 9% pour les drogues « classiques » (7/78). Ces discordances sont de différents types :

- Substitution du produit suspecté par un médicament ou **produit de coupe**. Par exemple, la cocaïne est remplacée par de la chloroquine ou lidocaïne.
- Autre composé identifié mais de la même famille chimique que celui déclaré. C'est le cas surtout pour les NPS avec les cathinones, les opioïdes de synthèse ou les cannabinoïdes de synthèse.
- Substitution d'une drogue « classique » par un NPS, en particulier par une cathinone.
- Aucun composé de notre base de données de masse exacte identifié.

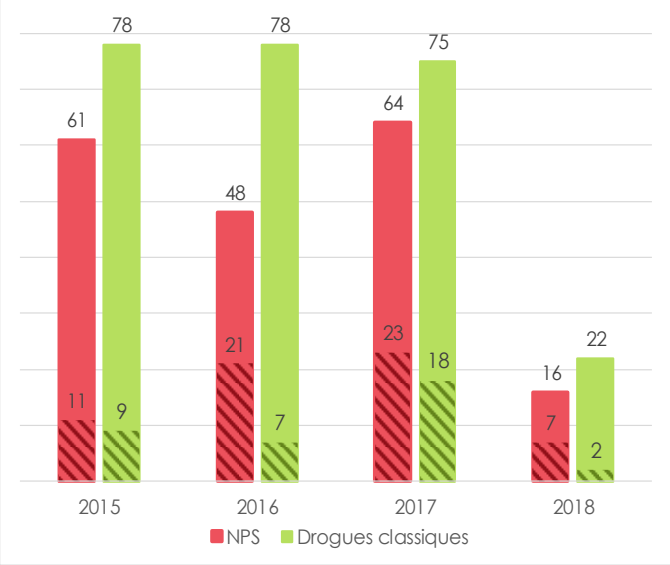


Figure 29 : Echantillons SINTES reçus et analysés au laboratoire de 2015 à mai 2018

Produits de coupe

En principe, les drogues, comme la cocaïne, l'héroïne et les amphétamines ne sont jamais consommées pures pour des raisons mercantiles. Elles sont généralement coupées, c'est-à-dire mélangées à une ou plusieurs substances (dites « de coupe ») afin d'en augmenter le volume. Habituellement, ces substances de coupe ne présentent pas d'effets pharmacologiques, comme le lactose. Cependant, certaines d'entre-elles ne sont pas dénuées d'effets : ainsi, la phénacétine, le lévamisole et la lidocaïne sont souvent utilisés comme produits de coupe de la cocaïne ; le paracétamol et la caféine pour l'héroïne ; la caféine pour l'amphétamine.

Concernant les NPS que j'ai identifiés entre 2015 et 2017, une dizaine de familles de NPS sont représentées chaque année (Figure 30). Même si les répartitions évoluent au fil du temps, plusieurs familles sont présentes chaque année (arylkylamines, arylcyclohexylamines, benzodiaépines, cathinones, opioïdes de synthèse, phénéthylamines et le groupe des pipéridines et pyrrolidines). La famille des cathinones est la famille la plus fréquemment rencontrée chaque année. Cependant, même si quelques cathinones persistent telles que, la X-MMC, la X-MEC ou la N-éthyl-hexedrone, des molécules apparaissent une année et disparaissent l'année suivante pour laisser place à d'autres cathinones. Ce même phénomène est observable pour toutes les classes de NPS (Tableau 4).

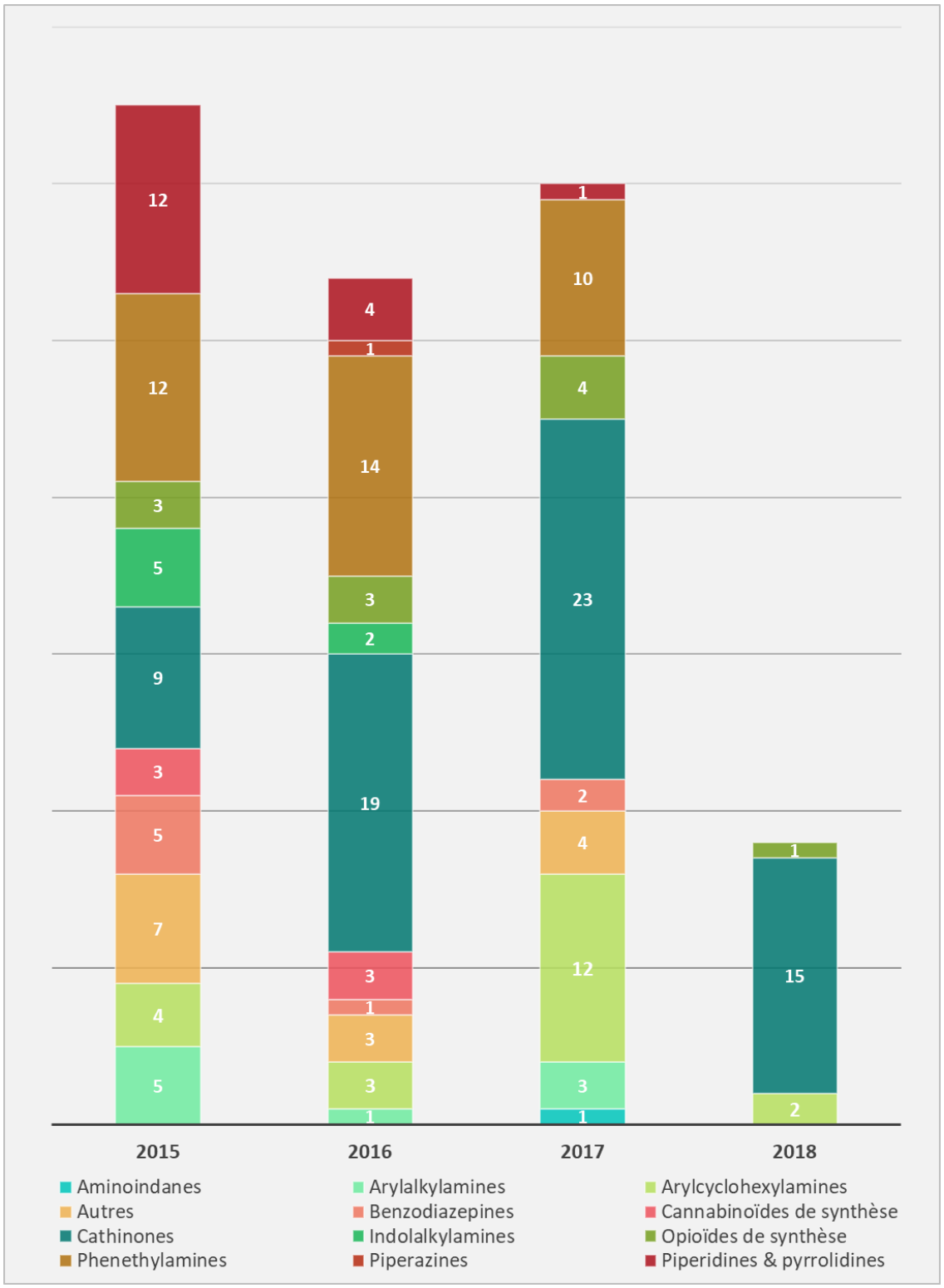


Figure 30 : Nombre de NPS identifiés, par famille, de 2015 à mai 2018

Tableau 4 : Liste des NPS identifiés dans les échantillons SINTES de 2015 à mai 2018

2015	2016	2017	2018
Aminoindanes			
		NM-2AI (1)	
Arylalkylamines			
5-APB (1) X-MAPB (1) * MPA (3)	6-APB (1)	5-MAPB (1) X-APB (1) * MPA (1)	
Arylcyclohexylamines			
Kétamine (3) X-MeO-PCP (1) *	Deschlorokétamine (1) Kétamine (1) Tiletamine (1)	2-Fluorodeschlorokétamine (2) Deschlorokétamine (1) Kétamine (9) X-MeO-PCP (1) *	Kétamine (1) X-MeO-PCP (1) *
Autres			
3-FPM (2) ALD-52 (1) LSD (4)	3-FPM (1) LSD (2)	ALD-52 (1) LSA (1) LSD (2)	
Benzodiazepines			
Clonazolam (1) Flubromazepam (1) Flubromazolam (1) Nifoxipam (1) Pyrazolam (1)	Chlorodiazepam (1)	Etizolam (1) Nifoxipam (1)	
Cannabinoïdes de synthèse			
5F-APINACA (1) AB-FUBINACA (1) MDMB-CHMICA (1)	AB-FUBINACA (1) MAM-2201 (1) JWH-210 (1)		
Cathinones			
3-MMC (1) 4-MEC (1) Hexedrone (1) MDPV (2) Mexedrone (1) α-POP (1) α-PVP (2)	2-A1MP (1) 3,4-DMMC (1) 4-CEC (1) 4-MEAP (1) 4-MEC (2) Ethcathinone (2) Flephedrone (1) MDPV (1) Methylone (2) N-ethyl-hexedrone (2) N-methylbenzedrone (2) α-PVP (2) α-PVT (1)	3-MMC (6) 4-Cl-α-PVP (2) 4-FMC (1) 4-MEC (1) X-CEC (2) * Ephylone (4) X-MEC (1) * X-MMC (2) * N-ethylhexedrone (1) Nor-mepherdone (1) α-PVP (2)	3-MMC (5) 4-Cl-N,N-DMC (1) 4-Cl-α-PVP (1) X-CEC (1) * Ephylone (1) MDPHP (4) N-ethyl-hexedrone (1) α-PHP (1)
Indolalkylamines			
5-MeO-DALT (1) AMT (1) DMT (2) Psilocine (1)	5-MeO-MIPT (1) DMT (1)		
Opioïdes de syntèse			
Acetylfentanyl (2) Methylfentanyl (1)	Fentanyl (1) Furanylfentanyl (1) Metafluorofentanyl (1)	Benzoylfentanyl (1) Fentanyl (1) U-47700 (2)	Furanylfentanyl (1)
Phenethylamines			
2C-E (6) 2C-P (2 βk-2C-B (1) DMA (1) X-Fluroroamphétamine (2) *	25B-NBOMe (1) 25C-NBF (1) 25H-NBOMe (1) 25I-NBOMe (1) 2C-B (4) 2C-C (2) 2C-H (2) DOB (1) X-Fluroroamphétamine (1) *	2C-B (5) 25I-NBOMe (1) 2C-B Fly (1) 2C-C (1) 2C-H (2)	
Piperazines			
	mCPP		
Piperidines & pyrrolidines			
Acide ritalinique (2) Ephénidine (1) Ethylphénidate (6) Isopropylphénidate (2) MXP (1)	Diphénidine (1) Ethylphénidate (1) Methylnaphtidate (1) MXP (1)	Isopropylphénidate (1)	

* Quantité d'échantillon trop faible pour réaliser une analyse RMN ^{1H} ne permettant pas de déterminer la position exacte du méthyle pour la X-MMC et X-MEC, du chlore pour la X-CEC et du fluor pour la X-fluoroamphétamine.

Ainsi, l'analyse des échantillons SINTES m'a permis de caractériser et donc d'enrichir la base de données spectrales de 52 nouveaux NPS (Tableau 5).

Tableau 5 : Nouveaux NPS ajoutés dans la base de données grâce aux échantillons SINTES

Aminoindanes (1)	Cannabinoïdes de synthèse (2)	Opioïdes de syntèse (6)
NM-2AI	AB-FUBINACA	Acetylfentanyl
Arylcyclohexylamines (3)	MDMB-CHMICA	Benzoylfentanyl
2-Fluorodeschlorokétamine	**Cathinones (17)**	Furanylfentanyl
Deschlorokétamine	2-A1MP	Metafluorofentanyl
Tiletamine	3,4-DMMC	Methylfentanyl
Autres (3)	4-CEC	U-47700
3-FPM	4-Cl-N,N-DMC	**Phénéthylamines (6)**
ALD-52	4-Cl-α-PVP	25C-NBF
LSA	4-MEAP	25H-NBOMe
Benzodiazepines (7)	Ephylone	25I-NBOMe
Chlorodiazepam	Ethcathinone	2C-B Fly
Clonazolam	Hexedrone	2C-E
Etizolam	MDPHP	2C-P
Flubromazepam	Mexedrone	**Piperidines & pyrrolidines (7)**
Flubromazolam	N-ethyl-hexedrone	Acide ritalinique
Nifoxipam	N-methylbenzedrone	Diphénidine
Pyrazolam	Nor-mepherdone	Ephénidine
	α-PHP	Ethylphénidate
	α-POP	Isopropylphénidate
	α-PVT	Methylnaphtidate
		MXP

ARTICLE 2 (page 107)

En terme de valorisation, une enquête focalisée sur les comprimés d'ecstasy a été réalisée et ces données d'analyses m'ont permis de rédiger un article centré sur la MDMA [72]. En effet depuis 2011, les comprimés de MDMA font leur retour dans les milieux festifs. Leurs présentations ont évolué afin de les rendre plus attractifs pour les jeunes usagers : formes en 3D, couleurs vives, logo… De plus, une augmentation de la quantité unitaire de MDMA a également été rapportée [73]. Après analyse de ces échantillons, les résultats obtenus mettent en évidence une augmentation des doses dans ces comprimés au cours des dernières années, mais également la présence de NPS. Ces résultats ont été présentés lors d'une communication sur invitation [74] et une présentation affichée [75].

Figure 31 : Photos de quelques comprimés d'ecstasys

2.3.1.2 CHEMSEX [41]

ARTICLE 3 (page 111)

Ce projet NPS, Slam et réduction des risques (RDR) avec le Centres d'Evaluation et d'Information sur la Pharmacodépendance de Paris (CEIP) s'inscrit dans un objectif de RDR dans le cadre de cette thèse. Cette structure a réalisé des études focalisées sur la pratique du **chemsex** et en particulier le **slam**. Ces slameurs peuvent être « expérimentateurs » ou affirmés qui, bien souvent, ignorent la composition réelle des produits qu'ils achètent et utilisent. En 2012, le CEIP de Paris a mené une étude sur des échantillons de NRG-3 (mélange de cathinones) vendus sur internet [76]. Les résultats ont confirmé des variations significatives de composition, tant qualitatives que quantitatives, des produits consommés. La gravité des complications liées à la pratique du slam implique une approche spécifique de RDR pour cette population. Le CEIP de Paris a entrepris d'étudier l'impact de la réduction des risques à travers l'analyse de produit pour la population très spécifique des slameurs. Ce projet, qui s'inscrit dans une démarche de proximité «aller vers» en s'adressant directement aux usagers et en les responsabilisant sans porter de jugement sur leurs pratiques, repose sur 3 étapes : une collecte d'échantillons accompagnée d'un questionnaire de recueil, des analyses à la fois qualitatives (substance psychoactive, adultérant) et quantitatives (pureté) des produits qui nous sont confiés et une restitution des résultats lors d'interventions auprès des usagers (action spécifique sur le thème des produits, réalisée auprès des différentes structures partenaires) avec une évaluation par un **focus groupe**. Ces trois étapes ont été réalisées en plusieurs vagues de collectes/analyses/interventions au cours d'une année. Au total, 31 échantillons ont été collectés et analysés par CL-SMHR et RMN (résultats dans le Tableau 6 : Résultats des 31 échantillons analysés, issu de l'article) [40,41,77].

Chemsex et Slam

Le chemsex désigne une consommation de produits stimulants dans un contexte de relations sexuelles. Cette pratique est souvent pratiquée par des hommes ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes (HSH). Le slam consiste à s'injecter, par voie intraveineuse ces produits psychoactifs afin de démultiplier le plaisir [38].

Focus groupe

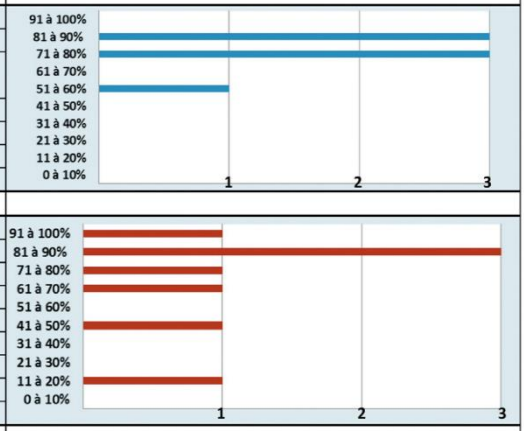
Le focus group est un entretien en groupe (d'une dizaine de personnes) qui permet de discuter autour d'un sujet ciblé. C'est une technique d'étude qualitative à l'inverse d'une étude quantitative qui repose habituellement sur un questionnaire papier.

Pour 90 % des échantillons (28/31), le composé identifié était en adéquation avec le composé suspecté. La majorité des échantillons (22/31) sont des cathinones (MMC, 4F-PVP, 4-MEC, alpha-PVP, MDPV et méthylone). La variabilité de la pureté est élevée pour la 3-MMC et la 4-MEC.
Comme dans les échantillons SINTES, la molécule suspectée n'est parfois pas confirmée par l'analyse. C'est le cas pour 3 échantillons :

- Cas n°1 : pas le produit annoncé mais de la même classe chimique (3-MMC vendu pour 4-MEC)
- Cas n°2 : pas le bon produit mais d'une classe chimique différente (5-MeO-DIPT, une tryptamine hallucinogène vendue pour α-PVP, cathinone stimulante)
- Cas n°3 : aucune substance psychoactive (PVP-8)

Tableau 6 : Résultats des 31 échantillons analysés de l'étude Chemsex

Announced product/label	Analysis	Qualitative results	Purity	Number of samples, function of purity
2-FMA		2-FMA	82%	
2-FMA		2-FMA	83%	
2-MMC		2-MMC	78%	
3,4-CTMP		3,4-CTMP	88%	
3-FPM		3-FPM	89%	
3-MMC		3-MMC	51%	
3-MMC		3-MMC	75%	
3-MMC		2-MMC or 3-MMC or 4-MMC	Not quantified	
3-MMC		3-MMC	78%	
3-MMC		3-MMC	82%	
3-MMC		3-MMC	83%	
3-MMC		3-MMC	88%	
4F-PVP		4F-PVP	89%	
4-MEC		4-MEC	13%	
4-MEC		4-MEC	45%	
4-MEC		4-MEC	69%	
4-MEC		4-MEC	71%	
4-MEC		4-MEC	83%	
4-MEC		4-MEC	86%	
4-MEC		4-MEC	89%	
4-MEC		4-MEC	100%	
4-MEC		3-MMC	71%	
alpha-PVP		5-MeO-DIPT	82%	
alpha-PVP		alpha-PVP	81%	
PVP		alpha-PVP	87%	
PVP-8		no PAS	_	
cocaïne		Cocaine/Levamisole	84%/2%	
MDPV		MDPV	80%	
Methamphetamine		Methamphetamine	81%	
Methamphetamine		Methamphetamine	97%	
Methylone		Methylone	20%	



Cette étude sur l'analyse des échantillons de poudre dans le contexte Chemsex, a permis de caractériser 5 nouveaux NPS et d'enrichir à nouveau ma base de données de spectres de masse (Tableau 7).

Tableau 7 : Nouveaux NPS ajoutés dans la base de données grâce à l'étude Chemsex

Cathinones (2)	Phénéthylamines (1)
2-MMC	2-FMA
4F-PVP	**Piperidines & pyrrolidines (1)**
Indolalkylamines (1)	3,4-CTMP
5-MeO-DIPT	

2.3.2 Etudes de cas

Concernant le volet *in vivo* de mon travail, nous sommes donc sollicités et confrontés régulièrement à des cas ponctuels d'intoxications/expositions aux NPS dans des contextes médicaux ou médico-légaux (e.g. intoxications aigües [78], recherches des causes de la mort d'origine toxique [79], cas de soumissions chimiques [80]) en association, ou non, avec d'autres psychotropes [81]).
Plutôt que d'effectuer une revue exhaustive des nombreux cas traités, je vous propose de demeurer sur la thématique des NOS à travers 2 cas.

2.3.2.1 Ocfentanil [53]

ARTICLE 4 (page 123)

Ce cas repose sur une collaboration avec le laboratoire de toxicologie du CHU de Grenoble.
Il s'agit d'une femme de 30 ans retrouvée morte à son domicile. Elle travaillait dans un hôpital et n'avait pas d'antécédents de toxicomanie. Néanmoins, un garrot, des seringues et une poudre rose non identifiée ont été retrouvés près de son corps par les policiers (sans aucune information sur le temps écoulé entre la prise de la substance et le décès). Une surdose d'héroïne a d'abord été suspectée.

Tableau 8 : Substances identifiées dans la poudre et données des cas mortels rapportés dans la littérature

Composés	Poudre rose	Coopman *et al* [82]	Dussy *et al* [83]
Ocfentanil	1,2 %	2,54 %	0,91%
Héroïne	0,6 %	nd	nd
Caféine	44 %	13,7 %	+
Paracétamol	37 %	58,4 %	+

nd : non détecté

Lors de l'autopsie, l'examen externe a révélé des sites d'injection au pli du coude droit et au pied gauche. Le médecin légiste a conclu qu'un syndrome asphyxique probablement d'origine toxique devait être à l'origine du décès. Des échantillons de sang périphérique (SP), sang cardiaque (SC), humeur vitrée (HV), bile, contenu gastrique (CG) et un prélèvement nasal (à noter, aucun échantillon d'urine n'était disponible) ont été prélevés et conservés à -20°C jusqu'à analyse toxicologique.

Tableau 9 : Concentration d'ocfentanil dans les échantillons biologiques et données des cas mortels rapportés dans la littérature

	Cas	Coopman *et al* [82]	Dussy *et al* [83]
Sang périphérique	3,7 µg/L	15,3 µg/L	9,1/7,5 µg/L
Sang cardiaque	3,9 µg/L	21,9/23,3 µg/L	27,9 µg/L
Humeur vitrée	2,0 µg/L	12,5 µL	nr
Bile	8,4 µg/L	13,7 µL	nr
Contenu gastrique	2,5 µg/L	17,1 µg/L	nr
Ecouvillon	ND	3000 ng/écouvillon	360 ng/écouvillon

nr : non réalisé

L'analyse de la poudre par CL-SM/SM a mise en évidence de l'ocfentanil (OcF), un NOS, à une teneur de 1,2 %, des traces d'héroïne et ses produits de coupe classiques, caféine et paracétamol (Tableau 8). Le contenu de cette poudre est relativement similaire avec les poudres de 2 cas de décès rapportés dans la littérature [82,83].
L'ocfentanil a été également mis en évidence par CL-MS/MS dans le sang périphérique et cardiaque, l'humeur vitrée, la bile et le contenu gastrique mais pas dans le prélèvement nasal (écouvillon). Les

concentrations sont plus faibles que les 2 cas de la littérature mais de même ordre de grandeur [82,83] (Tableau 9).

C'est dans un second temps, que j'ai été sollicitée pour réaliser un screening en masse exacte (CL-SMHR) afin d'essayer d'identifier des métabolites de l'ocfentanil (OcF). Parallèlement à l'analyse de ces échantillons, une étude de métabolisme *in vitro* avec les HLM a été réalisée selon le protocole décrit précédemment avec le Fu-F.

Cette étude *in vitro* a révélé quatre métabolites résultant de l'hydroxylation et / ou de la déméthylation et / ou de la glucuronoconjugaison : les voies métaboliques sont présentées dans la Figure 32 et les données de masses exactes sont dans la Figure 33 et le Tableau 10 :

- un OcF mono-hydroxylé (OH OcF) correspondant à l'hydroxylation (+ OH = + 15,9949 Da) du groupe phényléthyle (la position exacte de l'hydroxylation ne pas être élucidée)
- un O-déméthyl-OcF (-CH_2 OcF) correspondant à la perte du méthyle (- CH_2 = - 14,0157 Da) du groupe méthoxy
- un O-déméthyl-OcF hydroxylé (OH-CH_2 OcF) résultant à la fois de l'hydroxylation sur le groupe phényléthyle et de la perte du méthyle du groupe méthoxy (OH -CH_2 = + 1,9792 Da)
- une forme glucuronoconjuguée de l'O-déméthyl OcF (-CH_2 OcF Glu = + 162,0164 Da)

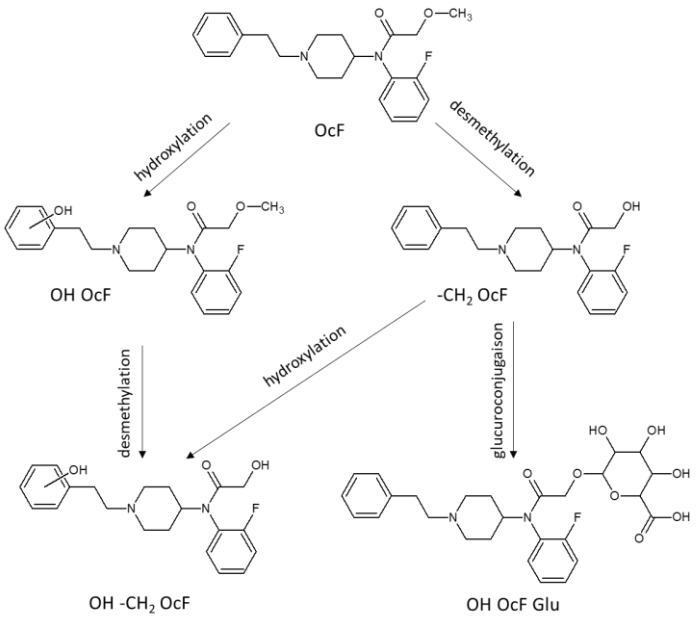
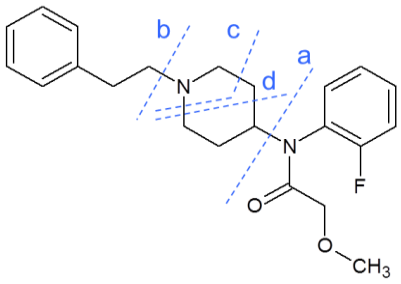


Figure 32 : Voies métaboliques de l'ocfentanil proposées à partir de l'analyse in vitro



	Fragmentation
a	Clivage entre le cycle pipéridine et le N-fluorophenyl-2-methoxyacetamide
b	Clivage entre le cycle pipéridine et le phénéthyle
c/d	Dégradation du cycle pipéridine

Figure 33 : Schéma de fragmentation de l'ocfentanil

Tableau 10 : Métabolites de l'OcF avec temps de rétention (TR), biotransformation, formule, masse exacte de l'ion précurseur $[M+H]^+$ et des fragments

Nom	Biotransformation	Formule	$[M+H]^+$	TR	Fragmentation (Figure 33)			
					a	b	c	d
OH-CH_2 OcF	O-desmethylation, hydroxylation	$C_{21}H_{25}FN_2O_3$	373,1927	4,22	204	121		
-CH_2 OcF Glu	O-desmethylation, glucuronidation	$C_{27}H_{33}FN_2O_8$	533,2299	4,62	188			
OH OcF	Hydroxylation	$C_{22}H_{27}FN_2O_3$	387,2084	4,82	204	121		
-CH_2 OcF	O-desmethylation	$C_{21}H_{25}FN_2O_2$	357,1978	5,20	188	105	134	146
OcF	-	$C_{22}H_{25}FN_2O_2$	371,2135	5,72	188	105	134	146

En s'appuyant sur l'intensité relative de la surface des pics chromatographiques, le métabolite -CH_2 OcF est clairement le principal métabolite produit *in vitro* (Tableau 11). La voie métabolique du fentanyl ou de ses analogues, comme le Fu-F, comprend habituellement la N-désalkylation (perte du phényléthyle) qui entraîne la production de norfentanyl. Pour l'OcF, un tel norOcF n'a pas été observé dans les incubats des HLM ni dans les échantillons biologiques. De même, le despropionylfentanyl [1-(2-phényléthyl) -4-N-anilinopipéridine], métabolite connu du fentanyl et de ses analogues, comme le Fu-F, issu de l'hydrolyse du fentanylamide, rapporté pour la première fois par Van Rooy *et al* n'a pas été observé [57].

Tableau 11 : Ratio de la surface des pics des métabolites / la surface du pic de l'OcF

Nom	HLM	SC	SP	Bile
OH-CH_2 OcF	0,02	0,004	0,003	*nd*
-CH_2 OcF Glu	0,04	*nd*	*nd*	*nd*
OH OcF	0,03	0,003	0,006	*nd*
-CH_2 OcF	0,34	0,31	0,50	1,2
OcF	-	-	-	-

Aucun fluoro-despropionylfentanyl n'a été observé dans les incubats des HLM ni dans les échantillons biologiques, suggérant que ce métabolite commun au fentanyl n'est pas un métabolite (majeur) de l'OcF. Enfin, un seul OcF mono-hydroxylé a été détecté, bien qu'il soit connu que l'hydroxylation peut se produire à plusieurs endroits avec la plupart des dérivés du fentanyl [56,61,63,64].

À l'exception du O-déméthyl OcF Glu, les métabolites produits *in vitro* ont été détectés *in vivo* dans le sang périphérique et cardiaque et la bile de la victime (Tableau 11). De la même manière qu'*in vitro*, le O-déméthyl OcF est le principal métabolite observé *in vivo*. En particulier dans la bile (ratio égal à 1,2) où il semble être présent à une concentration supérieure à celle de l'OcF. En conséquence, le O-desmethyl OcF pourrait être proposé comme un métabolite essentiel de l'OcF à enregistrer dans les bibliothèques de masse exacte afin d'améliorer la détection d'OcF dans les échantillons biologiques. Il va de soi que des confrontations supplémentaires aux données *in vivo* (en particulier dans des échantillons d'urine de consommateurs) sont nécessaires pour confirmer cette suggestion.

2.3.2.2 U-47700

ARTICLE 5 (page 131)

En avril 2017, une poudre inconnue a été collectée par le réseau SINTES et par la suite, livrée à des fins d'analyse dans notre laboratoire. Cet échantillon de 70 mg d'une poudre blanche était obtenu auprès d'un utilisateur de 29 ans vivant dans le sud de la France. Cet homme a déclaré que cet échantillon était un NOS obtenu gratuitement sur un site Internet et qu'il avait de puissants effets opioïdes (y compris les sentiments de bien-être émotionnel et d'euphorie). En raison de ces effets, cet utilisateur a mentionné que ce NOS pourrait être considéré comme "le crack des opiacés". Au cours de la même période, un homme de 19 ans a été retrouvé mort à son domicile dans le sud-est de la France. Plusieurs comprimés de paroxétine ont été trouvés près du corps. Les résultats de l'autopsie n'étaient pas spécifiques et le médecin légiste a conclu à un décès lié à un syndrome d'asphyxie non spécifique qui pourrait être d'origine toxique. Des échantillons biologiques (sang périphérique et cardiaque, urine, humeur vitrée, bile et contenu gastrique) ont été maintenus à - 20°C jusqu'aux analyses et envoyés au laboratoire.

Une analyse de la poudre par CL-SMHR et RMN ^{1}H a permis de caractériser un autre NOS, le U-47700. La teneur de cette poudre en U-47700 a été évaluée à 87% (Figure 34).

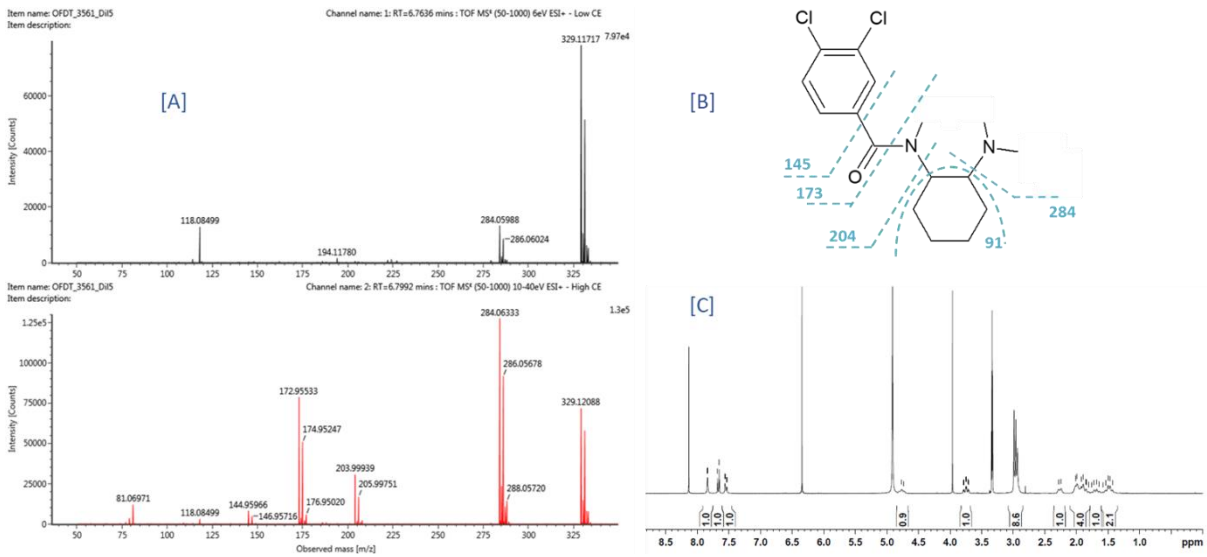


Figure 34 : Spectre du U-47700 obtenu par CL-SMHR [A] et son schéma de fragmentation [B], spectre de la RMN ^{1}H [C]

Les résultats globaux des analyses toxicologiques réalisées par CL-SMHR dans les prélèvements biologiques sont résumés dans le Tableau 12. Les médicaments détectés (paracétamol, oxazépam, dextrométhorphane et paroxétine) sont cohérents avec ceux prescrits. Les concentrations sanguines observées sont inférieures aux zones thérapeutiques pour le paracétamol, oxazépam, dans la zone pour le dextrométhorphane et légèrement au-dessus de la zone thérapeutique pour la paroxétine.
Deux NPS ont été mis en évidence en plus de ces médicaments : l'α-PHP (alpha-pyrrolidinohexanophénone) et le U-47700.

L'α-PHP est une cathinone dans laquelle le groupe amino a été substitué par un reste de pyrrolidine. L'α-PHP est un stimulant synthétique développé dans les années 1960 [84]. Depuis 2014, l'α-PHP peut être trouvé dans des échantillons de NPS vendus en ligne [42,85], a été identifié dans des matériaux saisis et/ou dans des cas d'intoxication [86–90] et le métabolisme a été récemment étudié et élucidé [91,92].

Tableau 12 : Concentration en µg/L des composés identifiés par CL-SMHR dans les prélèvements biologiques

Composé	SP	URINE	Zones thérapeutiques
Paracétamol	700	800	2 500 – 25 000
Oxazépam	30	40	150 – 2 000
Dextrométhorphane	20	100	10 - 40
Paroxétine	170	730	10 - 100
Alpha-PHP	41,7	62,8	-
U-47700	3 040	2 230	-

La concentration sanguine d'α-PHP observée (42 µg/L) est plus faible que les données rapportées précédemment dans des cas d'intoxication non mortelle : 175 µg/L (un homme présentant des hallucinations et des idées délirantes) [90] et 230 µg/L (un homme manifestant des hallucinations et de l'agitation) [93]. Il n'y a pas d'autres données rapportées sur la concentration sanguine d'α-PHP dans la littérature, en particulier dans le sang *post-mortem*.

Le U-47700 est un opioïde analgésique, synthétisé par l'industrie pharmaceutique Upjohn dans les années 70 [94], il est 7,5 fois plus puissant que la morphine [95]. Il a déjà été impliqué dans de nombreux cas d'intoxication ou de décès depuis ces dernières années aux Etats-Unis et en Europe [96–112].
La concentration d'U-47700 dans le sang périphérique *post-mortem* à 3040 µg/L semble être plus élevée que celles habituellement observées dans des cas de décès impliquant l'U-47700. Mohr *et al* rapporte 16 cas de décès avec une concentration sanguine d'U-47700 en moyenne de 253 µg/L (de 17 à 490 µg/L) [44]. Dans le sang d'un homme de 30 ans retrouvé mort chez lui, l'U-47700 a été dosé à 13,8 µg/L (intoxication combinée au fentanyl) [96]. Un décès impliquant l'U-47700 et d'autres médicaments est rapporté par Mc Intyre *et al.* : dans ce cas, la concentration d'U-47700 a été quantifiée dans le sang périphérique et central respectivement à 190 µg/L et à 340 µg/L. Des données de distribution tissulaire d'U-47700 sont rapportées à 70 µg/L dans l'humeur vitrée, 360 µg/L dans l'urine et 1,7 mg/kg dans le foie [97]. Et enfin, dans une affaire impliquant la mort d'un homme de 27 ans, la concentration d'U-47700 était de 1 460 µg/L dans le sang fémoral *post-mortem* [98].
En conséquence, cette concentration élevée dans le sang est cohérente avec l'hypothèse d'un surdosage massif d'U-47700 avec dépression respiratoire entraînant le décès du jeune homme.

J'ai parallèlement réalisé une étude du métabolisme *in vitro* du U-47700 en utilisant des HLM en suivant le protocole détaillé précédemment. Plusieurs métabolites prédits *in silico* ont été produits par les HLM et/ou identifiés dans les urines (Figure 35). Seuls le N-déméthyl-U-47700 (M01), *N, N*-didéméthyl-U-47700 (M02) et *N*-démethyl-hydroxyl-U-47700 (M03) ont été produits par les HLM. L'analyse des urines a permis de caractériser les métabolites *N, N*-Didéméthyl-hydroxyl (M04-A et M04-B) (Tableau 13). Dans le sang, les mêmes métabolites que ceux produits par les HLM ont été identifiés.

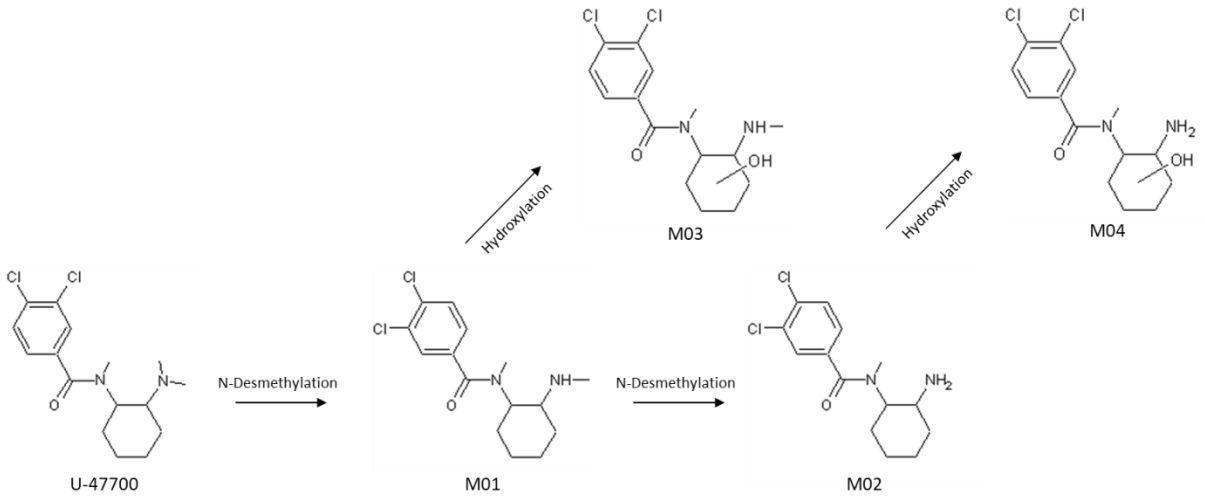


Figure 35 : Voies métaboliques du U-47700 proposées à partir de l'analyse in vitro

Tableau 13 : Métabolites du U-47700 avec temps de rétention (TR), biotransformation, formule, masse exacte de l'ion précurseur $[M+H]^+$ et des fragments

	Nom	Formule	$[M+H)^+$	TR	Fragments
Parent	U-47700	$C_{16}H_{22}N_2OCl_2$	329,1182	6,29	284; 204; 173; 81; 145
M01	*N*-Déméthyl	$C_{15}H_{20}N_2OCl_2$	315,1025	6,07	284; 204;173; 81;145
M02	*N,N*-Didéméthyl	$C_{14}H_{18}N_2OCl_2$	301,0869	5,95	284; 204; 173; 81; 145; 270; 189
M03	*N*-Déméthyl-hydroxyl	$C_{15}H_{20}N_2O_2Cl_2$	331,0975	5,64	300; 204; 173; 145
M04-A	*N,N*-Didéméthyl-hydroxyl	$C_{14}H_{18}N_2O_2Cl_2$	317,0818	5,64	300; 204; 173; 145
M04-B	*N,N*-Didéméthyl-hydroxyl	$C_{14}H_{18}N_2O_2Cl_2$	317,0818	5,09	96; 110

Quelques auteurs ont rapporté des données sur le métabolisme du U-47700 (Tableau 14). Cette étude confirme, comme suggéré par Jones *et al.*, que les étapes de métabolisation de phase I, N-déméthylation de l'amine tertiaire suivie de l'hydroxylation du cycle cyclohexane, sont les principales étapes de métabolisation [109]. Krotulski *et al.* rapporte que le N-Déméthyl-U-47700 (M01) est le principal métabolite [108]. Il a été systématiquement détecté dans le sang ou dans l'urine en cas d'ingestion d'U-47700 [98,108–112]. À la vue des ratios déterminés (surface du pic chromatographique du métabolite par rapport à celle du U-47700), le métabolite M01 est le métabolite majoritaire dans les 2 études *in vitro* (1,73 et 19,8) et très souvent *in vivo*, en particulier dans l'urine (n = 8, 0,8 ; >1 ; 1,4 ; 1,9 ; 3,6 ; 4,9 ; 6,6 et 14,2). Le métabolite N, N-Didéméthyl-U-47700 (M02), a également été rapporté dans des études antérieures. Tout comme M01, le signal chromatographique de M02 est supérieur à celui du U-47700 (ratio > 1). M01 et M02 ont subi une hydroxylation pour former le N-Déméthyl-hydroxyl-U-47700 (M03) et le N, N-Didéméthylhydroxyl-U-47700 (M04). Dans mon étude de cas, M04 donne lieu à deux pics chromatographiques, ce qui était prévisible en raison de plusieurs sites d'hydroxylation possibles. Selon les résultats de l'étude *in vitro* (très faibles quantités détectées par Krotuslki *et al.* et non détectées dans notre étude) ainsi que la détection *in vivo* (ratio >1 n'a été observé que dans 50% des urines pour M04 et dans 1 cas sur 8 pour M03), ces 2 métabolites hydroxylés du U-47700 semblent d'importance mineure.
Dans mon étude *in vitro* tout comme dans les cas rapportés, les métabolites sont des produits majeurs d'élimination d'une consommation de U-47700. Le *N*-Déméthyl-U-47700 (M01) et le N,N-Didéméthyl-U-47700 (M02) sont des métabolites qui doivent être intégrés dans les bases de données spectrales pour améliorer l'efficience de la détection de prise d'U-47700.

Tableau 14 : Comparaisons de mes données avec celles de la littérature

Ech	CAS	M01	M02	M03	M04
HLM	Etude rapporté	+ (1,73)	+ (0,07)	+ (0,01)	
	Krotulski *et al.*	+ (19,8)	+ (4,57)	+ (0,04)	+ (0,06)
SANG	Cas rapporté	+ (0,26)	+ (0,24)	+ (0,04)	
	Seither *et al.*	+			
	Favretto *et al.*	+ (>1)	+ (>1)	+ (≤1)	+ (≤1)
	Elliot *et al.*	+	+		
	Jones *et al.*	+ (0,11)			
URINE	Cas rapporté	+ (6,60)	+ (5,30)	+ (2,20)	+ (3,26/2,60)
	Fleming *et al.*	+	+		
	Favretto *et al.*	+ (>1)	+ (>1)	+ (>1)	+ (≤1)
	Elliot *et al.*	+	+		
	Jones *et al.*	+ (4,98)	+ (1,57)	+ (1,13)	+ (0,62)
	Krotulski *et al.* case #1	+ (1,92)	+ (0,71)	+ (0,36)	+ (0,29)
	Krotulski *et al.* case #2	+ (3,57)	+ (0,86)	+ (0,64)	+ (0,18)
	Krotulski *et al.* case #3	+ (0,84)	+ (0,18)	+ (0,16)	+ (0,08)
	Krotulski *et al.* case #4	+ (14,3)	+ (5,86)	+ (1,86)	+ (1,86)
	Krotulski *et al.* case #5	+ (1,43)	+ (0,36)	+ (0,19)	+ (0,14)

2.3.3 Etudes clinico-biologiques et épidémiologiques

Les données épidémiologiques et cliniques concernant les NPS demeurent rares, en particulier en France [113]. Par le biais d'études dans des populations à risques, cet aspect de la thèse s'attache à apporter des éléments de réponse aux questions suivantes : quels sont les NPS consommés, par qui (sur une période définie) et quels sont les autres psychotropes éventuellement associés ?

2.3.3.1 Etudes clinico-biologiques

Dans le domaine de la toxicologie clinique, j'ai travaillé en collaboration avec le centre antipoison (CAP) de Bordeaux dans le cadre d'études prospectives, FERIATOX et MUSITOX.

De nombreuses substances psychoactives, parmi lesquelles de nouveaux produits de synthèse, peuvent être responsables d'intoxications dans des rassemblements festifs, tels que les ferias ou festivals de musique [114].

L'objectif principal de ces projets est d'identifier les principales molécules psychoactives (et leurs métabolites) responsables des tableaux cliniques les plus graves et de décrire ces tableaux cliniques pour en améliorer la prise en charge ultérieure, notamment dans les postes médicaux avancés (PMA) mis en place lors de tels évènements festifs.

Les objectifs secondaires sont épidémiologiques (déterminer les molécules qui circulent dans les évènements festifs afin de mettre en place des actions de prévention) et analytiques (mettre en place des méthodes analytiques de dépistage, avec des étalons de référence), en lien direct avec le sujet de cette thèse.

2.3.3.1.1 FERIATOX

Le projet **FERIATOX** concerne les « ferias » du Sud-Ouest [115].
Après avis favorable du comité de protection des personnes (CPP), une étude prospective a été conduite (sous la direction du CAP de Bordeaux) au cours de deux **ferias** (Figure 36) :

- Dax du 12 au 16 août 2015
- Mont de Marsan 22 au 26 juillet 2015, appelée aussi fêtes de la Madeleine

Figure 36 : Ferias de Dax et Mont de Marsan

Les patients admis en PMA avec des troubles neurologiques et/ou du comportement évocateurs d'une prise de substances psychoactives et/ou rapportant (lui ou son entourage) avoir consommé des substances psychoactives étaient inclus dans l'étude. À l'issue d'une mesure de la glycémie systématiquement réalisée dans ce contexte, quelques gouttes de sang capillaire ont été déposées sur un papier buvard (DBS : Dried Blood Spot) et si possible, un prélèvement urinaire (UR) et un prélèvement capillaire (CHV) ont été collectés.
Au total, 27 patients, majoritairement des hommes de 15 à 30 ans, ont été inclus dans l'étude : 19 pour la féria de Mont de Marsan et 8 pour la féria de Dax. Il n'y a eu aucun décès et aucune admission en réanimation.

> ***Feria***
>
> Les férias sont des fêtes traditionnelles dans le Sud-Ouest de la France, en Espagne, au Portugal et Amérique du Sud. En France, ces jours de festivité rassemblent des centaines de milliers de personnes et mélangent spectacles de tauromachies, manifestations musicales, folkloriques et sportives.

Les échantillons, 27 DBS, 24 prélèvements de cheveux et 14 prélèvements urinaires, nous ont été adressés pour analyser et identifier une éventuelle cause toxique par une ou plusieurs substances psychoactives en rapport avec le tableau clinique présenté par le patient.

Une étape d'extraction est indispensable avant l'analyse, les protocoles de préparation d'échantillons sont spécifiques pour chaque matrice (DBS, UR et CHV) (Figure 37).

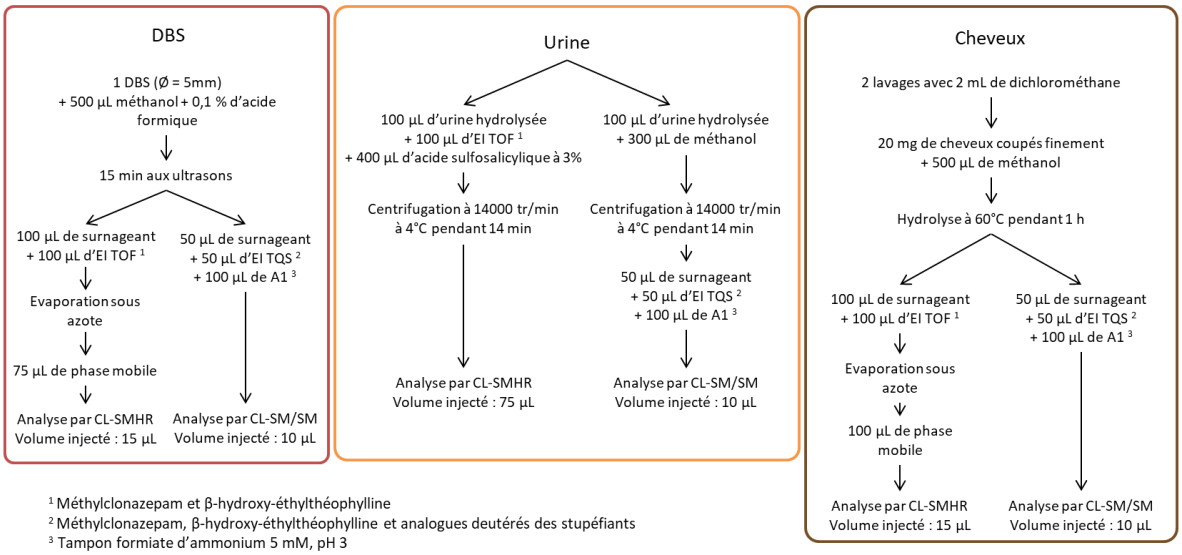


Figure 37 : Protocoles d'extraction des échantillons de l'étude FERIATOX

Pour chaque échantillon, deux approches de screening ont été réalisées :

- Screening non ciblé en masse exacte avec un système CL-SMHR (Xevo® G2 QTOF, Waters) [52].
- Screening ciblé avec un système CL-SM/SM (Xevo® TQS, Waters) en mode MRM avec des méthodes spécifiques dédiées aux stupéfiants, aux NPS et aux psychotropes [81].

La base de données contenait plus de 1400 composés dont 440 NPS et métabolites.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet de plusieurs présentations [116–120].
L'analyse des DBS met en évidence dans plusieurs prélèvements des stupéfiants seuls ou en association (n=12), cocaïne (n=9), cannabis (n=3) et de la MDMA (n=4) (Tableau 15). Plusieurs produits de coupe de la cocaïne ont été identifiés (lévamisole, lidocaïne et phénacétine). Des psychotropes ont été identifiés également tels que des antalgiques (paracétamol, tramadol), antidépresseur tricyclique (amitriptyline), antipsychotiques (cyamémazine, loxapine), anxiolytiques (hydroxyzine, oxazepam), traitement de substitution aux opiacés (TSO) (méthadone) et dans un cas il a été mis en évidence de la kétamine (Tableau 15). La kétamine est un anesthésique d'action rapide utilisé en médecine humaine et vétérinaire mais détournée de son usage depuis plusieurs années dans les milieux festifs et les soirées privées [121]. Dans 12 DBS, aucune substance psychoactive n'a été observée.
Les résultats urinaires sont cohérents avec les résultats des DBS (Tableau 16). En plus des stupéfiants identifiés dans les DBS, de la psilocine a été mise en évidence. Les psychotropes rencontrés dans les urines sont quasi similaires avec ceux identifiés dans les DBS.
Cependant, aucun NPS n'a été observé ni dans les DBS ni dans les urines.

Pour les cheveux, seul le 1er segment de 2 cm côté proximal a été analysé afin d'avoir le reflet de la consommation de psychotropes dans le mois précédent le prélèvement.
Comme dans les DBS et les urines, les stupéfiants sont très souvent observés, cocaïne (45%), cannabis (58%) et MDMA (33%). D'autres psychotropes que ceux identifiés dans les DBS et urines ont été mis en évidence : antalgique (néfopam), antidépresseur (citalopram), anti-épileptique (carbamazépine), anti-histaminique (chlorphéniramine, doxylamine et phéniramine), anti-inflammatoire (acide niflumique, dexaméthasone, methylprednisone), hypnotique (zolpidem). L'analyse capillaire a cependant permis de

révéler une consommation de NPS (Tableau 15). En effet, dans un cas du 5-EAPB et ses métabolites ont été identifiés en association avec de la méthylone (Tableau 16).

Tableau 15 : Composés identifiés dans les prélèvements de l'étude FERIATOX

		DBS (n=27)	UR (n=14)	CHV (n=24)
Stupéfiant	Amphétamine	nd	nd	1
	Cocaïne	9	3	11
	Codéine	nd	nd	1
	MDMA	4	1	8
	THC	3	5	14
Produit de coupe	Lidocaïne	2	1	7
	Lévamisole	3	nd	2
	Phénacétine	1	nd	4
	Psilocine	nd	1	nd
Antalgique	Nefopam	nd	1	2
	Paracétamol	5	7	17
	Tramadol	4	3	8
Anti-dépresseur	Citalopram	nd	nd	1
Anti-dépresseur tricyclique	Amitriptyline	1	1	2
Antidiabétique	Metformine	nd	1	nd
Anesthésique	Kétamine	1	1	nd
Antiémétique	Métoclopramide	nd	1	2
Anti-épileptique	Carbamazépine	nd	nd	1
	Lévétiracetam	1	1	nd
Anti-histaminique	Chlorphéniramine	nd	nd	1
	Doxylamine	nd	nd	1
	Phéniramine	nd	nd	2
Anti-inflammatoire	Acide niflumique	nd	nd	1
	Dexaméthasone	nd	nd	1
	Methylprednisone	nd	1	1
Anti-paludéen/Antiarthymique	Quinine/Quinidine	nd	nd	2
Antipsychotique	Cyamémazine	1	1	nd
	Halopéridol	nd	1	1
	Loxapine	1	1	1
Anxiolytique	Hydroxyzine	1	1	3
	Oxazépam	2	2	2
Hypnotique	Zolpidem	nd	nd	1
Neuroleptique	Quétiapine	1	1	1
	Tiapride	nd	1	2
Traitement de substitution aux opiacés	Buprénorphine	nd	1	1
	Méthadone	1	2	2
Vasoconstricteur	Ephédrine	nd	nd	2
NPS	Méthylone	nd	nd	1
	5-EAPB	nd	nd	1

Ainsi, les substances psychoactives identifiées, dans les DBS et les urines, sont cohérentes avec les tableaux cliniques constatés. Cette étude préliminaire, malgré un effectif limité, prouve la praticabilité et l'efficience des DBS dans des situations précaires où le prélèvement est difficile comme dans les PMA. Enfin, il est évident que la constatation d'absence d'intoxication par NPS dans cet échantillon de patients ne peut pas être étendue à d'autres rassemblements festifs, tels que des festivals de musique.

Tableau 16 : Résultats des criblages toxicologiques pour l'ensemble des prélèvements de l'étude FERIATOX

N°Cas	DBS	UR		CHV
2	Cocaïne/BZE/EME, Tramadol + met, Paracétamol	Cocaïne/BZE/EME, Tramadol + met, Paracétamol + THCCOOH, Méthadone/EDDP	EtOH	Cocaïne/BZE, THC/CBN/CBD, Méthadone/EDDP, Paracétamol, Tramadol
3	MDMA, Tramadol + met, Amitriptyline, Oxazepam	MDMA, Tramadol + met, Amitriptyline, Oxazepam + THCCOOH, Buprénorphine/Met,	nd	MDMA, THC/CBN/CBD, Amitriptyline /Met, Haloperidol/Met, Oxazepam, Zolpidem, Tramadol /Met, Buprenorphine/Met, Tiapride/Met
4	Cocaïne/BZE/EME, THC/THCCOOH, Methadone/EDDP	Cocaïne/BZE/EME, THC/THCCOOH, Methadone/EDDP + prednisolone	nd	Cocaïne/BZE/EME, THC/CBN/CBD, Methadone/EDDP, Levamisole, Phénacetine, Imidacloprid, Lidocaine, Noscapine
5	*RAS*	*Non disponible*		BoscaLid
6	*RAS*	Psilocine/psilocybine, Paracétamol, Caféine	EtOH	THC/CBN/CBD, Lidocaine, Paracétamol
7	*RAS*	Metformine	EtOH	Codéine, Doxylamine/Met, Paracétamol
8	*RAS*	*Non disponible*		*RAS*
9	*RAS*	Paracétamol, Caféine	EtOH	Paracétamol, Quinine/Quinidine
10	*RAS*	Paracétamol, Caféine	EtOH	THC/CBN/CBD
11	THC/THCCOOH, Loxapine, Cyamemazine	THC/THCCOOH, Loxapine, Cyamemazine	EtOH	THC/CBN/CBD, Loxapine, Paracétamol, Tramadol/Met, Néfopam, Lidocaine, Imidaclopride
12	*RAS*	*Non disponible*		Tramadol/met, Néfopam, Paracétamol
16	Paracétamol	Paracétamol	EtOH	THC/CBN/CBD, Lidocaine
17	Cocaïne/BZE/EME	Caféine	EtOH	Cocaïne/BZE, Paracétamol
29	*RAS*	Lidocaine	EtOH	Cocaïne/BZE, Tramadol/Met, Metoclopramide, Paracétamol
30	Kétamine, Tramadol, Hydroxyzine, Lévétiracetam, Hydroxyzine/Cétirizine, Quetiapine/met	Kétamine, Tramadol, Hydroxyzine, Lévétiracetam, Hydroxyzine/Cétirizine, Quetiapine/met	EtOH	Quetiapine/Met, Hydroxyzine/Cétirizine, Tramadol/Met, Amitriptyline/Met, Dexamethasone, Methylprednisone, Citalopram, Carbamazepine, Paracétamol
33	Cocaïne/BZE/EME, Lidocaïne, lévamisole	*Non disponible*		*Non disponible*
37	Paracétamol	*Non disponible*		*Non disponible*
39	*RAS*	*Non disponible*		*Non disponible*
40	Cocaïne/BZE, Paracétamol	Cocaïne/BZE, Paracétamol + THCCOOH, Metoclopramine, Caféine	EtOH	Cocaïne/BZE/Cocaethylene, THC/CBN/CBD, MDMA, Paracétamol, Metoclopramide, Imidaclopride, Hydroxyzine/Met, Acide niflumique
14	RAS	*Non disponible*		Cocaïne/BZE, THC/CBN/CBD, MDMA, Quinine/Quinidine, Phénacetine, Lidocaine, Paracétamol
22	MDMA/MDA, Cocaïne/BZE	*Non disponible*		Cocaïne/BZE, THC/CBN/CBD, MDMA/MDA, Paracétamol, Lidocaine
24	Cocaïne/BZE/EME, Lévamisole	*Non disponible*		THC/CBN/CBD, Ephédrine, Paracétamol, oxomemazine /Met, chlorphéniramine, Phéniramine
25	*RAS*	*Non disponible*		5-EAPB/Met, Méthylone, THC/CBN/CBD, Cocaïne/BZE, MDMA/MDA/Amphétamine, Tramadol/Met, Lidocaïne, Paracétamol
26	MDMA/MDA	*Non disponible*		Cocaïne/BZE, THC/CBN/CBD, MDMA, Phénacetine, Hydroxyzine/Cétirizine, Paracétamol
27	Cocaïne/BZE/EME/Cocaethylene, THC/THCCOOH, Lévamisole, Phénacetine	*Non disponible*		Cocaïne/BZE/Cocaethylene, MDMA/MDA, THC/CBN/CBD, Paracétamol, Levamisole Phénacetine, Phéniramine
28	Cocaïne/BZE/EME, MDMA, Lidocaine, Tramadol, Paracétamol	*Non disponible*		Cocaïne/BZE/Cocaethylene, MDMA/MDA, Ephédrine, Paracétamol
32	*RAS*	Caféine	EtOH	Tramadol/Met

2.3.3.1.2 MUSITOX

Une étude similaire a été réalisée lors d'un festival de musique. Du 30 juin au 2 juillet 2017 a eu le lieu le festival Garorock à Marmande en région Nouvelle Aquitaine (Figure 38). Ce festival est l'un des plus grands festivals de musique en France où des dizaines de milliers de festivaliers se rendent chaque soir.

Figure 38 : Festival Garorock

Les critères d'inclusion étaient identiques à l'étude FERIATOX. Les PMA disposaient de kits de prélèvements constitués d'un buvard DBS prénuméroté et d'un lien pour orienter la mèche de cheveux prélevée.
A la différence de l'étude FERIATOX, il n'y a pas eu de prélèvement d'urine.
Au total, 25 patients ont été inclus dans l'étude. Pour un patient, le prélèvement capillaire n'a pas pu être réalisé ayant les cheveux trop courts.
Le protocole analytique réalisé était identique à celui décrit précédemment pour l'étude FERIATOX.

Les résultats de cette étude ont déjà fait l'objet de plusieurs présentations lors de congrès [122,123].
L'ensemble des résultats des criblages toxicologiques des DBS et des cheveux pour chaque patient est regroupé dans le Tableau 17.
L'analyse des DBS (n=25) a permis de mettre en évidence de nombreuses fois des stupéfiants seuls ou en association : MDMA dans 12 DBS (48%), amphétamine (20%), THC (24%) et cocaïne (16%).
D'autres principes actifs ont été mis en évidence tels que le paracétamol dans 44% des échantillons, la quinine ou quinidine, la cétirizine, la chloroquine et l'hydroxyzine dans 1 cas (4%) et le lévamisole dans 16% des échantillons, toujours en association avec la cocaïne.
Aucun NPS n'a été retrouvé dans les DBS.
Dans les cheveux, la présence de stupéfiants est cohérente avec les résultats des DBS. La MDMA reste le stupéfiant le plus fréquemment rencontré (n=16 soit 67%), devant la cocaïne (42%), le THC (21%) et l'amphétamine (4%). Une autre amphétamine, la MDEA et un opiacé, la codéine, ont été identifiés chacun dans un cas.
Des substances psychoactives ont été identifiées tels que des anti-histaminiques H1 (cétirizine, desloratadine, diphénydramine, chlorphéniramine), antalgique (paracétamol), des produits de coupe de la cocaïne (lévamisole, chloroquine, hydroxyzine) et un inhibiteur de la phosphodiestérase de type 5 (PDE-5) (sildénafil).
Un NPS a été mis en évidence dans une mèche de cheveux. Il s'agit d'un cannabinoïde de synthèse, le MDMB-CHMINACA (Tableau 18).

Tableau 17 : Résultats des criblages toxicologiques pour l'ensemble des prélèvements de l'étude MUSITOX

N°	DBS	Cheveux
1	Amphetamine, MDMA + Met, Paracétamol	MDMA + Met, Paracétamol
2	THC, Paracétamol	MDMA + Met, Paracétamol
3	Paracétamol	ND
4	MDMA + Met	MDMA + Met, Cocaine + Met, Paracétamol
5	Paracétamol	THC, MDMA + Met, Paracétamol
6	Paracétamol	Paracétamol
7	Paracétamol	THC, Paracétamol
8	THC + Met, Amphetamine, MDMA + Met, Paracétamol	THC, MDMA + Met, Amphétamine
9	Paracétamol	Cocaine + Met, MDMA
10	THC, Cocaine + Met, Amphetamine, MDMA + Met, Levamisole	*Non réalisé*
11	Cocaine + Met, MDMA + Met, Chloroquine, Hydroxyzine	Cocaine + Met, MDMA, MDA, Hydroxyzine + Met, Levamisole
12	THC-COOH	Cocaine + Met, MDMA, MDA
13	THC-COOH	MDMA + Met, Chlorphéniramine, Paracétamol
14	Paracétamol	ND
15	Amphetamine, MDMA + Met	Cocaine + MEt, Desloratidine
17	Amphetamine, MDMA + Met	MDMA + Met, Hydroxyzine + Met, Sildenafil
18	MDMA + Met	MDMA + Met, Cocaine + Met, Levamisole, Paracétamol
19	Cocaine + Met, Quinine/Quinidine	MDMA + Met, Cocaine + Met, Paracétamol, Diphenydramine, Quinine/Quinidine
21	MDMA + Met	MDMA + Met, Doxylamine + Met, Hydroxyzine + Met
22	MDMA + Met, Paracétamol	MDMA + Met, Cocaine + Met, Cocaethylene, Codéine, MDEA, Paracétamol
23	Paracétamol, Cétirizine	Cétirizine + Metabolite, Paracétamol
24	THC, Paracétamol	MDMA + Met, Cocaine + Met, THC, Levamisole, Paracétamol
25	ND	MDMB-CHMICA
26	Cocaine + Met, MDMA + Met, Paracétamol, Lévamisole	MDMA + Met, Cocaine + Met, Levamisole, Paracétamol
27	THC, MDMA + Met	THC

ND : Non détecté

Tableau 18 : Molécules identifiées dans les DBS et cheveux de l'étude MUSITOX

		DBS (n=25)	CHV (n=24)
Stupéfiant	MDMA	12	16
	MDEA	nd	1
	Amphétamine	5	1
	THC	6	5
	Cocaïne	4	10
	Codéine	nd	1
Antalgique	Paracétamol	11	13
Anti-H1	Cétirizine	1	1
	Chlorphéniramine	nd	1
	Desloratadine	nd	1
	Diphénydramine	nd	1
Antipaludéen	Chloroquine *	1	nd
Antipaludéen/Antiarythmique	Quinine/Quinidine	1	1
Anxiolytique	Hydroxyzine *	1	3
PDE-5	Sildénafil	nd	1
Produit de coupe	Levamisole	3	4
Cannabinoïde de synthèse	MDMB-CHMINACA	nd	1

* Peut être utilisé comme produit de coupe de la cocaïne

2.3.3.2 NPS et conduite automobile

Dans le cadre de la conduite sous l'influence de produits stupéfiants, les forces de l'ordre peuvent soumettre les conducteurs à un dépistage de stupéfiants, lors des contrôles inopinés ou lors d'accidents. Dans un premier temps, un dépistage salivaire aux drogues classiques (cannabis, opiacés, cocaïne et amphétamine(s)) est effectué à l'aide d'un dispositif immunochimique appelé Drugwipe® 5S (DW). Si le résultat est négatif, la procédure s'arrête. Par contre si le résultat est positif pour au moins une des classes, un prélèvement sanguin sera effectué afin de confirmer le dépistage par une autre technologie telle que la CL-SM (Figure 39).

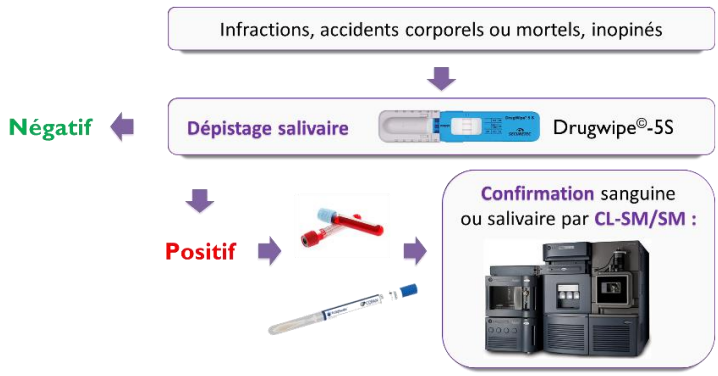


Figure 39 : Procédure pour les contrôles de stupéfiants

Bien évidemment, cette procédure n'est pas adaptée aux dépistages de la prise de NPS. Or, il est évident que la consommation de NPS peut conduire à des déficiences similaires à celles causées causés par l'utilisation de stupéfiants traditionnels et qui ne sont pas compatibles avec une conduite sans risque [124–127].

L'objectif des études qui vont suivre est d'évaluer la prévalence de la consommation des NPS dans des populations de conducteurs soumis à ces contrôles.

2.3.3.2.1 Prélèvements sanguins [128,129]

ARTICLE 6 (page 151)
et **ARTICLE 7 (page 159)**

Une première collaboration avec le laboratoire de toxicologie de l'Institut National de Criminalistique et de Criminologie de Bruxelles (INCC) porte sur l'analyse rétrospective de prélèvements sanguins réalisés dans le cadre de la conduite automobile à la suite d'un dépistage salivaire positif.

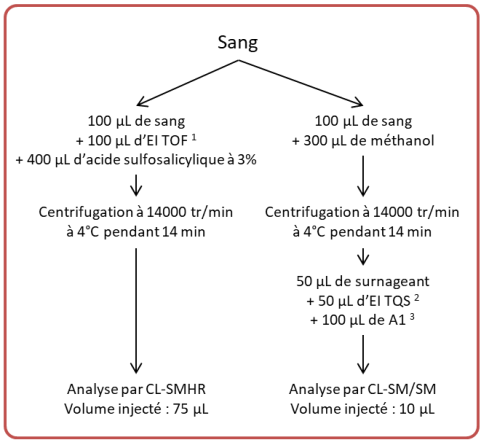
Figure 40 : Zones géographiques de l'étude en Belgique

De janvier à août 2015, des prélèvements sanguins ont été collectés dans trois zones géographiques belges (Mons, Malines et Turnhout) (Figure 40), dans le cadre de contrôles routiers inopinés, analysés et interprétés selon les procédures et la législation belge en vigueur.

L'objectif de cette étude est de dresser un bilan plus exhaustif des xénobiotiques consommés, en particulier des NPS chez les conducteurs.

Pour cela, j'ai procédé à une analyse complémentaire de ces échantillons en 2016, en suivant le protocole de préparation d'échantillon décrit dans la Figure 41. Les extraits ont ensuite été analysés avec les 2 approches de criblage ciblé et non ciblé comme pour les prélèvements de l'étude FERIATOX.

Tous les échantillons de sang dans cette étude (n=558) étaient obtenus à partir de sujets dépistés positifs à au moins une des 4 classes de stupéfiants (cannabis, opiacés, cocaïne et amphétamine(s)) par le test de dépistage Drugwipe®5S sur le bord de la route, soit après un contrôle routier inopiné (98%) ou après un accident. Le nombre d'échantillons de sang analysés dans cette étude représente environ 14% de tous les échantillons de sang collectés dans le cadre d'une confirmation de stupéfiants en Belgique en 2015.



[1] Méthylclonazepam et β-hydroxy-éthylthéophylline
[2] Méthylclonazepam, β-hydroxy-éthylthéophylline et analogues deutérés des stupéfiants
[3] Tampon formiate d'ammonium 5 mM, pH 3

Figure 41 : Protocole de préparation du sang

Dans les échantillons de sang, le THC a été détecté dans 75% des échantillons, 24% contenaient de la cocaïne et/ou de la benzoylecgonine, 14% de l'amphétamine, 8% de la MDMA et 2% de la morphine.
De plus, 17% des échantillons contenaient un médicament analgésique, 10% une benzodiazépine ou hypnotique, 5% un antidépresseur, 2% un antipsychotique, 2% un antiépileptique et 1% un psychostimulant (méthylphénidate).

Cette première étude a mis en évidence la présence de 17 NPS dans 37/558 échantillons (7%). Plusieurs familles de NPS sont représentées : cannabinoïde de synthèse (AB-Fubinaca), cathinone (α-PVP, TH-PVP, méphédrone, méthedrone, 4-MEC), phénéthylamine (4-FA), aminoindane (2-AI), arylalkylamine (5-MAPB/5-EAPB, MPA), indoalkylamine (5-MeO-DALT, 4-Acetoxy-DIPT), arylcyclohexylamine (MXE), pipérazine (TFMPP) (Figure 42).
A noter que la majorité des échantillons positifs en NPS ont été obtenus au cours d'un contrôle près du festival de Dour (festival de musique).

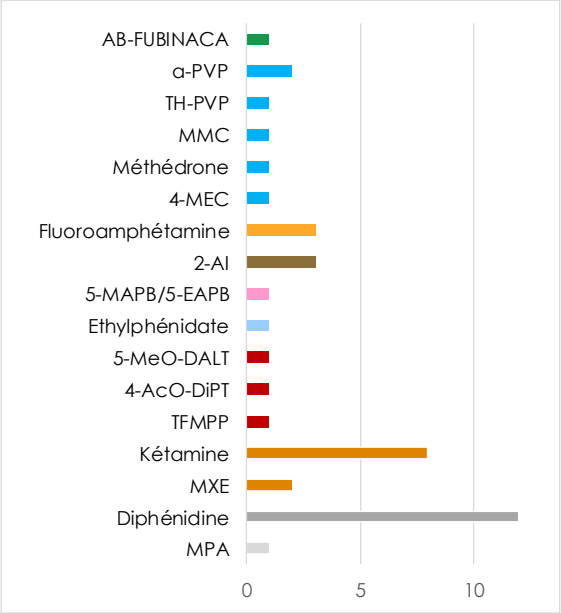


Figure 42 : Fréquence des NPS identifiés dans les 558 échantillons de sang

Ces résultats ont fait l'objet de plusieurs présentations lors de congrès francophone et international [130,131].

Cette étude m'a permis de montrer la réalité d'un usage de NPS chez les conducteurs belges consommant également des drogues classiques. Suite à ces résultats, une question s'est posée concernant les conducteurs dont les dépistages sont négatifs. Consomment-ils des NPS ?
Pour cela, le seul prélèvement pouvant être utilisé pour obtenir cette réponse est le test de dépistage Drugwipe® 5S usagé.

2.3.3.2.2 Prélèvements salivaires

Nous avons sollicité les forces de l'ordre pour garder l'ensemble des Drupgwipe® usagés positifs ou non afin de les analyser.
Une première étude préliminaire a été réalisée pour évaluer la faisabilité et m'a permis de mettre au point un protocole de préparation d'échantillon [129,132].
Deux patins absorbants (DSS : Dried Saliva Spot) du dispositif de dépistage sont placés dans du méthanol (300 µL) pendant une heure à température ambiante. Après centrifugation, 100 µL de surnageant sont additionnés de 50 µL d'étalons internes (méthylclonazépam, β-OH-éthylthéophylline et analogues deutérés), évaporés à sec et repris par 100 µL d'un mélange de méthanol/acide formique à 0,1 % et de tampon de formiate d'ammonium 5mM à pH 3 (80/20 ; v/v). Les deux approches de screening ont été réalisées comme pour l'étude FERIATOX.

ARTICLE 7 (page 159)

Pour cette étude préliminaire, 199 DW négatifs ont été collectés sur la région de Mons (n=18) et Malines (n=181).
Dans ces échantillons, 17 NPS différents ont été détectés (n) : méphédrone (6), kétamine (2), mCPP (1), 3-FPM (1), 5MeO−DALT (1), MDPV (2), 4−MEC (4), 4−FMA (1), NEB (1), JWH-020 (2), FUB−JWH-018 (1) ethylphenidate (2), AM−694 (1), MXE (1), 5F−AKB48 (1), MDMB-CHMICA (1) et HU210 (1).
De plus, 42 Drugwipe® (21%) contenaient des stupéfiants classiques (n) : THC (29), cocaïne (13)/cocaéthylène (3), MDMA (1), amphétamine (1), and méthamphétamine (1). D'autres substances psychoactives ont été identifiées : analgésiques dans 5% des échantillons (tramadol, paracétamol), antipsychotique dans 3% (amisulpride), antidépresseurs dans 2% (sertraline, citalopram, amitriptyline, et nortriptyline) et un hypnotique (zopiclone).

ARTICLE 8 (page 171)

* <u>Etude franco-belge</u> [133]
En 2016 et en 2017, des DW usagés ont été collectés en Belgique dans la région de Mons et Malines et en France dans la région de Lille quel que soit le résultat du dépistage.
En 2016, en Belgique en plus des 199 échantillons négatifs dont les résultats ont été détaillés ci-dessus, 91 étaient positifs au minimum à une classe de stupéfiants et en France 101 DW négatifs ont été collectés.
Pour les échantillons collectés en Belgique, les résultats des DW négatifs ont été présentés dans le paragraphe précédent, dans 10,5% des DW, un NPS a été identifié. L'analyse des 91 DW positifs a permis de détecter 3 NPS différents dans 9 DW (9,9%) : AKB-48 (3), MMC (4) et kétamine (2).
En France, dans 3 DW sur les 101 collectés, 3 cathinones différentes ont été identifiées : éthylone (1), methylone (1) and MDPV (1) (Figure 43).
Au total, 33 des 391 échantillons analysés (8,4%) contenaient au moins un NPS, qui était associé ou non à un stupéfiant classique. En France, ainsi qu'en Belgique, les NPS identifiés étaient principalement des

dérivés de la cathinone. Il est à noter que les dérivés de la cathinone sont très souvent consommés conjointement avec des stupéfiants « classiques ». Aucune relation n'a pu être établie entre le type de NPS et le mois ou les zones géographiques des prélèvements salivaires. Étant donné que la présence de NPS dans la salive suggère fortement une consommation récente, ces conducteurs peuvent être considérés comme étant sous l'influence de substances psychoactives lors la conduite. Ainsi, 8% des conducteurs initialement testés étaient au volant de leur véhicule sous l'influence de NPS. Ces données ne concernent que les conducteurs soumis à un dépistage de drogue au bord de la route et ne peuvent donc pas être extrapolées à la population globale des conducteurs.
En 2016, ce pourcentage de NPS détecté dans les échantillons salivaires (8,4%) met en évidence la réalité de la conduite après l'usage de NPS chez les conducteurs français et belges et est comparable aux données sanguines (7%) observées en 2015 dans des populations similaires [129].

En 2017, en Belgique, 251 DW ont été collectés (40 négatifs/211 positifs), dans 7 DW, soit 3%, a été identifié un NPS : THJ-2201 (1), alpha-PVP (4), N-éthylhexedrone (1), 3-FPM (1), 4-FMA (1) ethylphénidate (2) et isopropylphénidate (2). En France, 140 DW ont été collectés (72 négatifs/68 positifs), dans 3% des échantillons des NPS ont été mis en évidence : 4-méthyl-NEP (1), éthylphénidate (1), LSD (1) et méthamnétamine (1) (Figure 43). Une diminution du pourcentage de NPS est observée dans les échantillons salivaires (3%) entre 2016 et 2017. Les cathinones restent les NPS les plus fréquemment identifiés.

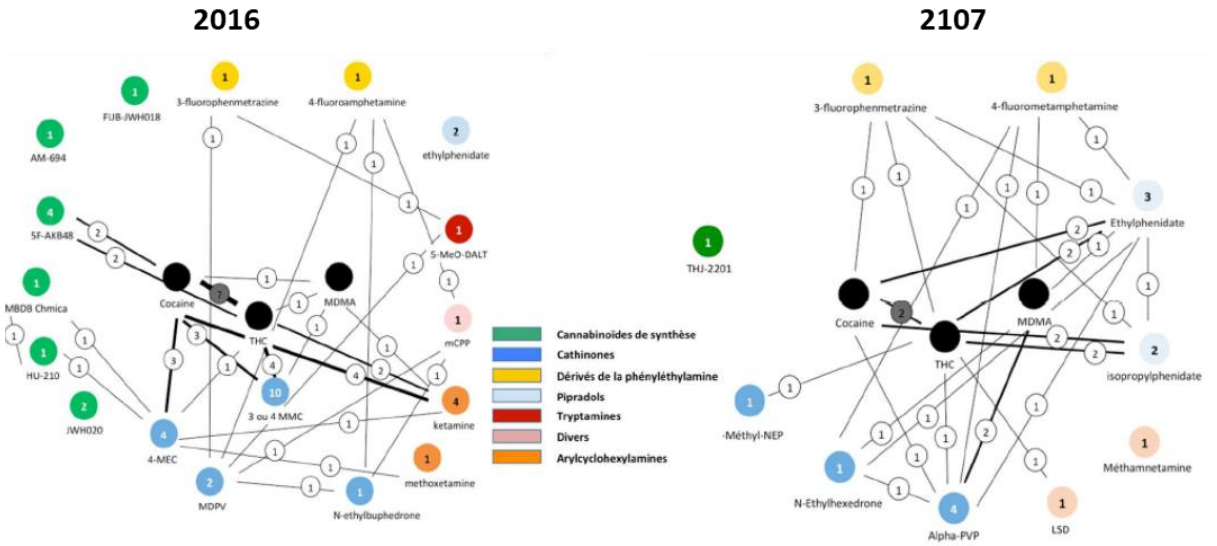


Figure 43 : Connexions entre les NPS et les stupéfiants « classiques » (en noir) dans les DW collectés en 2016 et en 2017. Le nombre d'identifications et de connexions est présenté.

* <u>Garorock</u>

Une étude de la prévalence des NPS chez les conducteurs a été également réalisée lors du festival Garorock. Les forces de l'ordre avaient été sensibilisées pour cette étude et les DW usagés utilisés les jours du festival ont été gardés. Les contrôles étaient uniquement inopinés ou « à la tête du client » et/ou de son véhicule.
Cette étude a fait l'objet d'une présentation [134].
Au total, 229 DW (133 négatifs/96 positifs) usagés répartis de la façon suivante :

- 9 DW ont été collectés le 25/06/2017 lors du festival Art-Scenyk

- 68 DW ont été collectés le 30/06/2017 et 01/07/2017 au début du festival Garorock

- 113 DW ont été collectés le 02/07/2017 et 03/07/2017 à la sortie du festival Garorock en direction de Toulouse

- 39 DW ont été collectés le 03/07/2017 à la sortie du festival Garorock en direction de Bayonne et Pau.

Dans 17 DW, soit 7,4%, des NPS ont été identifiés (Figure 44).

Lors du festival Art- Scenyk, 2 cathinones, la 3-4 MMC et la 4F-PVP ont été identifiées chacune dans un DW différent.

Pour les DW à l'entrée du festival Garorock, dans 7 DW des arylcyclohexylamines ont été détectées : méthoxykétamine (1), MXE (3), kétamine (3) ce qui représente 10,3 % des « entrants ».

Pour les DW à la sortie du festival Garorock, dans 11 DW des NPS de familles diverses ont été détectés : cannabinoïdes de synthèse (5F-AKB48, MAM-2201, JWH-122), cathinone (MMC), arylcyclohexylamine (kétamine), phénéthylamines (FMA, 25C-NBOMe, APB) ce qui représente 7,3 % des « sortants ».

Ce résultat est comparable aux données disponibles dans une population similaire [135]. Dans ce contexte « festif », il faut noter que la nature des NPS consommés est marquée par la forte proportion de cyclohexanones (kétamine, MXE et méthoxykétamine) (39 % des NPS consommés).

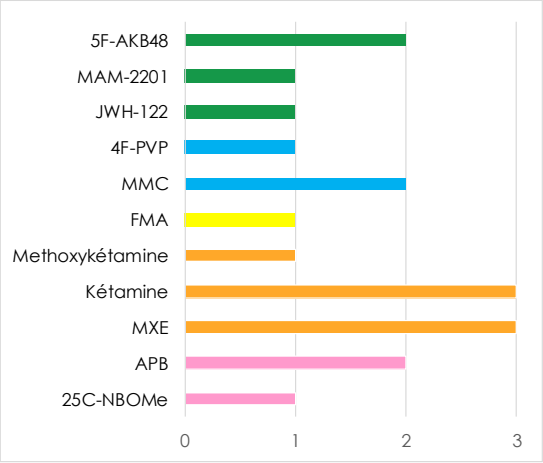


Figure 44 : Fréquence des NPS identifiés dans les DW aux abords du festival Garorock

2.3.4 Autres travaux

Pendant ces 3 années, j'ai également été sollicitée par de nombreuses équipes pour des cas ponctuels d'intoxications/exposition aux NPS dans des contextes médicaux ou médico-légaux, ou des études expérimentales afin de confirmer ou d'apporter des informations supplémentaires grâce à l'utilisation de mon outil analytique. Certaines d'entre-elles ont fait l'objet de publication sous forme d'article ou de présentation lors de congrès.

2.3.4.1 Etudes de cas

2.3.4.1.1 Méthiopropamine [136]

ARTICLE 9 (page 177)

L'équipe du CHU de Bordeaux m'a fait parvenir un prélèvement sanguin d'un patient de 30 ans retrouvé par sa famille dans un état agité après avoir ingéré de la « synthacaïne » et fumé du cannabis la veille. Après un criblage toxicologique par CL-SMHR et CL-SM/SM, de la méthiopropamine (MPA) a été mise en évidence et quantifiée à 14 µg/L dans le plasma et 8,16 µg/L dans l'urine (13h après son admission).

2.3.4.1.2 25I-NBOMe [137,138]

ARTICLE 10 (page 183)

Un jeune homme âgé de 29 ans a eu une perte de conscience aiguë dans l'heure qui a suivi l'instillation d'une goutte dans le nez d'un liquide rose. Des analyses de première intention ont été réalisées sur des échantillons d'urine et de sang à H3 : des benzodiazépines ont été détectées dans le sang et l'urine (détection par barrette de diodes) et un résultat positif douteux pour le LSD (méthodes immunochimiques). D'autres échantillons biologiques ont ensuite été prélevés à H15. L'échantillon de liquide rose consommé par voie nasale par le patient a été récupéré. L'ensemble de ces échantillons m'a été confié pour un criblage toxicologique par CL-SMHR et CL-SM/SM.
L'analyse du liquide rose a mis en évidence un cocktail de 25I-NBOMe, 25H-NBOMe et de 25C-NBOMe. Le 25I-NBOMe était le composé majoritaire de ce mélange. N'ayant pas les métabolites du 25I-NBOMe dans mes bases de données des criblages non ciblés (CL-SMHR) et ciblés (CL-SM/SM), j'ai réalisé une étude *in vitro* du métabolisme du 25I-NBOMe avec les HLM afin d'augmenter les fenêtres de détection du 25I-NBOMe.
De nombreux métabolites ont ainsi été caractérisés : des métabolites de phase I suite à une hydroxylation, déméthylation, N-déalkylation et des métabolites de phase II après glucuronoconjugaison. L'analyse des prélèvements biologiques a permis d'identifier du 25I-NBOMe dans le sérum à H3 à une concentration de 0,9 µg/L et dans les urines à H3 et H15 à une concentration de 1,4 et 1,2 µg/L mais également 7 métabolites précédemment produits *in vitro*. Deux métabolites, le déméthyl 25I-NBOMe et son glucuronide semblent être des métabolites majeurs d'élimination du 25I-NBOMe dans les urines.

ARTICLE 11 (page 197)

Le CHU d'Amiens m'a sollicitée pour les aider à identifier ce qu'un jeune homme aurait pu avoir consommé. Cet homme, âgé de 25 ans, est décédé après avoir été percuté de plein fouet par un train qui roulait à vive allure. D'après les témoignages recueillis par les forces de l'ordre, il se serait avancé au milieu de la voie peu avant le passage du train. Il revenait d'une rave party et aurait consommé une substance appelée « la goutte ». Cette appellation désignerait un NPS, le 25I-NBOMe.

Le criblage toxicologique par CL-SMHR et CL-SM/SM, n'a pas mis en évidence le 25I-NBOMe ni ses métabolites. Cependant, du LSD et l'un de ses métabolites, le 2-oxo-3-hydroxy-LSD ont été identifiés à des concentrations respectivement de 1,6 et 0,1 µg/L dans le sang et de 1,4 et 9 µg/L dans les urines. On ne peut tout de même pas exclure que la « goutte » ne contenait pas de 25I-NBOMe, les quantités de 25I-NBOMe consommées sont très faibles et les concentrations dans le sérum sont de l'ordre de quelques pg/mL [137,139].
Ce cas a été présenté lors du 24e congrès annuel de la Société Française de Toxicologie Analytique [140]

2.3.4.1.3 α-PHP

Ce cas a été présenté lors du 25e Congrès annuel de la Société Française de Toxicologie Analytique et 54e congrès de la Société de Toxicologie Clinique [11].
Un homme de 32 ans a été admis au CHU de Nancy après avoir sauté du premier étage d'un immeuble. A son admission, il est très agité, logorrhéique, incohérent, désorienté et présente des hallucinations avec des idées de persécution. Il déclare avoir « fumé de l'α-PVP » à trois reprises au cours des 12 dernières heures, et de manière répétée depuis au moins 8 mois. J'ai été sollicitée pour effectuer un criblage de NPS sur les prélèvements sanguin, urinaire et capillaire (mèche brune de 14 cm) réalisés à son admission. Le criblage par CL-SMHR a permis de mettre en évidence de l'α-PHP dans le sang et dans les urines et non de l'α-PVP comme il pensait avoir consommé. Deux métabolites de l'α-PHP, produits précédemment *in vitro* avec les HLM, ont été identifiés et également le métabolite réduit de l'α-PVP et de nombreux autres psychotropes (méphédrone, cocaïne, MDMA, méthadone, baclofène…). L'analyse segmentaire de la mèche de cheveux a mis en évidence de nombreux psychotropes : 22 médicaments, 3 produits stupéfiants, ainsi que des NPS (α-PHP, α-PVP, kétamine, méphédrone, méthylone et diméthyltryptamine). Ce cas illustre une fois de plus que le composé suspecté n'est pas confirmé et l'analyse capillaire d'une mèche de plus de 10 cm permet de documenter la polyconsommation répétée et variée sur plus d'un an.

2.3.4.1.4 5-MeO-DALT et diphénidine

Ce cas est un 2e cas d'analyse segmentaire d'une mèche de cheveux que j'ai réalisée permettant de documenter une consommation d'un « expérimentateur » de NPS. Cette étude a fait l'objet d'une présentation lors du 25e Congrès annuel de la Société Française de Toxicologie Analytique et 54e congrès de la Société de Toxicologie Clinique [141].
Un homme de 34 ans avait été retrouvé inconscient sur la voie publique. Les analyses du sang et de l'urine prélevés à son admission avaient permis de mettre en évidence la présence de diphénidine et de 5-MeO-DALT et leurs métabolites respectifs. Pendant son hospitalisation, une mèche de cheveux d'une longueur de 34 cm avait été prélevée. Ces 2 NPS ont été retrouvées sur toute la longueur de la mèche. Leurs métabolites étaient également présents : hydroxy-5-MeO-DALT, déméthyl-5-MeO-DALT et désalkyl-5-MeO-DALT; hydroxy-diphénidine et dihydroxy-diphénidine. D'autres substances psychoactives y compris d'autres NPS ont été identifiés : méthiopropramine, 4-FA, N-éthylbuphédrone et son principal métabolite, α-PVP, UR-144, MXE et éthylphénidate.

2.3.4.1.5 AB-FUBINACA [54]

ARTICLE 12 (page 205)

Quatre patients, âgés entre 19 et 24 ans, ont été admis aux urgences du CH de Grenoble après une rave party. L'un des patients a déclaré avoir consommé au cours de cette soirée de l'alcool (environ dix pintes de bière), de l'ecstasy (3 ou 4 comprimés), de l'amphétamine et du cannabis et également une poudre blanche inconnue par sniff (2 ou 3 fois dans la soirée) et les symptômes ont commencé juste après cette administration.
Le laboratoire de Grenoble avait mis en évidence un pic inconnu pouvant ressembler au spectre de masse de l'AB-FUBINACA dans les urines des 4 patients. J'ai ensuite été sollicité pour confirmer la présence d'AB-FUBINACA dans les prélèvements biologiques (plasma et urine). Une étude du métabolisme *in vitro* a été réalisée puis les criblages par CL-SMHR et CL-SM/SM ont été effectués. L'AB-FUBINACA et 3 métabolites ont été identifiés : un acide AB-FUBINACA carboxylique, un hydroxy-AB-FUBINACA et un hydroxy-désalkyl-AB-FUBINACA.
Ces cas ont permis de documenter les premiers cas d'intoxication impliquant l'AB-FUBINACA en mettant en évidence l'AB-FUBINACA et des métabolites dans le plasma et l'urine.

2.3.4.2 Etudes expérimentales

Lors de ma thèse, j'ai eu l'occasion de participer à 3 études expérimentales menées par l'équipe de l'Institut Médico-Légal (IML) de Strasbourg qui travaille sur la thématique des « designer benzodiazepines ».
D'une manière simple, l'objectif de ces études est, au-delà d'une identification des métabolites, l'établissement de données pharmacocinétiques des substances mères et des métabolites dans différentes matrices biologiques. L'idée est d'appréhender les fenêtres de détection dans ces différents milieux biologiques. Le choix s'est porté sur les « designer benzodiazepines » qui constituent une alternative intéressante aux benzodiazépines à des fins d'abus car ils sont facilement accessibles via Internet sans contrôle.

2.3.4.2.1 Métizolam [51]

ARTICLE 13 (page 217)

Le métizolam a été commandé via Internet. Avant administration chez un volontaire sain, j'ai analysé le comprimé bleu dosé à 2 mg par CL-SMHR afin d'en vérifier sa composition et sa teneur a été déterminée par une RMN ^{1}H. Ces analyses ont confirmé qu'il s'agissait effectivement d'un comprimé de métizolam dosé à 1,8 mg.
Après cette vérification, le comprimé a été administré par voie orale à un homme de 54 ans. Des échantillons d'urine ont été prélevés sur 6 jours.
Une étude du métabolisme *in vitro* avec les HLM a été réalisée et la totalité des urines ont été analysées par CL-SMHR. L'analyse des incubats a permis d'identifier trois pics correspondant à 3 métabolites hydroxylés du métizolam. Dans les urines, le métizolam est détecté pendant 40h après l'administration et seuls 2 métabolites hydroxylés ont été identifiés ainsi qu'un métabolite supplémentaire, un hydroxy-métizolam glucuronide.

2.3.4.2.2 Flunitrazolam [142]

Une étude similaire a été conduite avec le flunitrazolam. L'analyse par CL-SMHR et RMN ^{1}H a confirmé la composition du comprimé de flunitrazolam à 0,25 mg. Après ingestion, les urines ont été recueillies jusqu'à 72h.
L'étude du métabolisme *in vitro* avec les HLM a permis de mettre en évidence un métabolite, le 7-amino-flunitrazolam. Cependant dans les urines, deux métabolites supplémentaires ont été caractérisés : déakyl-flunitrazolam et 7-acétamido-flunitrazolam. Le flunitrazolam est détecté pendant 21 h après son administration et les métabolites pendant 37 h.
Les métabolites du flunitrazolam sont les produits majeurs de son élimination dans l'urine, leur identification améliore considérablement la fenêtre de détection du médicament.

ARTICLE 14 : Detection of designer benzodiazepine flunitrazolam in urine and preliminary data on is metabolism

Ameline Alice, Richeval Camille, Gaulier Jean-Michel, Raul Jean-Sébastien, Kintz Pascal

Article soumis au journal Drug Testing and Analysis

(page 227)

2.3.4.3 Autres matrices, autres temps, autres substances

En toxicologie, le sang et l'urine sont les matrices classiques. Quelques applications présentées précédemment laissent entrevoir la possibilité d'utiliser des matrices alternatives, telles que les cheveux, les DBS, la salive, … et les cheveux font d'ores et déjà partie de la routine.
Au-delà des aspects analytiques particuliers liés aux analyses capillaires, le problème majeur réside dans l'interprétation des résultats.
A ce titre, j'ai rédigé une revue de la littérature sur un « NPS » qui n'en est pas vraiment un, le LSD [138] et qui présente la particularité de donner lieu à de très rares observations dans les phanères.

ARTICLE 15 (page 241)

Par ailleurs, dans les années à venir, il est probable que les matrices alternatives d'aujourd'hui (cheveux, salive, air expiré) deviendront abordables plus facilement du fait des améliorations de nos outils analytiques. Par conséquent, il est important d'explorer d'ores et déjà les possibilités qu'elles offrent (en termes de fenêtre de détection, notamment) : c'est ce que nous avons réalisé concernant le métizolam avec l'équipe de l'IML de Strasbourg.

ARTICLE 16 (page 251)

Enfin, le terme de « nouvelle substance psychoactive » comprend une composante temporelle : une « nouvelle » substance ne l'est qu'en fonction du moment où elle apparaît, circule, est consommée, dans une population considérée (Figure 45).

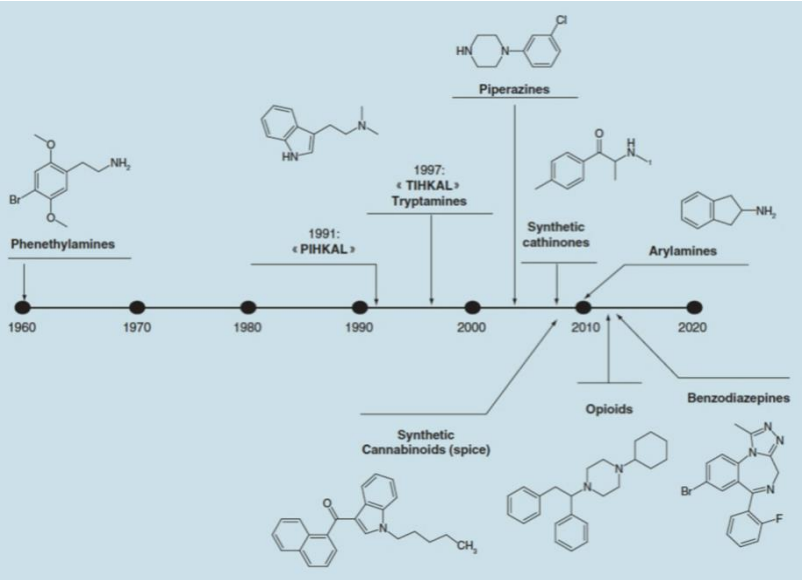


Figure 45 : Chronologie d'apparition des NPS depuis 1960

ARTICLE 17 (page 259)

Nous avons été sollicités par l'équipe de l'UMR 5288 de l'Université de Toulouse III. Les travaux menés par cette équipe sont à l'interface de la biologie et des sciences humaines. Il s'agit de confronter les données de terrain issues de corps gelés du 15e au 19e siècle de notre ère avec des éléments relevant des données génétiques humaines, bactériennes et virales, mais également avec (i) des données relevant de la pathologie et d'analyses isotopiques et toxicologiques et (ii) des données historiques.

Cette équipe travaille depuis plusieurs années sur des corps gelés du 15e au 19e de Yakoutie, au nord-est de la Sibérie. Actuellement leurs travaux portent sur l'étude des modes de vie. Nous avons été sollicités pour réaliser l'approche de la consommation de substances telles que le thé et le tabac dont l'usage se développa dès le 18e siècle, mais dont l'importance des variations qualitatives et quantitatives n'est pas connue. Par ailleurs, certains sujets ont été étiquetés comme chamans sur la base des pratiques funéraires identifiées et des données ethnographiques. L'étude de ces consommations pourrait donner une idée plus claire et précise sur les échanges commerciaux, la répartition de ces produits dans les régions, leur rôle dans la société et la culture Yakoute. Ce travail fait l'objet d'un manuscrit soumis au New England Journal of Medicine (NEJM).

3 Synthèse et perspectives

L'objectif de ma thèse était de développer des outils de recherche et/ou dosages de NPS et de leurs métabolites. Mes travaux ont reposé sur des **approches *in vitro*, *in silico* et *in vivo.***
Effectivement, compte tenu de leur importance en tant que biomarqueurs d'exposition aux NPS, leurs métabolites ont été au cœur de mes préoccupations.
Pour les identifier, l'approche ***in vitro*** a été déployée selon une procédure évaluée lors de mes investigations ***in vitro*** concernant les métabolites du Fu-F. Celles-ci ont été réalisées avec deux modèles : les microsomes hépatiques humaines (HLM) et une lignée cellulaire (Hepa-RG). Ces investigations m'ont permis d'estimer que les HLM suffisaient pour produire les métabolites majeurs pour répondre à mon objectif.
En pratique donc, la caractérisation des métabolites d'un NPS implique l'analyse des échantillons recueillis après incubation ***in vitro*** du NPS avec un pool de HLM. Consécutivement, les données acquises par le couplage CL-SMHR nécessitent le recoupement aves les biotransformations prédites ***in silico***. Ces biotransformations sont prédites ***in silico*** utilisant un algorithme de logiciel (MetaboLynx™) grâce à un outil de fragmentation et d'interprétation (Massfragment™). Enfin, la validation finale de l'identification des métabolites des NPS est effectuée ***in vivo*** par la confrontation à des cas réels d'exposition aux NPS (analyses urinaires ou sanguines).

Cet outil ***in vitro*, *in silico* et *in vivo,*** au-delà de la documentation analytique de plusieurs cas d'expositions/intoxications suspectées aux NPS émanant de l'ensemble du territoire national, a été également utilisé pour une meilleure connaissance des NPS et de leurs dangers dans un contexte de veille et d'études épidémiologiques.
L'activité de veille s'effectue principalement par le réseau SINTES de l'OFDT. Dans le cadre du volet « Veille » de ce dispositif, plus d'une centaine d'échantillons collectés par les acteurs socio-sanitaires intervenant auprès des usagers de drogues ont été et sont encore analysés annuellement au laboratoire, dans le cadre d'une convention de collaboration annuelle avec l'OFDT.
Cette activité d'analyse de produits était (et est encore) celle présente dans le projet « NPS, Slam et réduction des risques » avec le CEIP de Paris. Si ce travail s'inscrit dans un objectif de réduction des risques (RDR) et au-delà de son intérêt épidémiologique, cette étude nous a également permis de disposer de substances toutes nouvellement « distribuées et disponibles » auprès des usagers. Il est bien entendu que ces substances « pures » sont nécessaires pour alimenter l'approche *in vitro*.

Ces travaux ont donc également permis d'aborder l'aspect épidémiologique de la consommation des NPS, en particulier dans des populations spécifiques, telles que celle des conducteurs de véhicules.
Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de toxicologie de l'Institut National de Criminalistique et de Criminologie de Bruxelles, nous avons (i) réalisé l'analyse rétrospective de prélèvements sanguins réalisés dans le cadre de la conduite automobile à la suite d'un dépistage salivaire positif et (ii) développé une méthode qui permet d'analyser les résidus de salive des conducteurs disponibles dans les dispositifs usagés de dépistage. Ainsi, nous avons procédé à l'analyse de prélèvements salivaires de conducteurs belges et français (Nord de la France) en 2016 et en 2017. Mais nous avons également réalisé des analyses similaires dans une population plus spécifique de conducteurs

de véhicules qui se rendaient ou repartaient d'un festival de musique dans le Sud-Ouest de la France (GARROCK, 2017).

L'ensemble de ces travaux a reposé sur de nombreuses collaborations avec d'autres laboratoires publics ou privés de toxicologie, des services cliniques (urgences, réanimation, addictologie), des Centres Antipoison (CAP), des CEIP-A… et ont été valorisés à travers des publications dans des revues nationales et internationales, des communications orales ou affichées et des conférences sur invitation (Figure 46).

Figure 46 : Les nombreuses collaborations

Aujourd'hui, nous disposons d'un outil de diagnostic efficient, éprouvé et actualisé en permanence, incluant des librairies de spectres de masse (MS/MS et MS^E) de plus de 550 NPS et métabolites (février 2018). Cet outil a d'ores et déjà été appliqué dans différentes matrices biologiques : urine, sang, cheveux et salive.

L'objectif à venir est :

1 - de maintenir l'amélioration continue de cet outil de diagnostic en l'alimentant selon les différents axes précédemment développés, par :

- des études de cas ponctuels d'intoxications, des analyses de comprimés et autres produits non biologiques,

- des études expérimentales ponctuelles, des études prospectives et rétrospectives dans des populations ciblées (conducteurs, festivaliers, patients en addictologie…) ou représentatives de la population générale.

2 – de participer davantage à l'abord de l'aspect épidémiologique des NPS, en particulier dans des populations spécifiques, telles que celle des conducteurs de véhicules. Effectivement, nous avons d'ores et déjà entrepris de répéter annuellement ce type d'étude (détection de la présence de NPS dans la salive de conducteurs soumis à un contrôle routier) que ce soit dans les populations de conducteurs du Nord de la France (et en Belgique), ou chez des conducteurs aux abords de lieux festifs.

Dans un avenir immédiat, il va être nécessaire d'intensifier encore les axes de collaboration clinico-biologique afin d'améliorer le dépistage des intoxications/expositions aux NPS sur le territoire national, voire européen et de développer un réseau national de collaboration analytique et de veille dédié aux NPS.

Sur le plan analytique, mes travaux ont déjà servi de support au groupe de travail « Aspects analytiques des NPS » de la SFTA. Ce groupe de travail a pour objectifs (i) d'élaborer un texte de recommandations analytiques incluant la liste des NPS et métabolites à rechercher (liste actualisée annuellement) et précisant les conditions pré-analytiques (milieux biologiques, stabilité) et analytiques de ces recherches de NPS, (ii) de constituer un « réseau de veille épidémiologique et de collaboration analytique » au sein de la SFTA.

Dans le cadre de ses missions de santé publique, notre laboratoire a pour ambition d'initier la constitution d'un réseau d'alerte et de veille dédié aux NPS.
De par notre compétence diagnostique d'ores et déjà reconnue sur le plan national, notre laboratoire est actuellement un interlocuteur privilégié dans le domaine des NPS (i) du réseau des CEIP-A et donc par extension, de l'ANSM (Direction NEURHO / Pôle stupéfiants, psychotropes et médicaments des addictions aux stupéfiants) et (ii) de la MILDECA (Mission Interministérielle de Lutte contre les Drogues Et les Conduites Addictives).
Cette implication forte dans ce domaine des NPS nous a permis d'être reconnus par la MILDECA comme laboratoire de référence spécialisé dans l'identification et l'analyse des NPS sur le territoire français.
Une convention intitulée « Recueil de prélèvements biologiques – admission aux urgences NPS » a été signée en 2016 entre notre laboratoire et la MILDECA. Ce projet collaboratif a pour objet de permettre à notre laboratoire d'analyser les échantillons biologiques des patients admis en réanimation à l'Hôpital Lariboisière de Paris pour des intoxications, avérées ou suspectées, à des NPS ; l'objectif étant d'évaluer la pertinence des analyses systématiques pour une meilleure prise en charge des patients intoxiqués.

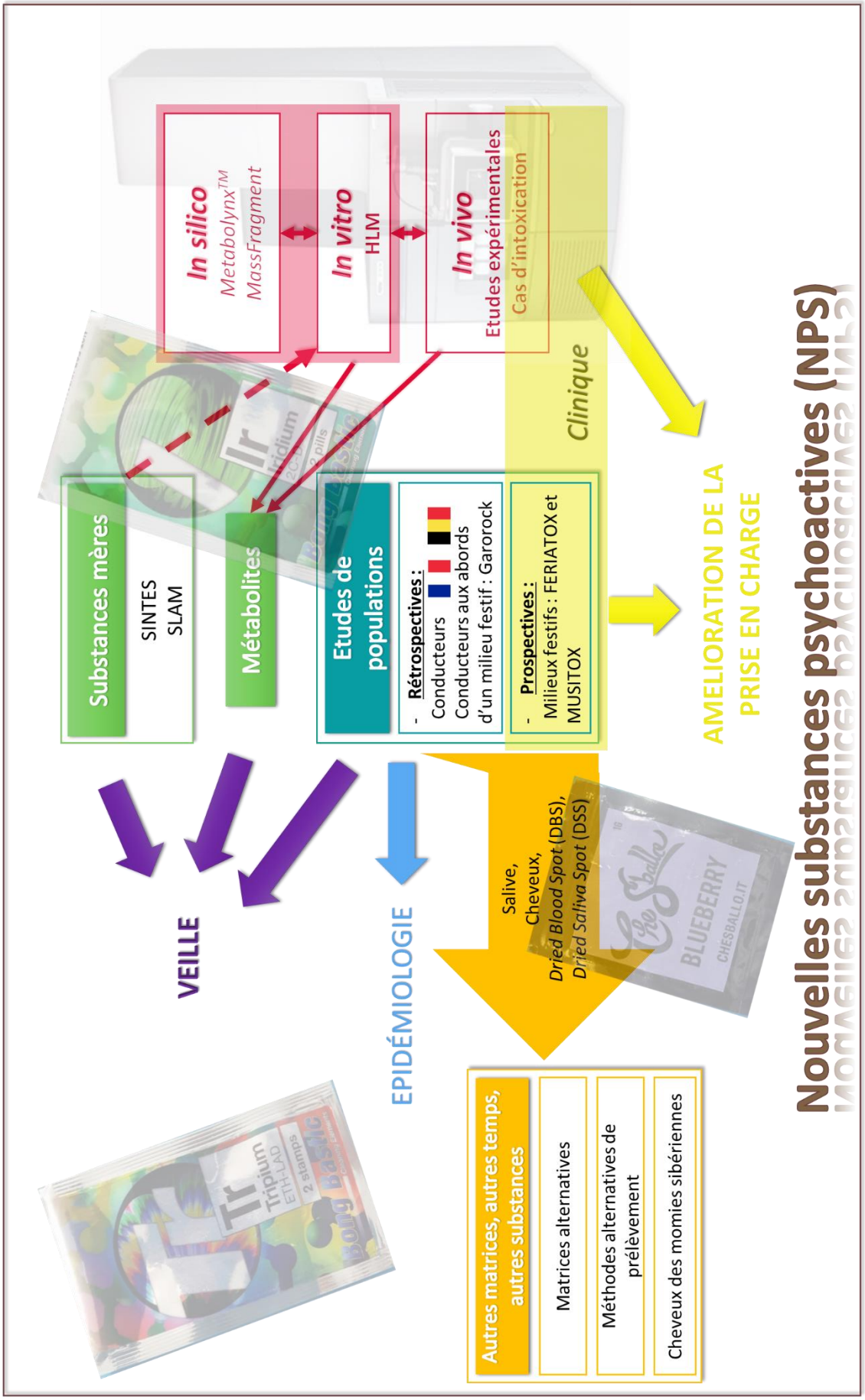
Par ailleurs, les données issues de l'étude DRAMES et concernant spécifiquement les décès ayant impliqué des NPS peuvent être exploitées, mais elles ne sont actuellement disponibles qu'après un délai supérieur à une année. Il en est de même pour les données issues du dispositif SINTES de l'OFDT, relais français du Système d'alerte précoce européen (EWS). Au sein d'un réseau déclaratif en temps réel, les cas d'intoxication/exposition aux NPS recueillis par les CEIP-A pourraient être déclarés en temps réel par le biais d'une liste de diffusion intégrant les toxicologues analystes et réciproquement, pour les cas observés

par les toxicologues analystes, permettant ainsi une diffusion rapide de l'information à tous. Les modalités pratiques de fonctionnement de validation des données et de mise en œuvre (ANSM, réseau des CEIP-A, MILDECA, SFTA) d'un tel système d'alerte et de veille concernant les NPS, demeurent à discuter. L'ANSM et le réseau des CEIP-A ont déjà donné un avis favorable à cette proposition.
Les données issues de ce réseau pourraient alimenter une étude nationale annuelle (à l'instar des études annuelles existantes dans le domaine : DRAMES, Soumission Chimique et Décès Toxiques par Antalgiques) sous la direction de L'ANSM.

Conclusion

Depuis une dizaine d'années en France, les NPS sont un phénomène émergent et préoccupant car ils sont impliqués dans des cas d'intoxications et de décès. C'est une thématique à laquelle j'ai été sensibilisée, au laboratoire, depuis le début de leur apparition sur le territoire français en analysant les échantillons du dispositif SINTES. Les difficultés analytiques sont nombreuses de par : la multitude des NPS, le « turnover », la difficulté de se procurer les standards pour enrichir nos bases de données spectrales, les faibles concentrations sanguines et le manque de données sur le métabolisme. Consciente de toutes ces difficultés et avec l'envie d'améliorer notre outil de diagnostic et donc, la prise en charge des patients, je me suis engagée dans cette thèse.

De mon point de vue, ce défi analytique associant les approches *in vivo*, *in vitro* et *in silico* est relevé. Mais, cet outil analytique développé doit continuer d'être alimenté pour demeurer performant.
Pendant ces 3 années, j'ai eu l'occasion d'encadrer de nombreux stagiaires pour m'aider dans les différentes applications : j'ai ainsi appris à déléguer. C'était également un réel plaisir de leur transmettre mes connaissances, d'échanger nos idées ensemble.
Le stage que j'ai réalisé au sein de l'équipe INSERM - UMR 1241 de Rennes a été très enrichissant, me permettant de redécouvrir la culture cellulaire et en particulier la lignée Hepa-RG.
Cette thèse m'a donné l'opportunité de participer à de nombreux congrès dans le domaine de la toxicologie analytique pour y présenter plusieurs de mes travaux sous forme de communications affichées ou orales, mais également de participer à des séminaires organisés par les CEIP et centres d'addictovigilance.
J'ai apprécié les nombreuses collaborations et je serais ravie que celles-ci perdurent au-delà de cette thèse, ce qui représenterait une reconnaissance, une confiance en nos compétences.
J'ai mené ma thèse en parallèle de mes fonctions de technicienne au sein du laboratoire. Et par conséquent, je n'ai pas réussi à y consacrer le maximum de mon temps avec regrets. J'aurais aimé être plus réactive, performante dans le délai de restitution des résultats pour certaines études.
Malgré cela, je ne regrette absolument pas ces 3 années de thèse, cela a été un enrichissement scientifique très intense de par les travaux menés, les congrès auxquels j'ai participé et les nombreuses collaborations.


Nouvelles substances psychoactives (NPS)
VEILLE
Substances mères
SINTES
SLAM
Métabolites
EPIDÉMIOLOGIE
Etudes de populations
- Rétrospectives :
Conducteurs
Conducteurs aux abords d'un milieu festif : Garorock
- Prospectives :
Milieux festifs : FERIATOX et MUSITOX
Salive,
Cheveux,
Dried Blood Spot (DBS),
Dried Saliva Spot (DSS)
Autres matrices, autres temps, autres substances
Matrices alternatives
Méthodes alternatives de prélèvement
Cheveux des momies sibériennes
In silico
MetabolynxTM
MassFragment
In vitro
HLM
In vivo
Etudes expérimentales
Cas d'intoxication
Clinique
AMELIORATION DE LA PRISE EN CHARGE

Bibliographie

1. EMCDDA. Rapport européen sur les drogues. Tendances et évolutions. 2018;96.

2. UNODC. Understanding the synthetic drug market : the NPS factor. UNODC; 2018. (Global Smart Update). Report No.: 19.

3. Lahaie E, Martinez M, Cadet-Taïrou A. Nouveaux produits de synthèse et Internet. 2013;4:1-8.

4. Goullé J-P, Mura P, Guerbet M. Le cybermarché noir des drogues illicites. Toxicol Anal Clin. 2017;29(2):S20.

5. EMCDDA. Rapport européen sur les drogues. Tendances et évolutions. 2017;96.

6. Lahaie E, Cadet-Taïrou A. Méphédrone et autres nouveaux stimulants de synthèse en circulation. Saint-Denis: OFDT; 2010 p. 4. Report No.: Note d'information SINTES.

7. Eiden C, Leone Burgos S, Serre A, Carton L, Gerardin M, Le Boisselier R, et al. Éphénidine, diphénidine, méthoxphénidine : classement comme stupéfiant suite aux signalements de complications sévères liés à l'usage. Toxicol Anal Clin. 2018;30(2):S51.

8. Dumestre-Toulet V, Brault S, Penouil-Pucheu F. Cathinones de synthèse : 2 nouveaux cas d'intoxications au Flakka (α-PVP). Toxicol Anal Clin. 2016;28(2):S29.

9. Férec S, Abbara C, Le Roux G, Bretaudeau-Deguigne M, Deslandes G, Monteil-Ganière C, et al. 3-MMC et ?-PVP, 2 cathinones encore peu rencontrées : description clinico-analytique de 5 cas d'exposition. Toxicol Anal Clin. 2016;28(2):S40.

10. Gambier J, Boyer J-C, Chataignier A, Basset F, Bertrand N, Dorandeu A, et al. Changeons nos pratiques ! À propos de deux cas d'intoxication à la 4-méthyléthcathinone (4-MEC). Toxicol Anal Clin. 2017;29(2):S21-2.

11. Nachon-Phanithavong M, Richeval C, Gaulier J-M, Humbert L, Tournebize J, Kieffer P, et al. Intoxication aiguë et consommation chronique de cathinones chez un polyconsommateur. Toxicol Anal Clin. 2017;29(2):S22.

12. Abbara C, Férec S, Le Roux G, Bretaudeau-Deguigne M, Lelièvre B, Boels D, et al. 2,5-diméthoxy-4-chloroamphétamine (DOC), produit de substitution du LSD ? Description clinico-analytique de 5 cas d'exposition. Toxicol Anal Clin. 2016;28(2):S26.

13. Pizzoglio V, Cohen S, Bevalot F, Thiollière F, Gérard A, Boucher A, et al. Intoxication sévère par 2,5-diméthoxy-4-chloroamphétamine ou DOC. Toxicol Anal Clin. 2018;30(2):S71-2.

14. Ihadadene N, Janssen-Langenstein R, Romain S, Mazni F, Bayle E, Berthelon L, et al. 25I-NBOMe : hyperthermie maligne et arrêt cardiaque. Toxicol Anal Clin. 2017;29(2):S24.

15. Charreteur R, Gerardin M, Serre A, Faucherre V, Eiden C, Xatart S, et al. Complications graves liées à l'usage par voie injectable d'éthylphénidate : présentation de 2 cas. Toxicol Anal Clin. 2018;30(2):S71.

16. Ferec S, Leborgne I, Bruneau C, Bourgine J, Valette X, Abbara C, et al. Syndrome sérotoninergique sévère après ingestion d'α-méthyl-tryptamine (AMT). Toxicol Anal Clin. 2015;27(2):S25.

17. Ferec S, Gegu C, Bruneau C, Leroux G, Abbara C, Lelievre B, et al. Méthiopropamine, méthoxphénidine, diphénidine, D2PM, 5-MeO-DALT : à propos de nouveaux cas d'exposition unique ou en polyconsommation. Toxicol Anal Clin. 2015;27(2):S24.

18. Le Roux G, Bruneau C, Ferec S, Gegu C, Balter C, Roussel O, et al. Premiers cannabinoïdes de synthèse au centre antipoison et de toxicovigilance d'Angers : à propos de quatre cas. Toxicol Anal Clin. 2015;27(2):S63.

19. Allard S, Monteil-Ganiere C, Visseaux G, Deslandes G, Clément R. « Chemsex » : 2 cas de décès. Toxicol Anal Clin. 2017;29(2):S21.

20. Lelong J, Brunet B, Afonso L, Voyer M, Richeval C, Humbert L, et al. Décès accidentel à la suite d'une injection de B2 Ultra. Toxicol Anal Clin. 2018;30(2):S52.

21. Bottinelli C, Gaillard Y, Fanton L, Bévalot F. À propos de deux décès par intoxication impliquant la 3-MMC. Toxicol Anal Clin. 2016;28(2):S25.

22. Frezil S, Eiden C, Cathala P, Peyriere H, Baccino E, Mathieu O. Distribution de la PVP et son métabolite oxo-PVP : à propos d'un cas létal. Toxicol Anal Clin. 2015;27(2):S26.

23. Dumestre-Toulet V, Vally R, Labadie M, Brault S, Humbert L, Castaing N, et al. Premier décès français impliquant le 5-APB associé à d'autres « nouveaux produits de synthèse » acquis via Internet. Toxicol Anal Clin. 2015;27(2):S23-4.

24. Baccati C, Delage M, Descoeur J, Baccino E, Mathieu O. Éléments de distribution post-mortem de la 4-méthylethcathinone et du métabolite déséthylé : à propos de deux décès. Toxicol Anal Clin. 2018;30(2):S22-3.

25. Fouilhé Sam-Laï N, Eysseric H, Yahiaoui N, Gaulier J-M, Dumestre-Toulet V, Mallaret M. Décès en relation avec l'abus de médicaments et substances (DRAMES) et nouveaux produits de synthèse (NPS) : combien de cas depuis 5 ans ? Toxicol Anal Clin. 2018;30(2):S51-2.

26. Bui T-V, Batisse A, Marillier M, Bourgogne E, Djezzar S, Megarbane B. L'arrivée des opioïdes de synthèse en France, un signal d'addictovigilance à surveiller : illustration par un cas clinique. Toxicol Anal Clin. 2017;29(2):S60-1.

27. UNODC. Market anlysis if synthetic drugs. Amphetamine-type stimulants, new psychoactive substances. 2017 p. 60.

28. Van Bever WF, Niemegeers CJ, Schellekens KH, Janssen PA. N-4-Substituted 1-(2-arylethyl)-4-piperidinyl-N-phenylpropanamides, a novel series of extremely potent analgesics with unusually high safety margin. Arzneimittelforschung. 1976;26(8):1548-51.

29. Papsun D, Isenschmid D, Logan BK. Observed Carfentanil Concentrations in 355 Blood Specimens from Forensic Investigations. J Anal Toxicol. 2017;41(9):777-8.

30. Domanski K, Kleinschmidt KC, Schulte JM, Fleming S, Frazee C, Menendez A, et al. Two cases of intoxication with new synthetic opioid, U-47700. Clin Toxicol. 2017;55(1):46-50.

31. Pivert G. Spectrométrie de masse associée à la chromatographie liquide : technologie, applications. IRBM News. 2008;29(3-4):32-5.

32. ElSohly MA, Gul W, Murphy TP, Avula B, Khan IA. LC-(TOF) MS Analysis of Benzodiazepines in Urine from Alleged Victims of Drug-Facilitated Sexual Assault. J Anal Toxicol. 2007;31(8):505-14.

33. Polettini A, Gottardo R, Pascali JP, Tagliaro F. Implementation and Performance Evaluation of a Database of Chemical Formulas for the Screening of Pharmaco/Toxicologically Relevant Compounds in Biological Samples Using Electrospray Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry. Anal Chem. 2008;80(8):3050-7.

34. Saussereau É, Imbert L. Intérêt et applications en toxicologie analytique du couplage UPLC-Spectrométrie de masse haute résolution avec extraction en ligne des échantillons. Rev Francoph Lab. 2016;2016(479):59-67.

35. Kolmonen M, Leinonen A, Pelander A, Ojanperä I. A general screening method for doping agents in human urine by solid phase extraction and liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. Anal Chim Acta. 2007;585(1):94-102.

36. Ojanperä S, Pelander A, Pelzing M, Krebs I, Vuori E, Ojanperä I. Isotopic pattern and accurate mass determination in urine drug screening by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2006;20(7):1161-7.

37. Humbert L, Richeval C. Analyse toxicologique avec mesure par « masse exacte ». Caractérisation de métabolites urinaires par couplage UPLC/QTOF : apports et intérêts dans le cadre de la soumission chimique. Ann Toxicol Anal. 2012;24(2):87-96.

38. Akoka S, Barantin L, Trierweiler M. Concentration Measurement by Proton NMR Using the ERETIC Method. Anal Chem. 1999;71(13):2554-7.

39. Richeval C, Gicquel T, Hugbart C, Le Dare B, Allorge D, Morel I, et al. In vitro Characterization of NPS Metabolites Produced by Human Liver Microsomes and the HepaRG Cell Line Using Liquid Chromatographyhigh Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Analysis: Application to Furanyl Fentanyl. Curr Pharm Biotechnol. 2017;18(10):806-14.

40. Marillier M, Batisse A, Richeval C, Labrouve V, Martinez M, Allorge D, et al. Chemsex, NPS et réduction des risques et des dommages : résultats préliminaires d'une étude pilote. Toxicol Anal Clin. 2017;29(2):S52.

41. Marillier M, Batisse A, Richeval C, Labrouve V, Martinez M, Allorge D, et al. CHEMSEX, NPS & risk reduction management: Preliminary results of a pilot study. Toxicol Anal Clin. 2017;29(1):47-56.

42. Richeval C, Humbert L, Lazes-Charmetant A, Martinez M, Nefau T, Gaulier J-M, et al. Le stock incroyable d'une consommatrice hors norme de NPS. Toxicol Anal Clin. 2016;28(2):S28.

43. Helander A, Bäckberg M, Beck O. Intoxications involving the fentanyl analogs acetylfentanyl, 4-methoxybutyrfentanyl and furanylfentanyl: results from the Swedish STRIDA project. Clin Toxicol. 2016;54(4):324-32.

44. Mohr ALA, Friscia M, Papsun D, Kacinko SL, Buzby D, Logan BK. Analysis of Novel Synthetic Opioids U-47700, U-50488 and Furanyl Fentanyl by LC–MS/MS in Postmortem Casework. J Anal Toxicol. 2016;40(9):708-17.

45. Beaune P. Cytochromes P450 humains : applications en toxicologie. Médecine Thérapeutique. 1998;4(6):493-9.

46. Guéguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JMA. Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. Ann Biol Clin. 2006;64:14.

47. Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics: Cell Mol Life Sci. 2001;58(5):737-47.

48. Lewis DF, Ioannides C, Parke DV. Cytochromes P450 and species differences in xenobiotic metabolism and activation of carcinogen. Environ Health Perspect. 1998;106(10):633-41.

49. Guillouzo A. Nouvelles perspectives d'utilisation des hépatocytes humains au cours du développement préclinique des médicaments. Ann Pharm Fr. 2008;66(5-6):288-95.

50. Dinis-Oliveira RJ. Metabolomics of Methylphenidate and Ethylphenidate: Implications in Pharmacological and Toxicological Effects. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2017;42(1):11-6.

51. Kintz P, Richeval C, Jamey C, Ameline A, Allorge D, Gaulier J-M, et al. Detection of the designer benzodiazepine metizolam in urine and preliminary data on its metabolism: Metizolam identification in urine. Drug Test Anal. 2017;9(7):1026-33.

52. Boumrah Y, Humbert L, Phanithavong M, Khimeche K, Dahmani A, Allorge D. In vitro characterization of potential CYP- and UGT-derived metabolites of the psychoactive drug 25B-NBOMe using LC-high resolution MS: In vitro study of 25B-NBOMe metabolism. Drug Test Anal. 2016;8(2):248-56.

53. Allibe N, Richeval C, Phanithavong M, Faure A, Allorge D, Paysant F, et al. Fatality involving ocfentanil documented by identification of metabolites. Drug Test Anal. 2018;10(6):995-1000.

54. Allibe N, Richeval C, Willeman T, Humbert L, Allorge D, Maignan M, et al. Case reports: Four concomitant non-fatal intoxications with AB-FUBINACA and MDMA. Toxicol Anal Clin. 2017;29(1):101-10.

55. Richeval C, Boucher A, Humbert L, Phanithavong M, Wiart J-F, Moulsma M, et al. Retrospective identification of 25I-NBOMe metabolites in an intoxication case. Toxicol Anal Clin. 2017;29(1):71-81.

56. Watanabe S, Vikingsson S, Roman M, Green H, Kronstrand R, Wohlfarth A. In Vitro and In Vivo Metabolite Identification Studies for the New Synthetic Opioids Acetylfentanyl, Acrylfentanyl, Furanylfentanyl, and 4-Fluoro-Isobutyrylfentanyl. AAPS J. 2017;19(4):1102-22.

57. Van Rooy HH, Vermeulen MP, Bovill JG. The assay of fentanyl and its metabolites in plasma of patients using gas chromatography with alkali flame ionisation detection and gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr. 1981;223(1):85-93.

58. Richter LHJ, Flockerzi V, Maurer HH, Meyer MR. Pooled human liver preparations, HepaRG, or HepG2 cell lines for metabolism studies of new psychoactive substances? A study using MDMA, MDBD, butylone, MDPPP, MDPV, MDPB, 5-MAPB, and 5-API as examples. J Pharm Biomed Anal. 2017;143:32-42.

59. Goggin MM, Nguyen A, Janis GC. Identification of Unique Metabolites of the Designer Opioid Furanyl Fentanyl. J Anal Toxicol. 2017;41(5):367-75.

60. Labutin A, Temerdashev A, Dukova O, Suvorova E, Nemihin V. Identification of Furanoylfentanil and its Metabolites in Human Urine. J Environ Anal Toxicol. 2017;07(03).

61. Feasel MG, Wohlfarth A, Nilles JM, Pang S, Kristovich RL, Huestis MA. Metabolism of Carfentanil, an Ultra-Potent Opioid, in Human Liver Microsomes and Human Hepatocytes by High-Resolution Mass Spectrometry. AAPS J. 2016;18(6):1489-99.

62. Labroo RB, Paine MF, Thummel KE, Kharasch ED. Fentanyl metabolism by human hepatic by human hepatic and intestinal cytochrom P450 3A4 : Implications for individual variability in disposition, efficacy, and drug interactions. Drug Metab Dispos. 1997;5(9):1072-80.

63. Steuer AE, Williner E, Staeheli SN, Kraemer T. Studies on the metabolism of the fentanyl-derived designer drug butyrfentanyl in human in vitro liver preparations and authentic human samples using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS): Metabolism studies on the new fentanyl-derived designer drug butyrfentanyl. Drug Test Anal. 2017;9(7):1085-92.

64. Meyer MR, Dinger J, Schwaninger AE, Wissenbach DK, Zapp J, Fritschi G, et al. Qualitative studies on the metabolism and the toxicological detection of the fentanyl-derived designer drugs 3-methylfentanyl and isofentanyl in rats using liquid chromatography–linear ion trap–mass spectrometry (LC-MSn). Anal Bioanal Chem. 2012;402(3):1249-55.

65. Emoto C, Murayama N, Rostami-Hodjegan A, Yamazaki H. Methodologies for Investigating Drug Metabolism at the Early Drug Discovery Stage: Prediction of Hepatic Drug Clearance and P450 Contribution. Curr Drug Metab. 2010;11(8):678-85.

66. Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouët S, Morel F, et al. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. Drug Metab Dispos. 2005;34(1):75-83.

67. Michaut A, Le Guillou D, Moreau C, Bucher S, McGill MR, Martinais S, et al. A cellular model to study drug-induced liver injury in nonalcoholic fatty liver disease: Application to acetaminophen. Toxicol Appl Pharmacol. 2016;292:40-55.

68. Guillouzo A, Corlu A, Caroline Aninat, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C. The human hepatoma HepaRG cells: A highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. Chem Biol Interact. 2007;168(1):66-73.

69. Bachour-El Azzi P, Sharanek A, Abdel-Razzak Z, Antherieu S, Al-Attrache H, Savary CC, et al. Impact of Inflammation on Chlorpromazine-Induced Cytotoxicity and Cholestatic Features in HepaRG Cells. Drug Metab Dispos. 2014;42(9):1556-66.

70. Kronstrand R, Brinkhagen L, Birath-Karlsson C, Roman M, Josefsson M. LC-QTOF-MS as a superior strategy to immunoassay for the comprehensive analysis of synthetic cannabinoids in urine. Anal Bioanal Chem. 2014;406(15):3599-609.

71. Marquet P. LC-MS vs. GC-MS, online extraction systems, advantages of technology for drug screening assays. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2012;902:15-27.

72. Richeval C, Humbert L, Nefau T, Martinez M, Allorge D, Gaulier J-M. The comeback of Ecstasy: New designs and increased MDMA content. Toxicol Anal Clin. 2017;29(1):144-5.

73. Lahaie E, Martinez M, Cadet A. MDMA poudre et comprimé (Ecstasy). Composition et aspect. NOTES SINTES. 2013;2013(3):8.

74. Richeval C. Nouveaux designs & nouveaux dosages des comprimés d'ecstasy. Journée thématique MS - Session Biologie clinique & Diagnostic, Société Waters; 2016 oct; Paris, France.

75. Richeval C, Clin V, Humbert L, Nefau T, Gaulier J-M, Allorge D. Le retour des comprimés d'ecstasy : nouveaux designs, nouveaux dosages…. Toxicol Anal Clin. 2016;28(2):S36-7.

76. Batisse A, Marillier M, Chevallier C, Bourgogne E, Grégoire M, Laprévote O, et al. "NRG-3": What's in this? Toxicol Anal Clin. 2017;29(1):96-100.

77. Batisse A, Chevallier C, Richeval C, Labrouve V, Martinez M, Allorge D, et al. ChemSex, NPS et réduction des risques : intérêt de l'analyse de produits. Toxicol Anal Clin. 2018;30(2):S73.

78. Phanithavong M, Richeval C, Boumrah Y, Caous A-S, Deheul S, Humbert L, et al. Apport d'une stratégie analytique combinant des approches in vitro, in silico et in vivo dans un cas de polyintoxication impliquant deux nouvelles drogues de synthèse. Toxicol Anal Clin. 2015;27(2):S20-1.

79. Balkhi SE, Dulaurent S, Lanneluc A, Pouche L, Moreau F, Paraf F, et al. Diclazépam et intoxication fatale par l'oxycodone : à propos d'un cas. Toxicol Anal Clin. 2015;27(2):S38-9.

80. Caous A-S, Carton L, Deheul S, Gaulier J-M, Allorge D, Humbert L, et al. La soumission chimique dans le Nord-Pas-de-Calais : état des lieux des cas de 2011 à 2015. Toxicol Anal Clin. 2017;29(2):S54.

81. Wiart J-F, Clin V, Richeval C, Humbert L, Garat A, Gaulier J-M, et al. Recherche et/ou dosage simultané en 10 minutes des cannabinoïdes, des opiacés/opioïdes, des dérivés amphétaminiques et

de la cocaïne et ses métabolites, dans le sang total par UPLC-MS/MS. Toxicol Anal Clin. 2015;27(2):S36.

82. Coopman V, Cordonnier J, De Leeuw M, Cirimele V. Ocfentanil overdose fatality in the recreational drug scene. Forensic Sci Int. 2016;266:469-73.

83. Dussy FE, Hangartner S, Hamberg C, Berchtold C, Scherer U, Schlotterbeck G, et al. An Acute Ocfentanil Fatality: A Case Report with Postmortem Concentrations. J Anal Toxicol. 2016;1-6.

84. Seeger E. Pykrolidino ketones.; 1967/ A. Vol. Patent US3314970. 1967.

85. Uchiyama N, Shimokawa Y, Kawamura M, Kikura-Hanajiri R, Hakamatsuka T. Chemical analysis of a benzofuran derivative, 2-(2-ethylaminopropyl)benzofuran (2-EAPB), eight synthetic cannabinoids, five cathinone derivatives, and five other designer drugs newly detected in illegal products. Forensic Toxicol. 2014;32(2):266-81.

86. Odoardi S, Romolo FS, Strano-Rossi S. A snapshot on NPS in Italy: Distribution of drugs in seized materials analysed in an Italian forensic laboratory in the period 2013–2015. Forensic Sci Int. 2016;265:116-20.

87. Péterfi A, Csorba J, Figeczki T, Kiss J, Medgyesi-Frank K, Posta J, et al. Drug residues in syringes and other injecting paraphernalia in Hungary. Drug Test Anal. 2018;10(2):357-64.

88. Beck O, Bäckberg M, Signell P, Helander A. Intoxications in the STRIDA project involving a panorama of psychostimulant pyrovalerone derivatives, MDPV copycats. Clin Toxicol. 2018;56(4):256-63.

89. Klavž J, Gorenjak M, Marinšek M. Suicide attempt with a mix of synthetic cannabinoids and synthetic cathinones: Case report of non-fatal intoxication with AB-CHMINACA, AB-FUBINACA, alpha-PHP, alpha-PVP and 4-CMC. Forensic Sci Int. 2016;265:121-4.

90. Fujita Y, Mita T, Usui K, Kamijo Y, Kikuchi S, Onodera M, et al. Toxicokinetics of the Synthetic Cathinone α-Pyrrolidinohexanophenone. J Anal Toxicol. 2018;42(1):e1-5.

91. Paul M, Bleicher S, Guber S, Ippisch J, Polettini A, Schultis W. Identification of phase I and II metabolites of the new designer drug α-pyrrolidinohexiophenone (α-PHP) in human urine by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS): Phase I and II metabolites of α-PHP. J Mass Spectrom. 2015;50(11):1305-17.

92. Manier SK, Richter LHJ, Schäper J, Maurer HH, Meyer MR. Different in vitro and in vivo tools for elucidating the human metabolism of alpha-cathinone-derived drugs of abuse. Drug Test Anal. 2018;

93. Nachon-Phanithavong M, Richeval C, Gaulier J-M, Humbert L, Tournebize J, Kieffer P, et al. Intoxication aiguë et consommation chronique de cathinones chez un polyconsommateur. Toxicol Anal Clin. mai 2017;29(2):S22.

94. Szmuszkovicz J. Analgesic n-(2-aminocycloaliphatic)benzamides. Vol. Patent US4098904A. 1978.

95. Cheney BV, Szmuszkovicz J, Lahti RA, Zichi DA. Factors affecting binding of trans-N-[2-(methylamino)cyclohexyl]benzamides at the primary morphine receptor. J Med Chem. 1985;28(12):1853-64.

96. Coopman V, Blanckaert P, Van Parys G, Van Calenbergh S, Cordonnier J. A case of acute intoxication due to combined use of fentanyl and 3,4-dichloro-N-[2-(dimethylamino)cyclohexyl]-N-methylbenzamide (U-47700). Forensic Sci Int. 2016;266:68-72.

97. Mc Intyre IM, Gary RD, Joseph S, Stabley R. A Fatality Related to the Synthetic Opioid U-47700: Postmortem Concentration Distribution. J Anal Toxicol. 2016;

98. Elliott SP, Brandt SD, Smith C. The first reported fatality associated with the synthetic opioid 3,4-dichloro- N-[2-(dimethylamino)cyclohexyl]- N-methylbenzamide (U-47700) and implications for forensic analysis: First reported fatality involving the synthetic opioid U-47700. Drug Test Anal. 2016;8(8):875-9.

99. Spargo E. Two fatalities involving the use of the synthetic opioid U-47700. ToxTalk. 2016;40(1):9-13.

100. Ruan X, Chiravuri S, Kaye AD. Comparing fatal cases involving U-47700. Forensic Sci Med Pathol. 2016;12(3):369-71.

101. Zaney M, Shoff EN, Hime GW, Boland DM. Detection of U-47700 in Blood and Drug Paraphernalia from Postmortem Cases [Internet]. SOFT - TIAFT; 2017 [cité 19 juill 2018] p. 85. Disponible sur: http://www.soft-tox.org/files/annual_meeting/SOFT_2017_Abstracts.pdf

102. Kriikku P, Ojanperä I. Characterization of 8 Post-Mortem Cases Positive for U-47700. 2017 p. 216.

103. Rojek S, Klys M, Kula K, Romańczuk A, Maciów-Głąb M, Moskala A. A Deaths Related to the Synthetic Opioid U-47700: Blood/Liver Concentrations Distribution. SOFT - TIAFT; 2017 p. 264.

104. Dziadosz M, Klintschar M, Teske J. Postmortem concentration distribution in fatal cases involving the synthetic opioid U-47700. Int J Legal Med. 2017;131(6):1555-6.

105. Shoff EN, Zaney ME, Kahl JH, Hime GW, Boland DM. Qualitative Identification of Fentanyl Analogs and Other Opioids in Postmortem Cases by UHPLC-Ion Trap-MSn. J Anal Toxicol. 2017;41(6):484-92.

106. Schneir A, Metushi IG, Sloane C, Benaron DJ, Fitzgerald RL. Near death from a novel synthetic opioid labeled U-47700: emergence of a new opioid class. Clin Toxicol. 2017;55(1):51-4.

107. Short S, Schultz J, Lawler E, Wells K. Postmortem Cases Involving Fentanyl Derivatives and U-47700. Soc Forensic Toxicol Inc. 2016;40(4).

108. Krotulski AJ, Mohr ALA, Papsun DM, Logan BK. Metabolism of novel opioid agonists U-47700 and U-49900 using human liver microsomes with confirmation in authentic urine specimens from drug users. Drug Test Anal. 2018;10(1):127-36.

109. Jones MJ, Hernandez BS, Janis GC, Stellpflug SJ. A case of U-47700 overdose with laboratory confirmation and metabolite identification. Clin Toxicol. 2017;55(1):55-9.

110. Fleming SW, Cooley JC, Johnson L, Frazee CC, Domanski K, Kleinschmidt K, et al. Analysis of U-47700, a Novel Synthetic Opioid, in Human Urine by LC–MS–MS and LC–QToF. J Anal Toxicol. 2016;

111. Seither J, Reidy L. Confirmation of Carfentanil, U-47700 and Other Synthetic Opioids in a Human Performance Case by LC–MS-MS. J Anal Toxicol. 2017;41(6):493-7.

112. Favretto D, Tucci M, Vogliardi S, Stocchero G, Nalesso A, Snenghi R. U-47700 Threat to Personal and Public Health. 2017 p. 120.

113. Gaulier J-M. Chernobyl syndrome? Toxicol Anal Clin. 2017;29(1):3.

114. Gaulier JM, Canal M, Pradeille JL, Marquet P, Lachâtre G. New drugs at « rave parties »: ketamine and prolintane. Acta Clin Belg. 2002;57 Suppl 1:41-6.

115. Lebeau A. Consommation de substances psychoactives au cours des Ferias du Sud-Ouest: quelles substances en cause et quels tableaux cliniques pour les patients admis dans les postes médicaux avancés? (étude prospective FERIATOX°). Université de Bordeaux; 2017.

116. Labadie M, Capaldo L, Richeval C, Titier K, Blondet R, Courtois A, et al. Consommation de substances psychoactives pendant les « feria » du Sud-Ouest : peut-on avancer sur la connaissance des substances en cause ? Thérapie. 2017;72(1):152-3.

117. Richeval C, Phanithavong M, Wiart J-F, Humbert L, Daveluy A, Capaldo L, et al. Consommation de substances psychoactives lors des férias du Sud-Ouest : Fériatox. Toxicol Anal Clin. 2016;28(2):S23.

118. Labadie M, Capaldo L, Richeval C, Titier K, Blondet R, Courtois A, et al. Consommation de substances psychoactives pendant les « féria » du Sud-Ouest : peut-on avancer sur la connaissance des substances en cause ? 9èmes Ateliers de la pharmacodépendance et addictovigilance; 2016 oct; Biarrtiz, France.

119. Labadie M, Capaldo L, Richeval C, Titier K, Blondet R, Courtois A, et al. Consommation de substances psychoactives pendant les « féria » du Sud-Ouest : peut-on avancer sur la connaissance des substances en cause ?. 6ème journée de Toxicologie d'Aquitaine Poitou – Charentes; 2016 avr; Bordeaux, France.

120. Labadie M, Capaldo L, Richeval C, Titier K, Blondet R, Courtois A, et al. Consommation de substances psychoactives pendant les « feria » du Sud-Ouest. Congrès Annuel de la Société Française de Toxicologie Clinique; 2016 mars; Nancy, France.

121. Gandilhon M, Cadet-Taïrou A, Martinez M. L'usage de kétamine en France : tendances récentes (2012-2013). :8.

122. Daveluy A, Capaldo L, Richeval C, Regueme S-C, Bragança C, Courtois A, et al. Projet Musitox ® : consommation de substances psychoactives lors d'un festival de musique en Aquitaine en 2017. Toxicol Anal Clin. 2018;30(2):S68-9.

123. Labadie M, Capaldo L, Richeval C, Regueme S, Blondet R, Courtois A, et al. Projet Musitox® : consommation de substances psychoactives lors des festivals de musique en Aquitaine en 2017. Congrès Annuel de la Société Française de Toxicologie Clinique; 2018 avr; Angers, France.

124. Karinen R, Tuv SS, Øiestad EL, Vindenes V. Concentrations of APINACA, 5F-APINACA, UR-144 and its degradant product in blood samples from six impaired drivers compared to previous reported concentrations of other synthetic cannabinoids. Forensic Sci Int. 2015;246:98-103.

125. Musshoff F, Madea B, Kernbach-Wighton G, Bicker W, Kneisel S, Hutter M, et al. Driving under the influence of synthetic cannabinoids ("Spice"): a case series. Int J Legal Med. 2014;128(1):59-64.

126. Yeakel JK, Logan BK. Blood Synthetic Cannabinoid Concentrations in Cases of Suspected Impaired Driving. J Anal Toxicol. 2013;37(8):547-51.

127. Lemos NP. Driving Under the Influence of Synthetic Cannabinoid Receptor Agonist XLR-11. J Forensic Sci. 2014;59(6):1679-83.

128. Nachon-Phanithavong M, Wille S, Richeval C, Di Fazio V, Samyn N, Humbert L, et al. New psychoactive substances in a drugged driving population: Preliminary results. Toxicol Anal Clin. févr 2017;29(1):41-6.

129. Wille SMR, Richeval C, Nachon-Phanithavong M, Gaulier JM, Di Fazio V, Humbert L, et al. Prevalence of new psychoactive substances and prescription drugs in the Belgian driving under the influence of drugs population. Drug Test Anal. 2018;10(3):539-47.

130. Nachon-Phanithavong M, Richeval C, Wille S, Di Fazio V, Samyn N, Humbert L, et al. Analyses sanguines de confirmation lors de contrôles routiers en Belgique : apport du screening toxicologique par UPLC-QTOF et comparaison avec les procédures françaises. Toxicol Anal Clin. 2016;28(2):S12-3.

131. Phanithavong M, Wille SMR, Richeval C, Di Fazio V, Samyn N, Humbert L, et al. The involvement of new psychoactive substances and prescribed drugs in the drugged driving population. 54th International Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists; 2016; Brisbanne, Australie.

132. Richeval C, Nachon-Phanithavong M, Wiart J-F, Vanhoye X, Humbert L, Gaulier J-M, et al. Dried Saliva Spots (DSS), tests immunochimiques de dépistage salivaire et produits stupéfiants. Toxicol Anal Clin. 2017;29(2):S16-7.

133. Richeval C, Wille SMR, Nachon-Phanithavong M, Samyn N, Allorge D, Gaulier J. New psychoactive substances in oral fluid of French and Belgian drivers in 2016. Int J Drug Policy. 2018;57:1-3.

134. Dumestre-Toulet V, Richeval C, Wiart J-F, Vanhoye X, Humbert L, Nachon-Phanithavong M, et al. Consommation de nouveaux produits de synthèse identifiée par analyse salivaire de conducteurs festivaliers aux abords de festivals de musique électronique dans le Sud-Ouest en 2017. Toxicol Anal Clin. 2018;30(2):S46-7.

135. Mohr ALA, Friscia M, Yeakel JK, Logan BK. Use of synthetic stimulants and hallucinogens in a cohort of electronic dance music festival attendees. Forensic Sci Int. 2018;282:168-78.

136. Daveluy A, Castaing N, Cherifi H, Richeval C, Humbert L, Faure I, et al. Acute Methiopropamine Intoxication After “Synthacaine” Consumption. J Anal Toxicol. 2016;(40):748-50.

137. Richeval C, Boucher A, Humbert L, Phanithavong M, Wiart J-F, Moulsma M, et al. Retrospective identification of 25I-NBOMe metabolites in an intoxication case. Toxicol Anal Clin. 2017;29(1):71-81.

138. Bodeau S, Bennis Y, Régnaut O, Fabresse N, Richeval C, Humbert L, et al. LSD instead of 25I-NBOMe: The revival of LSD? A case report. Toxicol Anal Clin. 2017;29(1):139-43.

139. World Health Organization. 25I-NBOMe Critical Review Report. Genève: 36th Expert Committee on Drug Dependence; 2014 p. 24.

140. Bodeau S, Régnaut O, Bennis Y, Quinton M-C, Alvarez J-C, Richeval C, et al. Intoxication au LSD : la recherche d’une « goutte » pas si exotique. Toxicol Anal Clin. 2016;28(2):S27.

141. Wiart J-F, Nachon-Phanithavong M, Richeval C, Vanhoye X, Caous A-S, Carton L, et al. Analyses capillaires d’un cas d’intoxication par la diphénidine et le 5-MeO-DALT fournissant des données sur les concentrations dans les cheveux de nombreux nouveaux produits de synthèse. Toxicol Anal Clin. 2017;29(2):S25-6.

142. Ameline A, Richeval C, Gaulier J-M, Raul J-S, Kintz P. Characterization of Flunitrazolam, a New Designer Benzodiazepine, in Oral Fluid After a Controlled Single Administration. J Anal Toxicol. 2018;1-3.

Articles

Article 1 : *In vitro* characterization of NPS metabolites produced by human liver microsomes and the HEPA-RG cell line using liquid chromatography high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) analysis: application to furanyl fentanyl

Richeval Camille, Gicquel Thomas, Hugbart Chloé, Le Dare Brendan, Allorge Delphine, Morel Isabelle, Gaulier Jean-michel

Current Pharmaceutical Biotechnology. 2017;18(10):806-14.

https://doi.org/10.2174/1389201018666171122124401

Article 2 : The comeback of Ecstasy : New designs and increased MDMA content.

Richeval Camille, Humbert Luc, Nefau Thomas, Martinez Magali, Allorge Delphine, Gaulier Jean-michel

Toxicologie Analytique et Clinique. 2017;29(1):144-5.

https://doi.org/10.1016/j.toxac.2016.09.003

Article 3 : CHEMSEX, NPS & risk reduction management: Preliminary results of a pilot study

Marillier Maude, Batisse Anne, Richeval Camille, Labrouve Vincent, Martinez Magali, Allorge Delphine, Grégoire Muriel, Batel Philippe, Nefau Thomas, Chevallier Cécile, Gaulier Jean-michel, Djezzar Samira

Toxicologie Analytique et Clinique. 2017;29(1):47-56.

https://doi.org/10.1016/j.toxac.2016.12.003

Article 4 : Fatality involving ocfentanil documented by identification of metabolites.

Allibe Nathalie, Richeval Camille, Phanithavong Mélodie, Faure Amandine, Allorge Delphine, Paysant François, Stanke-Labesque Françoise, Eysseric-Guerin Hélène, Gaulier Jean-michel

Drug Testing and Analysis. 2018 ;10(6):995-1000

https://doi.org/10.1002/dta.2326

Article 5 : Relevance of metabolite identification to detect new synthetic opioid intoxications illustrated by U-47700

Richeval Camille, Gaulier Jean-michel, Romeuf Ludovic, Allorge Delphine, Gaillard Yvan

Article soumis au journal International Journal of Legal Medicine

International Journal of Legal Medicine

Relevance of metabolite identification to detect new synthetic opioid intoxications illustrated by U-47700

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Relevance of metabolite identification to detect new synthetic opioid intoxications illustrated by U-47700
Article Type:	Original Article
Corresponding Author:	Jean-michel GAULIER, Pham D, Ph D Centre Hospitalier Regional Universitaire de Lille Lille, FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Centre Hospitalier Regional Universitaire de Lille
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Camille RICHEVAL
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Camille RICHEVAL
	Jean-michel GAULIER, Pham D, Ph D
	Ludovic ROMEUF
	Delphine ALLORGE
	Yvan GAILLARD
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	Today, new psychoactive substances (NPS) producers increasingly appear to be targeting new synthetic opioids (NSOs) and the recent emergence of NSOs is causing considerable concern in North America and in Europe. For toxicologists, NSO detection in a forensic context presents three additional difficulties to the general NPS analytical detection challenge: (i) high frequency of new products, (ii) low concentrations (in µg/L range and under) in biological samples related to their high opioid potency, and (iii) extensive metabolism. In this context, the present work aims to highlight the relevance of NSO metabolite detection in potential intoxication cases. Illustration is given with U-47700, an emerging NSO, (i) that was identified in a powder recently collected in France and in a fatality case, (ii) whose metabolites were in vitro produced using human liver microsomes and their mass spectra (MS) added in our MS/MS and HRMS libraries, and (iii) for which metabolism data were compared to those of the literature : U-47700 was identified in the powder and at 3 µg/L in peripheral blood in the fatality case. In addition, high amounts of several U-47700 metabolites, especially N-desmethyl-U-47700, were observed in urine. Confrontation of these results to data found in the literature strongly suggests that this metabolite is regularly a better blood and (mainly) urine biomarker of U-47700 intake than U-47700 itself. Indeed, in this fatality and in other previous reports, N-desmethyl-U-47700 produced the main observed chromatographic signal (i) systematically in vitro (n=2; chromatographic peak area ratios to U-47700 are 1.73 and 19.8), and (ii) commonly in vivo, especially in urine (n=7; chromatographic peak area ratios to U-47700 are 0.8, 1.4, 1.9, 3.6, 4.9, 6.6 and 14.2). N,N-didesmethyl-U-47700 is also sometimes a better biomarker of U-47700 intake than U-47700 itself. Accordingly, we recommend adding N-desmethyl-U-47700 (and N,N-didesmethyl-U-47700) in mass spectrum databases used for toxicological screening in order to reduce the risk of false-negative results in intoxication cases involving U-47700.

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Author Comments:	April, 27th 2018 To the editor of International Journal of Legal Medecine Re: Relevance of metabolite identification to detect new synthetic opioid intoxications illustrated by U-47700 Dear Madam, Sir, Please find enclosed a manuscript entitled « Relevance of metabolite identification to detect new synthetic opioid intoxications illustrated by U-47700 » submitted as original article to International Journal of Legal Medecine. The manuscript contents are original and have not already been published or accepted for publication, either in whole or in part, in any form. Furthermore, no part of the manuscript is under consideration for publication elsewhere. Yours sincerely, Dr. Jean-michel Gaulier
Suggested Reviewers:	Alberto Salomone alberto.salomone@antidoping.piemonte.it Analytical approaches in fatal intoxication cases involving new synthetic opioids
	Helene EYSSERIC HEysseric@chu-grenoble.fr Recent publications in NSO forensic area

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Manuscript

Click here to download Manuscript U 47700 IJLM.docx

Click here to view linked References

Relevance of metabolite identification to detect new synthetic opioid intoxications illustrated by U-47700

Camille Richeval[1,2], Jean-michel Gaulier[1,2*], Ludovic Romeuf[3], Delphine Allorge[1,2], Yvan Gaillard[3]

1 - CHU Lille, Unité Fonctionnelle de Toxicologie, F-59000 Lille, France

2 - Univ. Lille, EA 4483 – IMPECS – IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine, F-59000 Lille, France

3 - LAT LUMTOX, F-07800 La Voulte sur Rhône, France

*Correspondence to Jean-michel Gaulier

Laboratory of Toxicology – CHRU

Bd du Professeur Jules Leclercq

CS 70 001

59037 LILLE Cedex

France

Email: jean-michel.gaulier@chru-lille.fr

Fax : +33 320444960

Abstract

Today, new psychoactive substances (NPS) producers increasingly appear to be targeting new synthetic opioids (NSOs) and the recent emergence of NSOs is causing considerable concern in North America and in Europe. For toxicologists, NSO detection in a forensic context presents three additional difficulties to the general NPS analytical detection challenge: (i) high frequency of new products, (ii) low concentrations (in µg/L range and under) in biological samples related to their high opioid potency, and (iii) extensive metabolism. In this context, the present work aims to highlight the relevance of NSO metabolite detection in potential intoxication cases. Illustration is given with U-47700, an emerging NSO, (i) that was identified in a powder recently collected in France and in a fatality case, (ii) whose metabolites were *in vitro* produced using human liver microsomes and their mass spectra (MS) added in our MS/MS and HRMS libraries, and (iii) for which metabolism data were compared to those of the literature : U-47700 was identified in the powder and at 3 µg/L in peripheral blood in the fatality case. In addition, high amounts of several U-47700 metabolites, especially *N*-desmethyl-U-47700, were observed in urine. Confrontation of these results to data found in the literature strongly suggests that this metabolite is regularly a better blood and (mainly) urine biomarker of U-47700 intake than U-47700 itself. Indeed, in this fatality and in other previous reports, *N*-desmethyl-U-47700 produced the main observed chromatographic signal (i) systematically *in vitro* (n=2; chromatographic peak area ratios to U-47700 are 1.73 and 19.8), and (ii) commonly *in vivo*, especially in urine (n=7; chromatographic peak area ratios to U-47700 are 0.8, 1.4, 1.9, 3.6, 4.9, 6.6 and 14.2). *N,N*-didesmethyl-U-47700 is also sometimes a better biomarker of U-47700 intake than U-47700 itself. Accordingly, we recommend adding *N*-desmethyl-U-47700 (and *N,N*-didesmethyl-U-47700) in mass spectrum databases used for toxicological screening in order to reduce the risk of false-negative results in intoxication cases involving U-47700.

Keywords

forensic, U-47700, metabolites, HLMs, LC-HRMS

Thèse - Université de Lille

Introduction

New psychoactive substances (NPS) consist in various narcotic or psychotropic drugs (i) that are not controlled by the 1961 United Nations Single Convention on Narcotic Drugs or the 1971 United Nations Convention on Psychotropic Substances, and (ii) that usually (but not exclusively) replicate chemical structures and/or pharmacological effects of classical drugs of abuse (DOA), such as opiates, ecstasy, amphetamine, cocaine or cannabis. Currently, NPS represent a significant challenge for both judicial and public health policy-makers, as well as an analytical and interpretive challenge for forensic toxicologists [1-4]. The use and online availability (on specialized websites) of NPS have rapidly increased over the last decade. For instance, 66 new substances were detected for the first time in Europe in 2016, bringing the number of NPS monitored by the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) to more than 620, of which 70 % were detected in 2015 [5,6]. Today, NPS manufacturers appear to be increasingly targeting new synthetic opioids (NSOs), such as fentanyl derivatives, and the recent emergence of NSOs is causing considerable concern in both North America and Europe. NSOs are not only sold on online markets (including darknet' ones), but also on the usual illicit market where they are sold as, or mixed with, heroin, other illicit drugs and even counterfeit medications. NSO intoxications result in a classical opioid toxidrome, which can be reversed with the competitive antagonist naloxone. However, naloxone doses have to be increased to be effective owing to the putative high opioid potency of NSOs [5]. For 3 years, deaths related to opioid use have been increasing in the USA, with a growing proportion due to NSOs. Until 2013, several deaths of heroin users have been described as related to the use of heroin contaminated with NSOs. Since then, fentanyl has caused deaths in every USA state and NSOs have completely infiltrated the North American heroin supply: illicit pills containing fentanyl, fentanyl analogs, and other NSOs, such as U-47700, are regularly detected, and over 700 deaths have been related to fentanyl and its analogs in the USA between 2013 and 2014 [7-9]. This increase of overdose deaths involving NSOs has shifted towards Europe, as notably indicated by increasing reports of non-fatal intoxications and deaths received by the Early Warning System of the EMCDDA [5,10,11]. Available NSOs currently encompass many fentanyl derivatives (e.g. acetylfentanyl, butyrylfentayl, carfentanyl, furanylfentanyl, ocfentanyl, …), piperazine (MT-

45) and benzoamide compounds (AH-7921, U-50488, U-51754, U-69,593, U-47700, U-48800, U-47931E and U-47900) (Figure 1) [8,12-17]. Among these latter, U-47700 is the most widespread one as it presents a set of characteristics (i.e. more euphoric than fentanyl analogues, more potent than AH-7921, cheap, and widely available) that make it particularly attractive to users [8,16,18,19].

U-47700 (3,4-dichloro-N-[2-(dimethylamino)cyclohexyl]-N-methylbenzamide) (Figure 2), structurally similar and isobaric to AH-7921, was developed in the 1970s by the Upjohn company in a search for non-addicting analgesics, but was never made commercially available for medical use [20]. Regarding μ-opioid receptor agonism, U-47700 is 7 to 8 times more potent than morphine and about 10 times less potent than fentanyl. U-47700 exhibits an ED50 in mice of 0.20 mg/kg through subcutaneous injection (to be compare to 0.83 mg/kg for morphine) [21-25]. U-47700 has recently re-emerged on the illicit drug market: it was first identified in Sweden in October 2014. Since then, there have been seizures of U-47700 (typically white powders, but also tablets, liquids, nasal spray and "spice-like" herbal incense) in the USA (at least 320 seizures in 2016) and European countries including Belgium, Denmark, Estonia, France, Germany, Lithuania, Slovenia, Spain, Sweden and United Kingdom [8,26,27]. U-47700 is sold under street names of "Fake morphine", "U4", "Pink" or "Pinky" (owing to synthesis impurities that color the drug powder in light pink). The main administration route for U-47700 was reported as oral followed by injection and sniffing [28]. U-47700 users report a shorter duration of action compared to that of heroin. Nevertheless, U-47700 has rapidly become popular owing to a cost per insufflated dose (common dose between 6 to 8 milligrams) less than 0.5 USD [16,19]. As a result, U-47700 has been involved in several intoxication and fatality cases since 2015. U-47700 exhibits opiate-like adverse effects (comprising tachycardia, nausea, anxiety, abdominal pain, drowsiness, myosis, respiratory depression, cyanosis, and depressed level of consciousness) that can be rapidly reversed with somewhat high doses of naloxone as reported in numerous intoxication cases [7,9,18,29]. Between October 2015 and September 2016, state and local US forensic labs have reported about 90 recorded cases related to U-47700, according to the National Forensic Laboratory Information System. From 2015 to 2016, at least 46 fatal overdose cases linked to U-47700 use were reported in USA [17,19,30-40]. As a response to this increasing public health threat, U-47700 received emergency scheduling and was placed, together with its derivatives, into Schedule 1 of the US Controlled Substances Act in November 2016 [41]. Over the same period, several intoxication and fatality cases were reported in Europe

including UK [42], Belgium [27,43], Germany [44], Finland [45] and France [46]. As a consequence, U-47700 is now controlled in at least four European countries (Sweden, Finland, France and United Kingdom) [26] and has been under international control (listed in Schedule 1 of the 1961 Convention) since 2017 [6].

The emergence of NPS with significant forensic implications like U-47700 is challenging regarding their identification in human biological samples [47]. In practice, usual toxicological screening tests (i.e. immunochemical tests used for DOA detection) are not adapted for NPS detection. Liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry detection methods (LC-HRMS) apparently show the best performance in comparative studies for drug screening assays as higher mass precision greatly facilitates identification of unknown compounds [48,49]. It is now obvious that such methods should be used in order to perform toxicological screening for NSOs, especially in case of opioid intoxication suspicion and concomitant negative preliminary results of usual opioid detection screening tests. Nevertheless, the main pitfall of detection of NSOs using LC-HRMS is the low detection limits needed because of low NSO concentrations observed in biological specimens. In such context, targeting for metabolites can improve NSO detection as they are extensively metabolised. In addition, even if the LC-HRMS method used is sensitive enough, trying to detect only the parent drug could lead to false-negative results, specifically when the delay between consumption and sampling (or death) has been too long, especially in case of extensive metabolism as regularly is the case for NSOs [50-53].

In this way, the identification of U-47700 metabolites, which would improve the efficiency of toxicological screening libraries, will enlarge the detection window of U-47700 in biological matrices in cases of U-47700 intake. Some *in vivo* [33,42,54-56], as well as *in vitro* [56], data about U-47700 metabolism have been recently reported.

In the context of a U-47700 powder analysis and toxicological investigations of a fatality case related to U-47700 intake, this work aims to investigate and discuss the relevance of identification of CYP- and UGT-dependent metabolites of U-47700 by means of (i) analyses of human liver microsome (HLM) incubates using liquid chromatography with high-resolution mass detection (LC-HRMS) and (ii) confrontation to recently reported data about U-47700 metabolism.

Case report

On April 2017, an unknown powder was collected from the SINTES (Système d'identification national des toxiques et substances) French scheme and, subsequently, delivered for analysis to our laboratory. The SINTES scheme is intended to document the toxicological composition of illegal substances in circulation in France. This 70-mg sample of a white powder was obtained from a 29-year-old user living in southern France. This man declared that this sample was a NSO obtained free of charge on an Internet site and that he experienced powerful opioid effects (including feelings of emotional well-being and euphoria) with short duration after repeated intakes. Owing to these effects, this user mentioned that this NSO could be regarded as "the crack of opiates".

Over the same period, a 19-year-old man was found dead at home in Southeast France. Some paroxetine tablets were found near the corps. Autopsy findings were not specific and the coroner concluded to a death related to a nonspecific asphyxia syndrome that could be of toxic origin. Biological samples (peripheral and cardiac blood, urine, vitreous humor, bile, and gastric content) were maintained at - 20°C until analyses and sent to a forensic toxicology laboratory.

Material and methods

Chemicals

β-OH-ethyltheophyllin (internal standard), methyl-clonazepam (internal standard), ammonium formate, formic acid, sulfosalicylic acid dihydrate, β- glucuronidase (*Helix pomatia*), alamethicin (*Trichoderma viride*), uridine diphosphate glucuronic acid (UDPGA), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), glucose-6-phosphate (G6P), 5-sulfosalicylic acid, were all purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Tetra-sodium salt of a reduced form of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NADPH) was purchased from Roche (Mannheim, Germany). A pool of human liver microsomes (HLMs) at a concentration of 20 mg of microsomal protein/mL, prepared from livers of 36 donors, including 11 women and 25 men, aged from 31 to 80 years, was purchased from Biopredic (La Bretèche, Saint Grégoire, France) and preserved at -80°C until use. U-47700 as a pure substance was provided by Cerilliant (Lyon, France). LC-MS grade water, ethanol, methanol and acetonitrile were purchased from Biosolve (Dieuze, France) and all other chemicals were of analytical grade and obtained from common commercial sources.

U-47700 powder NMR analysis

A LC-HRMS method (see below) was used to identify U-47700 in the powder sample. However, in order to confirm the absence of other compounds, such as synthesis impurities, and to check the purity of the U-47700 powder, this assay was completed by a nuclear magnetic resonance (NMR) analysis (already applied in a similar context) [52]. The NMR spectra were recorded on AVANCE 300 (Bruker Biospin, France) operating at 300 MHz equipped with a 5 mm quadruple nucleus probe (QNP) probe at 295 K. The 1H spectra were recorded with 64 scans, a 32-K time-domain data points with 4800 Hz spectral width, an acquisition time of 3.42 s, a relaxation delay of 2 s and a flip angle of 30°. The Free Induction Decays (FIDs) were transformed (0.3 Hz broadening) and the baseline was corrected. After thin manual grinding of the powder using a mortar, 7.5 mg was dissolved in 600 µL of methanol-D4 and the ERETIC (Electronic REference To access In vivo Concentrations) method was used for the determination of absolute concentrations of U-47700. ERETIC consisted of a digitally generated Gaussian peak (on single point calibration calibrated using a reference sample15 mg of caffeine in 600 µL de $CDCl_3$ and a control point using 10 mg of the same substance in 600 µL de $CDCl_3$) inserted into the spectrum of a sample by the software after processing the FID. With ERETIC, the value peak area integrals in the spectrum give directly information about the concentration of protons sample purity [57].

Toxicological investigations in post-mortem biological samples

Comprehensive screenings of drugs and toxic compounds in biological samples were performed using gas chromatography with mass spectrometry detection (GC-MS) or tandem mass spectrometry detection (GC-MS/MS), liquid chromatography with diode array detection (LC-DAD) or tandem mass spectrometry detection (LC-MS/MS) previously reported methods [58-61]. More selective assays for several classes of therapeutic drugs, drugs of abuse (DOA) or other toxicants were carried out in blood with various *ad-hoc* dedicated methods using LC-DAD, LC-MS/MS, GC-MS and headspace-GC-MS. In particular, U-47700 has been quantified in blood and urine using a dedicated LC-HRMS as follow.

LC-HRMS determination of U-47700

U-47700 concentrations were determined in blood and urine samples using a dedicated LC-HRMS method (XEVO G2-XS QTOF, Waters, Manchester, UK). Briefly, after addition of

100 µL of methanol containing methyl-clonazepam at 1.25 mg/L and β-OH-ethyltheophyllin at 16 mg/L (both as internal standards), 100 µL of sample (blood or urine samples) were subsequently diluted in 400 µL of 3 % 5-sulfosalicylic acid and centrifuged at 4 °C for 14 min at 32000 g. Seventy-five µL of the supernatant were then injected into the chromatographic system. The liquid chromatography system consisted of two binary solvent manager LC pumps, a sample manager autosampler and a column manager oven Acquity (Waters, Manchester, UK). Extraction was performed using an OASIS HLB on-line column (30 x 2.1 mm, 20 µm) (Waters, Manchester, UK) and mobile phase consisted in 0.2 % ammonia solution (A1) and 100% methanol (B1). Loading of the extract was performed with 0% B1 at a flow rate 2.0 mL/min for 0.5 min. Injection in the chromatographic system occurred at 0.5 min: valve switch and back-flushing for 13.5 min using the chromatographic separation mobile phase. During this injection step, the flow (A1 and B1) was as follows: 0.5 min, 0% B1, flow rate 2.0 mL/min; 1.0 min, 0% B1, flow rate 0.2 mL/min; 5 min, 100% B1, flow rate 0.2 mL/min; 14 min, 100% B1, flow rate 2.0 mL/min. At 14 min, after a new switch to initial valve position, the initial conditions were achieved at 14.2 min. The chromatographic separation was performed using an ACQUITY HSS C18 column (150 x 2 mm, 1.8 µm, Waters) in an oven at a temperature of 50 °C, and mobile phases including ammonium formate buffer 5mM, pH 3 (A2) and acetonitrile in 0.1 v/v % formic acid (B2); flow rate of 0.4 mL/min was used. Initial concentration of mobile phase B2 (3 %) held until 0.5 min, increased to 30 % at 4.2 min, then to 50 % at 9 min, then to 100 % at 9.5 min, and finally held until 14 min. Mass spectrometry data were acquired using a XEVO G2-XS QTOF (Waters, Manchester, UK) instrument controlled with MassLynx 4.1 software. Mass spectrometric conditions were as follows: positive electrospray ionization interface (ESI+), ion spray voltage of 20 V, nitrogen as desolvation gas and argon as collision gas, source temperature at 140 °C and desolvation temperature at 500 °C with a desolvation gas (nitrogen) flow rate of 900 L/h. Conditions for the time of flight mass spectrometer scan mode were as follows: scan range 100-1000 m/z at 6 eV (low energy) and 50-1000 m/z with a collision energy ramp from 10-40 eV (high energy). Calibration was performed using the concentration range of 25 to 3,000 µg/L.

The validation procedure of this assay complied with both the French Analytical Toxicology Society (SFTA) and international recommendations for the validation of new analytical methods and acceptance criteria for the validation of new analytical methods used in single case studies of uncommon analytes [62,63], including linearity, limit of detection (LOD),

lower limit of quantification (LLOQ), accuracy, precision and matrix effects. Calibration curves, estimated using 1/x weighted linear regression, were considered acceptable if the coefficient of determination (r^2) was at least 0.99. The LOD was defined as the lowest concentration with a signal-to-noise ratio of at least 3. The LLOQ was the lowest concentration with an intra-assay precision CV% and a relative bias lower than 25%.

U-47700 metabolite investigations

Metabolites of U-47700 were *in vitro* investigated by analyzing HLM incubates by liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry detection (LC-HRMS) and then, retrospectively, identified in blood and urine samples [51,52,64-67].

HLM incubates

Once thawed, HLMs (2 mg protein/mL for a final volume of 100 µL) were pre-activated by alamethicin (at 0.1 mmo/L) on ice in an intermediate volume of 50 µL in 0.1 M Tris-HCl-$MgCl_2$ (10 mM $MgCl_2$ and 100 mM Tris-HCl solution) at pH 7.4. This mixture was added to a 50 µL-dried residue of two different concentrations (100 µM or 500 µM) of U-47700 methanolic solution. These concentrations were chosen according to previously reported concentrations used in similar metabolism studies of other NSOs [51,52,68-70]. Fifty µL of a cofactor mixture (5 mM UDPGA, 1.3 mM NADPH, 3.3 mM G6P and 0.5 U/mL G6PD) in 0.1 M Tris-HCl was then added. The enzymatic reaction was performed at 37 °C for 60 min and stopped by the addition of 100 µL of methanol. Samples were frozen at -20°C until analysis.

Metabolite identification

HLM incubate samples were analysed using the LC-HRMS method described above. Data process was performed using ChromaLynx, TargetLynx, MassFragment and MetaboLynx associated softwares (Waters, Manchester, UK). A software algorithm (MetaboLynx™) was used in order to *in silico* predict U-47700 biotransformations. Briefly, taking into account available data on the metabolism of related substances, sets of theoretically possible biotransformations of U-47700 were created based on the structure of the drug (including possible hydroxylation, *N*-dealkylation and glucuronidation transformations). The automated metabolite profiling process was completed through the use of the fragmentation interpretation software tool MassFragmentTM 4.1 (Waters), to enable software driven assignment of metabolite structures from fragmentation patterns. The LC-HRMS acquired data of HLM incubates are subsequently cross-checked to *in silico* predicted

biotransformations: criteria used for identification of the targeted compounds included 3 mDA as exact mass error of the precursor ion, as well as product ions, and +/- 0.25 min as tolerance in retention time for the precursor ion.

Results and Discussion

Identification of U-47700 powder

LC-HRMS and NMR spectroscopy were applied for identification and characterization of the unknown powder sample collected from the SINTES scheme. U-47700 was detected (Figure 3). No significant organic impurity was detected in the powder using LC-HRMS or NMR. In addition, using the ERETIC method, NMR analysis revealed a U-47700 content of 84 % in the powder (the remaining 16 % consist putatively in inorganic compounds).

Results of Toxicological investigations in post-mortem biological samples

The positive results of the toxicological investigations are summarized in Table 1. Detected drugs (acetaminophen, oxazepam, dextromethorphan and paroxetine) are consistent with prescribed medications and observed blood concentrations are under (acetaminophen, oxazepam), in (dextromethorphan) and slightly over (paroxetine) the therapeutic ranges. Alpha-PHP (alpha-pyrrolidinohexanophenone) is a chemical derivative of cathinone, a stimulating alkaloid of the plant khat (*Catha edulis*) in which the amino group has been substituted by a pyrrolidine rest instead. Alpha-PHP is a synthetic stimulant drug developed in the 1960s [71] closely related to alpha-PVP, another α-pyrrolidinophenone, as it differs only for the length of carbon side chain. Since 2014, alpha-PHP can be found in online-sold NPS products [72], has been identified in seized materials or/and intoxication cases [73-78.] and its metabolism was recently studied and elucidated [79,80]. The observed alpha-PHP blood concentration (42 µg/L) is lower than rare previously reported data in non-fatal intoxication case: 175 µg/L (a man displaying hallucinations and delusion) [78] and 230 µg/L (a man displaying hallucinations and agitation) [81]. There is no other reported data of alpha-PHP blood concentration in literature, in particular in *post-mortem* blood. It is of note that differences in the alkyl chain length from the α-carbon in α-pyrolidinophenone derivatives affect pharmacological actions, such as the potency of catecholamine transporter blockade: as

Thèse - Université de Lille

a consequence, it is hard to drawn in order to formulate meaningful comparisons between alpha-PHP blood concentrations and those of alpha-PVP that can be found in literature [82].

Blood and urinary U-47700 concentrations were determined using LC-HRMS. The limit of detection (LOD) and the lower limit of quantification (LLOQ) in whole blood were estimated at 5 µg/L and 25 µg/L, respectively. Linear regression with 1/x weighting showed the standard curves (n=6) to be linear from 25 to 3,000 µg/L, with r > 0.999. Interday CV and bias (n=6) were less than 20 % in blood. The U-47700 *post-mortem* peripheral blood concentration (3,040 µg/L) appears to be higher than those usually observed in similar reports of fatalities involving U-47700 [36,39]: e.g. mean and median blood concentrations for U-47700 were 253 µg/L (±150) and 247 µg/L, respectively (range 17 to 490 µg/L) in a 16 fatalities [17]; in blood of a 30-year old man found dead in his home, the U-47700 concentration was 13.8 µg/L (fentanyl combined intoxication) [43]; U-47700 peripheral blood concentration was quantitated at 190 µg/L on a fatality involving U-47700 with other drugs, and tissue distribution data are provided (340 µg/L in central blood; tissue distribution ranging from 170 µg/L in vitreous to 1.7 mg/kg in liver tissue) [34]; in a case involving the death of a 27-year-old male, U-47700 was subsequently at a concentration of 1,460 µg/L in *postmortem* femoral blood [42]. As a consequence, this high blood concentration is coherent with the hypothesis of a massive U-47700 overdose (injection, insufflation?) with subsequently respiratory depression leading to the decease of the young man.

U-47700 metabolites characterization

Using a software algorithm (MetaboLynx™), eleven potential U-47700 metabolites were *in silico* predicted. *In vitro* experiments using HLMs LC-HRMS analysis were performed in order to investigate the potential CYP- and UGT-dependent metabolites of U-47700. Regarding the two tested concentrations of U-47700, a satisfactory metabolite production (highest chromatogram peak area related to metabolite) was observed after incubation of U-47700 for 1 hours at 500 µM with HLMs (Table 2). Three U-47700 metabolites were *in vitro* produced: *N*-Desmethyl-U-47700 (M01), *N,N*-Didesmethyl-U-47700 (M02), and *N*-Desmethyl-hydroxyl-U-47700 (M03). Two *N,N*-Didesmethyl-hydroxyl-U-47700 (M04-A and M04-B) were not observed in HLMs incubates, but were detected in urine sample of the reported case (Table 2). Six other U-47700 have been previously *in silico* predicted: hydroxyl-U47700 (theoretical m/z $[M+H]^+$ 345.1137), U-47700 glucuronide (theoretical m/z

$[M+H]^+$ 508.1743), *N*-Desmethyl-U-47700 glucuronide (theoretical m/z $[M+H]^+$ 494.1587), *N,N*-Didesmethyl-U-47700 glucuronide (theoretical m/z $[M+H]^+$ 481.1508), *N*-Desmethyl-dihydroxyl-U-47700 (theoretical m/z $[M+H]^+$ 347.0923) and *N,N*-Didesmethyl-dihydroxyl-U-47700 (theoretical m/z $[M+H]^+$ 333.0767). These 6 *in silico* predicted metabolites were not detected in HLMs incubates, nor in *post-mortem* blood and urine samples of the reported case, and have never been *in vitro* or *in vivo* observed by other authors [33,42,54-56].

Mainly derived from reported cases, data about U-47700 metabolism still rare (Table 3). Nevertheless, our HLMs experiments confirm that the phase I metabolic steps mainly consist in *N*-demethylation of the tertiary amine group followed by hydroxylation of the cyclohexane ring as suggested by Jones et al. [33]. A previously reported by Krotulskiet al., *N*-Desmethyl-U-47700 (M01) is the primary metabolite. It was systematically detected in blood or in urine in case of U-47700 intake. Moreover, relied on *in vitro* or *in vivo* observed normalized chromatographic peak area ratio to U-47700, M01 produced the majority observed chromatographic signal (i) systematically *in vitro* (n=2; 1.73 and 19.8), and (ii) commonly *in vivo*, especially in urine (n= 7; 0.8, 1.4, 1.9, 3.6, 4.9, 6.6 and 14.2). As a consequence, M01 is a metabolite of importance in order to U-47700 intake detection as its chromatographic signal is regularly higher than the U-47700's one. *N,N*-Didesmethyl-U-47700 (M02), or *N,N*-bisdesmethyl-U-47700, has been also reported in previous studies: its chromatographic signal is some times higher than the U-47700 one. M01 and M02 were each found to undergo hydroxylation to form *N*-Desmethyl-hydroxyl-U-47700 (M03) and *N,N*-Didesmethyl-hydroxyl-U-47700 (M04). This last gives rise to multiple chromatographic peaks (two in urine of the reported case), which was expected due to multiple sites for hydroxylation to occur. According to HLMs experiments results (very small amounts detected by Krotuslki and al. and not detected in our experiments) as well as *in vivo* detection (chromatographic peak area ratio to U-47700 over 1 were observed in only in 3 out of the 7 urinary samples), these 2 hydroxylated U-47700 metabolites appear of minor importance. If these metabolites of U-47700 were already observed in drug users' biological samples, it is of note that phase II glucuronide metabolites have never been *in vivo* (including in urine samples) observed. [26].

Conclusion

In the challenge of NPS analytical detection, the detection of NSOs presents additional difficulties for clinical toxicologists and forensic scientists: an increasing targeting by

producers and subsequently high frequency of new products, very potent substances and subsequently low dosage and low concentrations in biological samples (blood and urine), and an extensive metabolism [83]. Owing these two last pitfalls, trying to detect only the parent NSO could lead to false-negative results when detection performance of the analytical device for toxicological screening is insufficient (limit of detection not enough low) and/or when the delay between consumption and sampling (or death) has been too long. In this context, metabolism studies play an important role in clinical and forensic toxicology as identification of metabolites can lead to reducing false-negative results in NSOs positive cases [84]. This fact is illustrated here by *N*-desmethyl-U-47700 (and *N,N*-didesmethyl-U-47700) in case of U-47700 intake.

Indeed, in France as well as in other countries, U-47700 is emerging and implicated in forensic situations. Using NMR, LC-MS/MS, and LC-HRMS, U-47700 was identified in a powder collected from SINTES, a scheme intending to document the toxicological composition of illegal substances in circulation in France, and identified at 3 µg/L in peripheral blood in a fatality case linked to U-47700 use. In this particular forensic case, detection of U-47700 intake was not challenging owing to the observed relative high blood concentration. Nevertheless, high amounts of several U-47700 metabolites, especially *N*-desmethyl-U-47700, were observed in urine. Confrontation of these results to data found in the literature strongly suggests that this metabolite is regularly a better blood and (mainly) urine biomarker of U-47700 intake than U-47700 itself. Indeed, in this fatality and in other previous reports, N-desmethyl-U-47700 produced the main observed chromatographic signal (i) systematically *in vitro* and (ii) commonly in vivo, especially in urine. *N,N*-didesmethyl-U-47700 is also sometimes a better biomarker of U-47700 intake than U-47700 itself. Accordingly, we recommend adding *N*-desmethyl-U-47700 (and *N,N*-didesmethyl-U-47700) in mass spectrum databases used for toxicological screening in order to reduce the risk of false-negative results in intoxication cases involving U-47700.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

References

1 - Madras BK (2016) The Growing Problem of New Psychoactive Substances (NPS). Curr Top Behav Neurosci 32:1-18. https://doi.org/10.1007/7854_2016_34

2 - Soussan C, Andersson M, Kjellgren A (2018) The diverse reasons for using Novel Psychoactive Substances - A qualitative study of the users' own perspectives. Int J Drug Policy 52:71-78. doi: 10.1016/j.drugpo.2017.11.003.

3 - Logan BK, Mohr ALA, Friscia M, Krotulski AJ, Papsun DM, Kacinko SL, Ropero-Miller JD, Huestis MA (2017) Reports of Adverse Events Associated with Use of Novel Psychoactive Substances, 2013-2016: A Review. J Anal Toxicol 28:1-38. https://doi.org/10.1093/jat/bkx031

4 - Huestis MA, Brandt SD, Rana S, Auwärter V, Baumann MH (2017) Impact of Novel Psychoactive Substances on Clinical and Forensic Toxicology and Global Public Health. Clin Chem https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.274662

5 - EMCDDA (2017) European Drug Report 2017: Trends and Developments. Luxembourg: Publications Office of the European Union

6 - UNODC (2017) World Drug Report 2017 (ISBN: 978-92-1-148291-1, eISBN: 978-92-1-060623-3, United Nations publication, Sales No. E.17.XI.6).

7 - Armenian P, Vo KT, Barr-Walker J, Lynch KL (2017) Fentanyl, fentanyl analogs and novel synthetic opioids: A comprehensive review. Neuropharmacology https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.10.016

8 - Prekupec MP, Mansky PA, Baumann MH (2017) Misuse of Novel Synthetic Opioids: A Deadly New Trend. J Addict Med https://doi.org/10.1097/ADM.0000000000000324

9 - Zawilska JB (2017) An Expanding World of Novel Psychoactive Substances: Opioids. Front Psychiatry 8:110-123. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2017.00110

10 - Pichini S, Pacifici R, Marinelli E, Busardò FP (2017) European Drug Users at Risk from Illicit Fentanyls Mix. Front Pharmacol https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00785

11 - Misailidi N, Papoutsis I, Nikolaou P, Dona A, Spiliopoulou C, Sotiris Athanaselis S (2017) Fentanyls continue to replace heroin in the drug arena: the cases of ocfentanil and carfentanil Forensic Toxicol https://doi.org/10.1007/s11419-017-0379-4

12 - Loew G, Lawson J, Toll L, Frenking G, Berzetei-Gurske IP, Polgar W (1988) Structure-activity studies of two classes of beta-amino-amides: the search for kappa-selective opioids. NIDA Res Monogr 90:144-151 PMID: 2855852

13 - Helander, A, Bäckberg M, Bec, O (2014) MT-45, a new psychoactive substance associated with hearing loss and unconsciousness. Clin Toxicol (Phila) 52:901–904 https://doi.org/10.3109/15563650.2014.943908

14 - Wohlfarth A, Scheidweiler KB, Pang S, Zhu M, Castaneto M, Kronstrand R, Huestis MA (2016) Metabolic characterization of AH-7921, a synthetic opioid designer drug: in vitro metabolic stability assessment and metabolite identification, evaluation of in silico prediction, and in vivo confirmation. Drug Test Anal 8(8):779-91. https://doi.org/10.1002/dta.1856

15 - Novel opioid U-51754 (2017) http://www.bluelight.org/vb/threads/793107-Novel-opioid-U-51754. Accessed 18 November 2017

16 - Fabregat-Safont D, Carbón X, Ventura M, Fornís I, Guillamón E, Sancho JV, Hernández F, Ibáñez M (2017) Updating the list of known opioids through identification and characterization of the new opioid derivative 3,4-dichloro-N-(2-(diethylamino)cyclohexyl)-N-methylbenzamide (U-49900). Sci Rep 7(1):6338. https://doi.org/10.1038/s41598-017-06778-9

17 - Mohr AL, Friscia M, Papsun D, Kacinko SL, Buzby D, Logan BK (2016) Analysis of novel synthetic opioids U-47700, U-50488 and furanyl fentanyl by LC-MS/MS in postmortem casework. J Anal Toxicol. 40(9):709-717. https://doi.org/10.1093/jat/bkw086

18 - Rambaran KA, Fleming SW, An J, Burkhart S, Furmaga J, Kleinschmidt KC, Spiekerman AM, Alzghari SK (2017) U-47700: A Clinical Review of the Literature. J Emerg Med 53(4):509-519. https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2017.05.034

19 - Rohrig TP, Miller SA, Baird T (2017) U-47700: A Not So New Opioid. J Anal Toxicol. 11:1-3. https://doi.org/10.1093/jat/bkx081.]

20 - Szmuszkovicz, J (1978) Analgesic N-(2-aminocycloaliphatic)benzamides. Patent No. US4098904A, The Upjohn Company, Michigan USA

21 - Szmuszkovicz, J, VonVolgtlander PF (1982) Benzeneacetamide amines: structurally novel non-m mu opioids. Journal of Medicinal Chemistry 25:1125–1126.

22 - Cheney BV, Szmuszkovicz J, Lahti RA, Zichi DA (1985) Factors affecting binding of trans-N-[2-(methylamino)cyclohexyl]benzamides at the primary morphine receptor. Journal of Medicinal Chemistry 28:1853–1864.

23 - Loew G, Lawson J, Toll L, Frenking G, Berzetei-Gurske I, Polgar W (1988) Structure activity studies of two classes of beta-amino-amides: the search for kappa-selective opioids. NIDA Res Monogr 90:144–151.

24 - Narita M, Imai S, Itou Y, Yajima Y, Suzuki T (2002) Possible involvement of mu1-opioid receptors in the fentanyl- or morphine-induced antinociception at supraspinal and spinal sites. Life Sci 70:2341–2354.

25 - Baumann MH, Majumdar S, Le Rouzic V, Hunkele A, Uprety R, Huang XP, Xu J, Roth BL, Pan YX, Pasternak GW (2017) Pharmacological characterization of novel synthetic opioids (NSO) found in the recreational drug marketplace. Neuropharmacology. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.08.016.

26 - Nikolaou P, Katselou M, Papoutsis I, Spiliopoulou C, Athanaselis S (2017) U-47700. An old opioid becomes a recent danger. Forensic Toxicol 35(1):11–9. https://doi.org/10.1007/s11419-016-0347-4.

27 - Coopman V, Cordonnier J (2017) 'Spice-like' herbal incense laced with the synthetic opioid U-47700. Toxicol Anal Clin. https://doi.org/10.1016/j.toxac.2017.07.004

28 - U-47700 Critical Review Report Agenda Item 4.1 Expert Committee on Drug Dependence Thirty-eighth Meeting Geneva, 14-18 November 2016 Available from http://www.who.int/medicines/access/controlled-substances/4.1_U-47700_CritReview.pdf.

29 - Schneir A, Metushi IG, Sloane C, Benaron DJ, Fitzgerald RL (2017) Near death from a novel synthetic opioid labeled U-47700: emergence of a new opioid class. Clin Toxicol (Phila) 55(1):51-54. https://doi.org/10.1080/15563650.2016.1209764

30 - DEA Headquarters News. (2016) DEA Schedules Deadly Synthetic Drug U-47700. Drug Enforcement Administration. Washington D.C. https://www.dea.gov/divisions/hq/2016/hq111016.shtml (accessed November 17, 2017)

31 - O'Donnell JK, Halpin J, Mattson CL, Goldberger BA, Gladden RM (2017) Deaths Involving Fentanyl, Fentanyl Analogs, and U-47700 - 10 States, July-December 2016. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 66(43):1197-1202. https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6643e1

32 - Domanski K, Kleinschmidt KC, Schulte JM, Fleming S, Frazee C, Menendez A, Tavakoli K (2017) Two cases of intoxication with new synthetic opioid, U-47700. Clin Toxicol (Phila) 55(1):46-50. https://doi.org/10.1080/15563650.2016.1209763

33 - Jones MJ, Hernandez BS, Janis GC, Stellpflug SJ (2017) A case of U-47700 overdose with laboratory confirmation and metabolite identification. Clin Toxico 55(1):55-59. https://doi.org/10.1080/15563650.2016.1209767

34 - McIntyre IM, Gary RD, Joseph S, Stabbley R (2017) A fatality related to the synthetic opioid U-47700: Postmortem concentration distribution. J Anal Toxicol 41(2):158-160. https://doi.org/1093/jat/bkw124

35 - Spargo EA (2016) Two fatalities involving the use of the synthetic opioid U-47700. Toxtalk 40(1):9–13

36 - Short SA, Schultz J, Lawler E, Wells K (2016) Postmortem Cases Involving Fentanyl Derivatives and U-47700. Toxtalk 40(4):11-13

37 - Marinetti L (2016) Drugs in the news - DEA Schedule 'Pink' (U-47700). Toxtalk 40(4): 18. ; Schneir A, Metushi IG, Sloane C, Benaron DJ, Fitzgerald RL (2017) Near death from a novel synthetic opioid labeled U-47700: emergence of a new opioid class. Clin Toxicol (Phila). 55(1):51-54. https://doi.org/10.1080/15563650.2016.1209764.

38 - Shoff EN, Zaney ME, Kahl JH, Hime GW, Boland DM (2017) Qualitative Identification of Fentanyl Analogs and Other Opioids in Postmortem Cases by UHPLC-Ion Trap-MSn. J Anal Toxicol 41(6):484-492. https://doi.org/.1093/jat/bkx041.

39 - Ruan X, Chiravuri S, Kaye AD (2016) Comparing fatal cases involving U-47700. Forensic Sci Med Pathol 12(3):369-371. https://doi.org/10.1007/s12024-016-9795-8.

40 - Ellefsen KN, Taylor EA, Simmons P, Willoughby V, Hall BJ (2017) Multiple Drug-Toxicity Involving Novel Psychoactive Substances, 3-Fluorophenmetrazine and U-47700. J Anal Toxicol 20:1-6. https://doi.org/10.1093/jat/bkx060.

41 - Drug Enforcement Administration, Department of Justice (2016) Schedules of Controlled Substances: Temporary Placement of U-47700 Into Schedule I. Final order. Fed Regist 81(219):79389-79393. PMID: 27905978.

42 - Elliott SP, Brandt SD, Smith C (2016) The first reported fatality associated with the synthetic opioid 3,4-dichloro-N-[2-(dimethylamino) cyclohexyl]-N-methylbenzamide (U47700) and implications for forensic analysis. Drug Test Anal. 8(8):875–879. https://doi.org/10.1002/dta.1984.

43 - Coopman V, Blanckaert P, Van Parys G, Van Calenbergh S, Cordonnier J (2016) A case of acute intoxication due to combined use of fentanyl and 3,4-dichloro-N-[2 (dimethylamino)cyclohexyl]-N-methylbenzamide (U-47700). Forensic Sci Int 266:68-72. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.05.001

44 - Dziadosz M, Klintschar M, Teske J (2017) Postmortem concentration distribution in fatal cases involving the synthetic opioid U-47700. Int J Legal Med 131(6):1555-1556. https://doi.org/10.1007/s00414-017-1593-7

45 - Kriikku P. Novel psychoactive substances in postmortem toxicology, http://emcdda.europa.eu/system/files/attachments/3233/Kriikku_NPS%20in%20postmortem%20investigations.pdf_en (accessed december 6 2017)

46 - Bui TV, Batisse A, Marillier M, Bourgogne E, Djezzar S, Megarbane B (2017) L'arrivée des opioïdes de synthèse en France, un signal d'addictovigilance à surveiller : illustration par un cas clinique. Toxicol Anal Clin https://doi.org/10.1016/j.toxac.2017.03.087

47 - SFTA guidelines for the achievement of toxicological analyzes for deaths involving NPS. Toxicol Anal Clin (2018) 30:1-4 https://doi.org/10.1016/j.toxac.2017.07.002

48 - Marquet P (2012) LC-MS vs. GC-MS, online extraction systems, advantages of technology for drug screening assays. Methods Mol. Biol 902:15-27. https:/doi.org/10.1007/978-1-61779-934-1_2

49 - Kronstrand R, Brinkhagen L, Birath-Karlsson C, Roman M, Josefsson M (2014) LC-QTOF-MS as a superior strategy to immunoassay for the comprehensive analysis of synthetic cannabinoids in urine. Anal Bioanal Chem 406;3599-3609. https:/doi.org/0.1007/s00216-013-7574-x

50 - Watanabe S, Vikingsson S, Roman M, Green H, Kronstrand R, Wohlfarth A (2107) In vitro and in vivo metabolite identification studies for the new synthetic opioids acetylfentanyl, acrylfentanyl, furanylfentanyl, and 4-fluoro-isobutyrylfentanyl. AAPS J 19(4):1102-1122. https://doi.org/10.1208/s12248-017-0070-z

51 - Allibe N, Richeval C, Phanithavong M, Faure A, Allorge D, Paysant F, Stanke-Labesque F, Eysseric-Guerin H, Gaulier JM (2017) Fatality involving ocfentanil documented by identification of metabolites. Drug Test Anal https://doi.org/10.1002/dta.2326

52 - Richeval C, Gicquel T, Hugbart C, Le Dare B, Allorge D, Morel I, Gaulier JM (2017) In vitro characterization of NPS metabolites produced by human liver microsomes and the HepaRG cell line using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) analysis: application to furanyl fentanyl. Curr Pharm Biotechnol https://doi.org/10.2174/1389201018666171122124401

53 - Strayer KE, Antonides HM, Juhascik MP, Daniulaityte R, Sizemore I (2018) LC-MS/MS-Based Method for the Multiplex Detection of 24 Fentanyl Analogues and Metabolites in Whole Blood at Sub ng mL-1 Concentrations. ACS Omega 3(1):514-523. doi: 10.1021/acsomega.7b01536

54 - Fleming SW, Cooley JC, Johnson L, Frazee CC, Domanski K, Kleinschmidt K, Garg U (2017) ; Analysis of U-47700, a Novel Synthetic Opioid, in Human Urine by LC-MS-MS and LC-QToF. J Anal Toxicol. 41(3):173-180. https://doi.org/10.1093/jat/bkw131

55 - Seither J, Reidy L (2017) Confirmation of Carfentanil, U-47700 and Other Synthetic Opioids in a Human Performance Case by LC-MS-MS. J Anal Toxicol 41(6):493-497. https://doi.org/.10.1093/jat/bkx049

56 - Krotulski AJ, Mohr ALA, Papsun DM, Logan BK (2017) Metabolism of novel opioid agonists U-47700 and U-49900 using human liver microsomes with confirmation in authentic urine specimens from drug users. Drug Test Anal https://doi.org/.1002/dta.2228

57 - Akoka S, Barantin L, Trierweiler M (199) Concentration Measurement by Proton NMR Using the ERETIC Method. Anal Chem 71:2554-2557. https://doi.org/ 10.1021/ac981422i

58 - Gaillard YP, Cuquel AC, Boucher A, Romeuf L, Bevalot F, Prevosto JM, Menard JM (2013) A fatality following ingestion of the designer drug meta-chlorophenylpiperazine (mCPP) in an asthmatic–HPLC-MS/MS detection in biofluids and hair. J Forensic Sci 58(1):263-269. https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2012.02254.x

59 - Mazoyer C, Carlier J, Boucher A, Péoc'h M, Lemeur C, Gaillard Y (2013) Fatal case of a 27-year-old male after taking iboga in withdrawal treatment: GC-MS/MS determination of ibogaine and ibogamine in iboga roots and postmortem biological material. J Forensic Sci 58(6):1666-1672. https://doi.org/10.1111/1556-4029.12250

60 - Carlier J, Guitton J, Moreau C, Boyer B, Bévalot F, Fanton L, Habyarimana J, Gault G, Gaillard Y (2015) A validated method for quantifying hypoglycin A in whole blood by UHPLC-HRMS/MS. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 978-979:70-77. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.11.029

61 - Carlier J, Guitton J, Romeuf L, Bévalot F, Boyer B, Fanton L, Gaillard Y (2015) Screening approach by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the blood quantification of thirty-four toxic principles of plant origin.

Application to forensic toxicology. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 975:65-76. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.10.028

62 - Peters FT, Drummer OH, Musshoff F (2007) Validation of new methods. Forensic Sci Int 165(2-3):216-224. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.021

63 - Wille SMR, Peters FT, Di Fazio V, Samyn N (2011) Practical aspects concerning validation and quality control for forensic and clinical bioanalytical quantitative methods. Accred Qual Assur 16:279–292. https://doi.org/ 10.1007/s00769-011-0775-0

64 - Boumrah Y, Humbert L, Phanithavong M, Khimeche K, Dahmania A, Allorge D (2016) In vitro characterization of potential CYP- and UGT-derived metabolites of the psychoactive drug 25B-NBOMe using LC-high resolution MS. Drug Test Anal 8:248-526. https://doi.org/ 10.1002/dta.1865

65 - Kintz P, Richeval C, Jamey C, Ameline A, Allorge D, Gaulier JM, Raul JS (2016) Detection of the designer benzodiazepine metizolam, in urine and preliminary data on its metabolism. Drug Test Anal 9:1026-1033. https://doi.org/10.1002/dta.2099

66 - Richeval C, Boucher A, Humbert L, Phanithavong M, Wiart JF, Moulsma M, Citterio-Quentin A, Coulon T, Hernu R, Vial T, Allorge D, Gaulier JM (2017) Retrospective identification of 25I-NBOMe metabolites in an intoxication case. Toxicologie Analytique & Clinique 29:71-81. https://doi.org/10.1016/j.toxac.2017.01.001

67 - Allibe N, Richeval C, Willeman T, Humbert L, Allorge D, Maignan M, Eysseric-Guerin H, Stanke-Labesque F, Gaulier JM (2017) Case reports: four concomitant non-fatal intoxications with AB-FUBINACA and MDMA. Toxicologie Analytique & Clinique 29:101-110. https://doi.org/10.1016/j.toxac.2016.12.006

68 - Feasel MG, Wohlfarth A, Nilles JM, Pang S, Kristovich RL, Huestis MA (2016) Metabolism of Carfentanil, an Ultra-Potent Opioid, in Human Liver Microsomes and Human Hepatocytes by High-Resolution Mass Spectrometry. AAPS J. 18:1489-1499. https://doi.org/10.1208/s12248-016-9963-5

69 - Meyer MR, Dinger J, Schwaninger AE, Wissenbach DK, Zapp J, Fritschi G, Maurer HH (2012) Qualitative studies on the metabolism and the toxicological detection of the fentanyl-derived designer drugs 3-methylfentanyl and isofentanyl in rats using liquid chromatography-linear ion trap-mass spectrometry (LC-MS(n)). Anal Bioanal Chem 402:1249-1255. https://doi.org/10.1007/s00216-011-5528-8

70 - Steuer AE, Williner E, Staeheli SN, Kraemer T (2017) Studies on the metabolism of the fentanyl-derived designer drug butyrfentanyl in human in vitro liver preparations

and authentic human samples using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). Drug Test Anal. 9(7):1085-1092. https://doi.org/0.1002/dta.2111

71 - Seeger E. Pykrolidino ketones. Patent US; 1967/3314970 A.

72 - Uchiyama N, Shimokawa Y, Kawamura M, Kikura-Hanajiri R, Hakamatsuka T (2014) Chemical analysis of a benzofuran derivative, 2-(2-ethylaminopropyl)benzofuran (2-EAPB), eight synthetic cannabinoids, five cathinone derivatives, and five other designer drugs newly detected in illegal products. Forensic Toxicol 32(2):266-281. https://doi.org/10.1007/s11419-014-0238-5

73 - Majchrzak M, Rojkiewicz M, Celiński R, Kuś P, Sajewicz M (2016) Identification and characterization of new designer drug 4-fluoro-PV9 and α-PHP in the seized materials. Forensic Toxicol 34:115-124. https://doi.org/10.1007/s11419-015-0295-4

74 - Odoardi S, Romolo FS, Strano-Rossi S (2016) A snapshot on NPS in Italy: Distribution of drugs in seized materials analysed in an Italian forensic laboratory in the period 2013-2015. Forensic Sci Int 265:116-20. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.01.037

75 - Péterfi A, Csorba J, Figeczki T, Kiss J, Medgyesi-Frank K, Posta J, Gyarmathy VA (2017) Drug residues in syringes and other injecting paraphernalia in Hungary. Drug Test Anal https://doi.org/10.1002/dta.2217

76 - Beck O, Bäckberg M, Signell P, Helander A (2017) Intoxications in the STRIDA project involving a panorama of psychostimulant pyrovalerone derivatives, MDPV copycats. Clin Toxicol (Phila) 12:1-8. https://doi.org/10.1080/15563650.2017.1370097

77 - Klavž J, Gorenjak M, Marinšek M (2016) Suicide attempt with a mix of synthetic cannabinoids and synthetic cathinones: Case report of non-fatal intoxication with AB-CHMINACA, AB-FUBINACA, alpha-PHP, alpha-PVP and 4-CMC. Forensic Sci Int 265:121-4. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.01.018

78 - Fujita Y, Mita T, Usui K, Kamijo Y, Kikuchi S, Onodera M, Fujino Y, Inoue Y (2017) Toxicokinetics of the Synthetic Cathinone α-Pyrrolidinohexanophenone J Anal Toxicol. 28:1-5. https://doi.org/10.1093/jat/bkx080

79 - Paul M, Bleicher S, Guber S, Ippisch J, Polettini A, Schultis W (2015) Identification of phase I and II metabolites of the new designer drug α-pyrrolidinohexiophenone (α-PHP) in human urine by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS). J Mass Spectrom 50(11):1305-17. https://doi.org/10.1002/jms.3642. Erratum in: J Mass Spectrom. 2016 51(4):322

80 - Manier SK, Richter LHJ, Schäper J, Maurer HH, Meyer MR (2018) Different in vitro and in vivo tools for elucidating the human metabolism of alpha-cathinone-derived drugs of abuse. Drug Test Anal https://doi.org/10.1002/dta.2355

81 - Nachon-Phanithavong M, Richeval C, Gaulier JM, Humbert L, Tournebize J, Kieffer P, Allorge D (2017) Intoxication aiguë et consommation chronique de cathinones chez un polyconsommateur. Toxicologie Analytique & Clinique 29(2s):22. https://doi.org/10.1016/j.toxac.2017.03.019

82 - Marusich JA, Antonazzo KR, Wiley JL, Blough BE, Partilla JS, Baumann MH (2014) Pharmacology of novel synthetic stimulants structurally related to the "bath salts" constituent 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV). Neuropharmacology 87:206-13. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.02.016

83 - Gerace E, Salomone A, Vincenti M (2018) Analytical approaches in fatal intoxication cases involving new synthetic opioids. Curr Pharm Biotechnol. https://doi.org /10.2174/1389201019666180405162734.

84 - Noble C, Weihe Dalsgaard P, Stybe Johansen S, Linnet K (2018) Application of a screening method for fentanyl and its analogues using UHPLC-QTOF-MS with data-independent acquisition (DIA) in MSE mode and retrospective analysis of authentic forensic blood samples. Drug Test Anal. 10(4):651-662. https://doi.org /10.1002/dta.2263

Table and figures legends

Figure 1: New synthetic opioids: benzoamide compounds.

Figure 2: U-47700 [3,4-dichloro-N-[2-(dimethylamino)cyclohexyl]-N-methylbenzamide] and postulated fragmentation pattern: a, loos of dimethylamine; a', loos of dimethylamine and loss of 3,4-dichlorobenzylaldehyde; b, 3,4-dichloro-N-methylbenzamide; b', loos of 3,4-dichloro-N-methylbenzamide; c, 3,4-dichlorobenzylaldehyde; d, cyclohexyl; e, 3,4-dichlorobenzyl; f, loos of dimethylamine together with methyl group of the methylbenzamide; g, 3,4-dichloro-N-benzamide.

Figure 3: 1H-NMR (MeOD) analysis of the U-47700 powder including signals related to U-47700 [1H-NMR (MeOD) : 7.84 (1H, d, J 1.45Hz), 7.67 (1H, d, J 8.3Hz), 7.55 (1H, dd, J 8.3, 1.45Hz), 4.77 (1H, m), 3.75 (1H, dd, J 11.6, 3.4Hz), 2.99 (3H, s), 2.96 (3H, s), 2.93 (3H, s), 2.26 (1H, m), 1.94 (4H, m), 1.70 (1H, m), 1.48 (2H, m)] together with other signals presumably related to powder excipients.

Figure 4: Metabolites of U-47700: proposed metabolic pathway (is in agreement with Jones's 2016 proposal).

Table 1: toxicological positive results in *post-mortem* biological samples (concentration units: µg/L).

Table 2: Metabolites of U-47700, the underlying biotransformation, formula, accurate mass of the precursor ions (M+H+) and observed MS/MS product ions. Fragments are given sorted by characteristic fragmentation patterns observed [a, loos of dimethylamine; a', loos of dimethylamine and loss of 3,4-dichlorobenzylaldehyde; b, 3,4-dichloro-N-methylbenzamide; b', loos of 3,4-dichloro-N-methylbenzamide; c, 3,4-dichlorobenzylaldehyde; d, cyclohexyl; e, 3,4-dichlorobenzyl; f, loos of dimethylamine together with methyl group of the methylbenzamide; g, 3,4-dichloro-N-benzamide], chromatographic peak area of molecular ion ([M+H]+) of substances of interest normalized to chromatographic peak area of U-47700 (nd: not detected).

Table 3: U-47700 metabolite reports (chromatographic peak area of molecular ion ([M+H]+) of substances of interest/peak area of molecular ion of U-47700 ratio, when available).

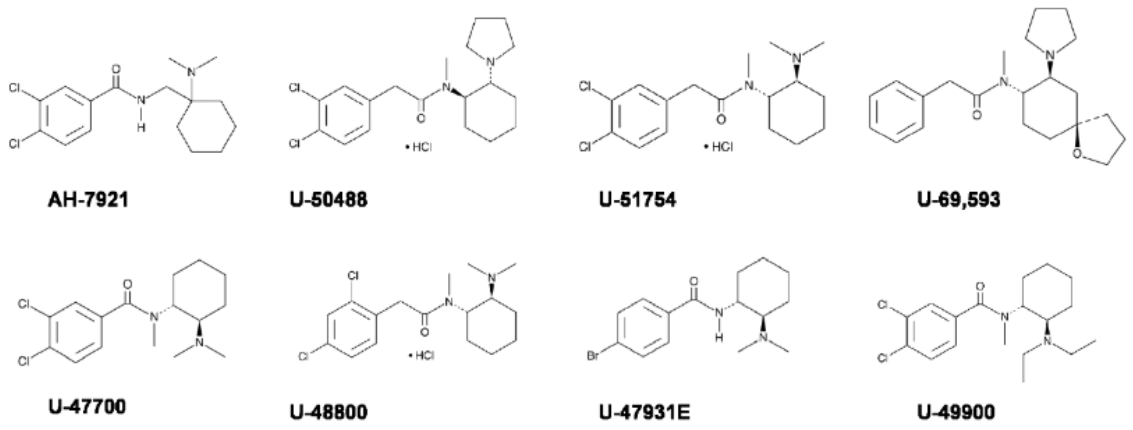


Figure 1: New synthetic opioids: benzoamide compounds.

24

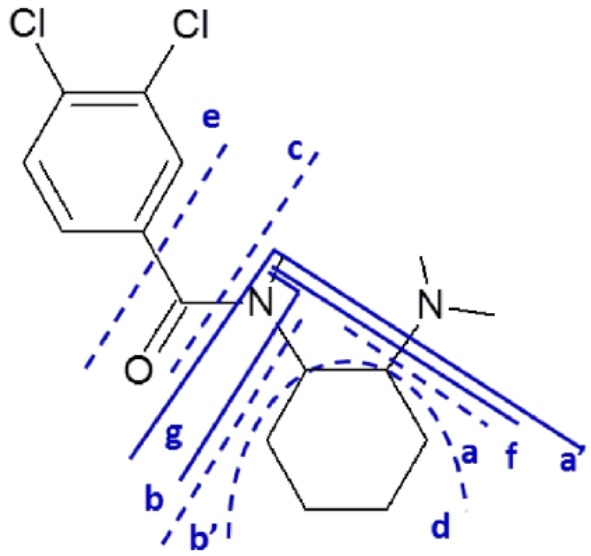


Figure 2: U-47700 [3,4-dichloro-N-[2-(dimethylamino)cyclohexyl]-N-methylbenzamide] and postulated fragmentation pattern: a, loos of dimethylamine; a', loos of dimethylamine and loss of 3,4-dichlorobenzylaldehyde; b, 3,4-dichloro-N-methylbenzamide; b', loos of 3,4-dichloro-N-methylbenzamide; c, 3,4-dichlorobenzylaldehyde; d, cyclohexyl; e, 3,4-dichlorobenzyl; f, loos of dimethylamine together with methyl group of the methylbenzamide; g, 3,4-dichloro-N-benzamide.

25

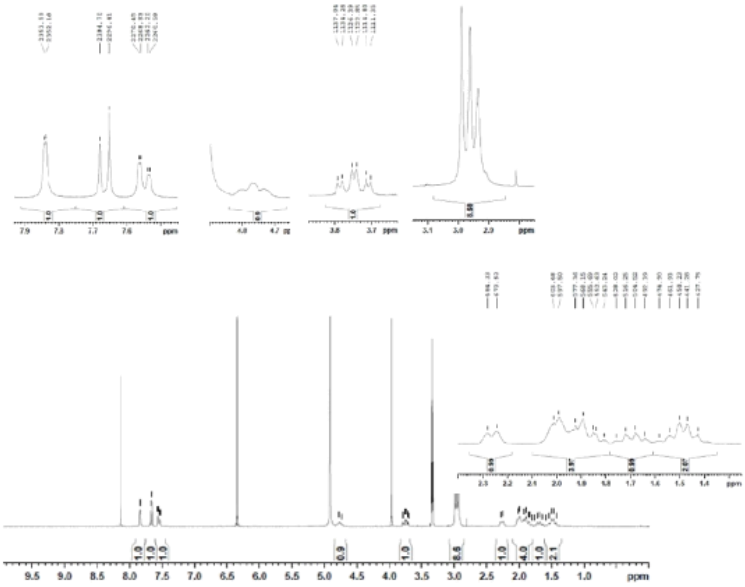


Figure 3: 1H-NMR (MeOD) analysis of the U-47700 powder including signals related to U-47700 [1H-NMR (MeOD) : 7.84 (1H, d, J 1.45Hz), 7.67 (1H, d, J 8.3Hz), 7.55 (1H, dd, J 8.3, 1.45Hz), 4.77 (1H, m), 3.75 (1H, dd, J 11.6, 3.4Hz), 2.99 (3H, s), 2.96 (3H, s), 2.93 (3H, s), 2.26 (1H, m), 1.94 (4H, m), 1.70 (1H, m), 1.48 (2H, m)] together with other signals presumably related to powder excipients.

26

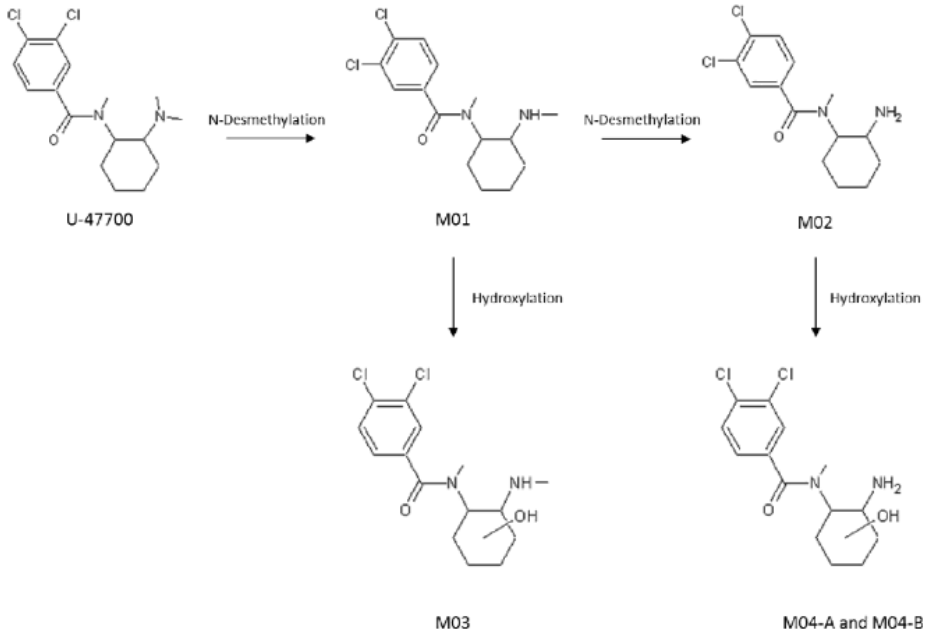


Figure 4: Metabolites of U-47700: proposed metabolic pathway (is in agreement with Jones's 2016 proposal).

27

Table 1: toxicological positive results in *post-mortem* biological samples (concentration units: µg/L).

Compound	Peripheral blood	Urine	Therapeutic range in blood
Acetaminophen	700	800	*2,500 – 25,000*
Oxazepam	30	40	*150 - 2,000*
Dextromethorphan	20	100	*10 - 40*
Paroxetine	170	730	*10 - 100*
Alpha-PHP	41.7	62.8	*not applicable*
U-47700	3,040	2,230	*not applicable*

Table 2: Metabolites of U-47700, the underlying biotransformation, formula, accurate mass of the precursor ions (M+H+) and observed MS/MS product ions. Fragments are given sorted by characteristic fragmentation patterns observed [a, loos of dimethylamine; a', loos of dimethylamine and loss of 3,4-dichlorobenzylaldehyde; b, 3,4-dichloro-N-methylbenzamide; b', loos of 3,4-dichloro-N-methylbenzamide; c, 3,4-dichlorobenzylaldehyde; d, cyclohexyl; e, 3,4-dichlorobenzyl; f, loos of dimethylamine together with methyl group of the methylbenzamide; g, 3,4-dichloro-N-benzamide], chromatographic peak area of molecular ion ([M+H]+) of substances of interest normalized to chromatographic peak area of U-47700 (nd: not detected).

	Name	Biotransformation	Formula	$[M+H]^+$	RT	a (a')	b (b')	c	d	e	f	g	HLMs	Blood	Urine
Parent	U-47700	none	$C_{16}H_{22}N_2OCl_2$	329.1182	6.29	284	204	173	81	145			100	100	100
M01	*N*-Desmethyl	Desmethylation	$C_{15}H_{20}N_2OCl_2$	315.1025	6.07	284	204	173	81	145			173	26	660
M02	*N,N*-Didesmethyl	Didesmethylation	$C_{14}H_{18}N_2OCl_2$	301.0869	5.95	284	204	173	81	145	270	189	6.6	24	530
M03	*N*-Desmethyl-hydroxyl	Desmethylation and hydroxylation	$C_{15}H_{20}N_2O_2Cl_2$	331.0975	5.64	300	204	173		145			0.7	3.7	220
M04-A	*N,N*-Didesmethyl-hydroxyl	Didesmethylation and hydroxylation	$C_{14}H_{18}N_2O_2Cl_2$	317.0818	5.09	300	204	173		145	286	189	nd	nd	326
M04-B	*N,N*-Didesmethyl-hydroxyl	Didesmethylation and hydroxylation	$C_{14}H_{18}N_2O_2Cl_2$	317.0818	7.44	(96)	(110)						nd	nd	260

Table 3: U-47700 metabolite reports (chromatographic peak area of molecular ion ([M+H]+) of substances of interest/peak area of molecular ion of U-47700 ratio, when available).

		N-Desmethyl-U-47700 (M01)	*N,N*-Didesmethyl-U-47700 (M02)	*N*-Desmethyl-hydroxyl-U-47700 (M03)	*N,N*-Didesmethyl-hydroxyl-U-47700 (M04)
U-47700 HLMs incubation	Reported study	detected (1.73)	detected (0.07)	detected (0.01)	
	Krotulski et al.	detected (19.8)	detected (4.57)	detected (0.04)	detected (0.06)
Blood sample	Reported case	detected (0.26)	detected (0.24)	detected (0.04)	
	Seither et al.	detected			
	Elliot et al.	detected	detected		
	Jones et al.	detected (0.11)			
Urine sample	Reported case	detected (6.60)	detected (5.30)	detected (2.20)	detected (3.26/2.60)
	Fleming et al.	detected	detected		
	Elliot et al.	detected	detected		
	Jones et al.	detected (4.98)	detected (1.57)	detected (1.13)	detected (0.62)
	Krotulski et al., case #1	detected (1.92)	detected (0.71)	detected (0.36)	detected (0.29)
	Krotulski et al., case #2	detected (3.57)	detected (0.86)	detected (0.64)	detected (0.18)
	Krotulski et al., case #3	detected (0.84)	detected (0.18)	detected (0.16)	detected (0.08)
	Krotulski et al., case #4	detected (14.3)	detected (5.86)	detected (1.86)	detected (1.86)
	Krotulski et al., case #5	detected (1.43)	detected (0.36)	detected (0.19)	detected (0.14)

Article 6 : New psychoactive substances in a drugged driving population: Preliminary results.

Nachon-Phanithavong Mélodie, Wille Sarah, Richeval Camille, Di Fazio Vincent, Samyn Nele, Humbert Luc, Gaulier Jean-michel, Allorge Delphine

Toxicologie Analytique et Clinique. 2017;29(1):41-6.

https://doi.org/10.1016/j.toxac.2016.12.002

Article 7 : Prevalence of new psychoactive substances and prescription drugs in the Belgian driving under the influence of drugs population.

Wille Sarah, Richeval Camille, Nachon-Phanithavong Mélodie, Gaulier Jean-michel, Di Fazio Vincent, Humbert Luc, Samyn Nele, Allorge Delphine

Drug Testing and Analysis. 2018;10(3):539-47.

https://doi.org/10.1002/dta.2232

Article 8 : New psychoactive substances in oral fluid of French and Belgian drivers in 2016

Richeval Camille, Wille Sarah, Nachon-Phanithavong Mélodie, Samyn Nele, Allorge Delphine, Gaulier Jean-michel

International Journal of Drug Policy. 2018;57:1-3.

https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2018.03.013

Article 9 : Acute Methiopropamine Intoxication After “Synthacaine” Consumption.

Daveluy Amélie, Castaing Nadège, Cherifi Hakim, Richeval Camille, Humbert Luc, Faure Isabelle, Labadie Magali, Allorge Delphine, Haramburu Françoise, Molimard Mathieu, Titier Karine

Journal of Analytical Toxicology. 2016 ;40(9):758-760.

https://doi.org/10.1093/jat/bkw073

Article 10 : Retrospective identification of 25I-NBOMe metabolites in an intoxication case.

Richeval Camille, Boucher Alexandra, Humbert Luc, Phanithavong Mélodie, Wiart Jean-François, Moulsma Mustapha, Citterio-Quentin Antony, Coulon Thierry, Hernu Romain, Vial Thierry, Allorge Delphine, Gaulier Jean-michel

Toxicologie Analytique et Clinique. 2017;29(1):71-81

https://doi.org/10.1016/j.toxac.2017.01.001

Article 11 : LSD instead of 25I-NBOMe: The revival of LSD? A case report.

Bodeau Sandra, Bennis Youssef, Régnaut Océane, Fabresse Nicolas, Richeval Camille, Humbert Luc

Toxicologie Analytique et Clinique. 2017;29(1):139-43

https://doi.org/10.1016/j.toxac.2016.12.007

Article 12 : Case reports: Four concomitant non-fatal intoxications with AB-FUBINACA and MDMA.

Allibe Nathalie, Richeval Camille, Willeman Théo, Humbert Luc, Allorge Delphine, Maignan Maxime, Eysseric-Guerin Hélène, Stanke-Labesque Frnaçoise, Gaulier Jean-michel

Toxicologie Analytique et Clinique. 2017;29(1):101-10

https://doi.org/10.1016/j.toxac.2016.12.006

Article 13 : Detection of the designer benzodiazepine metizolam in urine and preliminary data on its metabolism: Metizolam identification in urine.

Kintz Pascal, Richeval Camille, Jamey Carole, Ameline Alice, Allorge Delphine, Gaulier Jean-michel, Raul Jean-Sébastien

Drug Testing and Analysis.2017;9(7):1026-33

https://doi.org/10.1002/dta.2099

Article 14 : Detection of designer benzodiazepine flunitrazolam in urine and preliminary data on is metabolism

Ameline Alice, Richeval Camille, Gaulier Jean-Michel, Raul Jean-Sébastien, Kintz Pascal

Article soumis au journal Drug Testing and Analysis

Drug Testing and Analysis

Detection of the designer benzodiazepine flunitrazolam in urine and preliminary data on its metabolism

Journal:	*Drug Testing and Analysis*
Manuscript ID	DTA-18-0107.R1
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	18-May-2018
Complete List of Authors:	Ameline, Alice; Institut de médecine légale, Université de Strasbourg , Laboratoire de toxicologie RICHEVAL, Camille; CHR Lille, Laboratoire de Toxicologie Gaulier, Jean-Michel; CHR Lille, Laboratoire de toxicologie Raul , Jean-Sébastien ; Institut de Medecine Legale Kintz, Pascal; X-Pertise Consulting,
Keywords:	designer benzodiazepine, flunitrazolam, urine, metabolism, HLMs
Abstract:	Designer benzodiazepines were proposed as recreational drugs and are available via the Internet without control. For some of them, limited information concerning their effects, their toxicity and their detection in bio fluids are available in the literature. For others, nothing has been published. This is the case for flunitrazolam (FNTZ). In order to gain preliminary data on its elimination parameters in urine and to investigate its metabolism, one of the authors ingested one pink tablet bought on the internet, after confirming the absence of other compound and checking its announced dosage (0.25 mg) by NMR. A software algorithm was used to predict FNTZ biotransformation and 4 potential metabolites were proposed: 4-hydroxy- FNTZ, desalkyl- FNTZ, 7-amino- FNTZ and 7-acetamido- FNTZ. Urine samples after controlled administration were collected over 72 hours. After liquid/liquid extraction at pH 9.5, FNTZ concentrations were determined using UPLC-MS/MS. FNTZ remained detectable in hydrolyzed urine for 21 hours after ingestion, with concentrations ranging between 1 and 18 ng/mL. About 3 % of the initial dose was excreted in urine as total unchanged FNTZ during this period. In vitro experiments, after HLMs incubations, were performed using UPLC-Q-TOF-MS in order to investigate the potential CYP- and UGT- dependent metabolites. Only one metabolite was produced: 7-amino-FNTZ. However, in the urine specimens, desalkyl-FNTZ, 7-acetamido-FNTZ and 7-amino-FNTZ were the main detected compounds. The identification of FNTZ metabolites dramatically improves the detection windows of the drug up to 37 hours.

Detection of the designer benzodiazepine flunitrazolam in urine and preliminary data on its metabolism

Alice Ameline [*a], Camille Richeval [b], Jean-michel Gaulier [b], Jean-sébastien Raul [a] and Pascal Kintz [a,c]

a Institut de médecine légale, Strasbourg, France
b CHU Lille, Unité Fonctionnelle de Toxicologie, Lille, France
c X-Pertise Consulting, Oberhausbergen, France

* Correspondence to : Alice Ameline, Institut de médecine légale, 11 rue Humann, 67000 Strasbourg, France. E-mail: ameline.alice@gmail.com

For Peer Review

Designer benzodiazepines were proposed as recreational drugs and are available via the Internet without control. For some of them, limited information concerning their effects, their toxicity and their detection in bio fluids are available in the literature. For others, nothing has been published. This is the case for flunitrazolam (FNTZ). In order to gain preliminary data on its elimination parameters in urine and to investigate its metabolism, one of the authors ingested one pink tablet bought on the internet, after confirming the absence of other compound and checking its announced dosage (0.25 mg) by NMR. A software algorithm was used to predict FNTZ biotransformation and 4 potential metabolites were proposed: 4-hydroxy- FNTZ, desalkyl- FNTZ, 7-amino- FNTZ and 7-acetamido- FNTZ. Urine samples after controlled administration were collected over 72 hours. After liquid/liquid extraction at pH 9.5, FNTZ concentrations were determined using UPLC-MS/MS. FNTZ remained detectable in hydrolyzed urine for 21 hours after ingestion, with concentrations ranging between 1 and 18 ng/mL. About 3 % of the initial dose was excreted in urine as total unchanged FNTZ during this period. In vitro experiments, after HLMs incubations, were performed using UPLC-Q-TOF-MS in order to investigate the potential CYP- and UGT-dependent metabolites. Only one metabolite was produced: 7-amino-FNTZ. However, in the urine specimens, desalkyl-FNTZ, 7-acetamido-FNTZ and 7-amino-FNTZ were the main detected compounds. The identification of FNTZ metabolites dramatically improves the detection windows of the drug up to 37 hours.

Keywords: designer benzodiazepine; flunitrazolam; urine; metabolism; HLMs

Introduction

New psychoactive substances (NPS) consist in various narcotic or psychotropic drugs (i) that are not controlled by the 1961 United Nations Single Convention on Narcotic Drugs or the 1971 United Nations Convention on Psychotropic Substances, and (ii) that usually (but not exclusively) replicate chemical structures and/or pharmacological effects of classical drugs of abuse (DOA), such as opiates, ecstasy, amphetamine, cocaine or cannabis. Currently, NPS represent a significant analytical and interpretive challenge for forensic and clinical toxicologists [1-3]. The online availability (on specialized websites) of NPS has rapidly increased over the last decade. For instance, 66 new substances were detected for the first time in European countries in 2016, bringing the number of new substances monitored by the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) to more than 620 [4].

Benzodiazepines are a class of drugs widely prescribed for the treatment of anxiety, insomnia, epilepsy, muscle spasms or alcohol withdrawal. This class of drugs is often diverted from the medical use both by opiates addicts or recreational abusers. Indeed, the extensive research around their chemical structures resulted in a wide variety of active compounds that never got a marketing authorization and which are now picked up by online e-merchants of NPS and sold under the name "designer benzodiazepines" [5]. The first example of illegal use of non-prescribed benzodiazepine was phenazepam, developed in the Soviet Union in the 1970s. Since the end of year 2010, designer benzodiazepines were proposed as recreational drugs. There are more than twenty designer benzodiazepines on the NPS market [6]. The deleterious effects of designer benzodiazepines depend on the dose consumed. The most common side effects at low doses are drowsiness, fatigue, and lethargy. At higher doses, motor coordination disorders, dizziness, mood swings and euphoria may occur. The slow elimination of some benzodiazepines causes their accumulation in lipid-based tissues, which can lead to a delayed overdose in case of repeated consumption. After a long period of consumption, the abuser can develop tolerance and dependence [7]. Sudden drug discontinuation can cause a withdrawal symptom.

Severe effects occur when designer benzodiazepines are consumed in combination with opioids. Both pharmacological classes induce a synergistic effect which can cause a respiratory depression [8]. Abuse is widespread among poly-consumers, because designer benzodiazepines balance the euphoria due to opioids. Some benzodiazepines have a marked amnesic effect and the consumer loses memory for a few hours after administration [9].

For Peer Review

Among this family of compounds, there are different molecules for which no controlled study has been done. This is the case of flunitrazolam (FNTZ) (Figure 1). FNTZ was discovered in the 1960s but has never been marketed for unknown reasons. Its chemical structure is close to flunitrazepam, although FNTZ has a triazolo cycle. Scientists have very little information about doses, effects and tolerability.

This study focuses on the detection of FNTZ and its metabolites in urine after administration of an oral dose of 0.25 mg to a human volunteer, using standard ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight-mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS). In addition, FNTZ metabolism was *in vitro* studied after FNTZ incubation with human liver microsomes.

For Peer Review

Material and methods

Self-administration study

In order (i) to gain preliminary data on the elimination parameters of FNTZ in urine, (ii) to investigate its metabolism and (iii) to be able to interpret analytical data, a male subject (56-year-old, 76 kg) ingested one pink tablet bought on the internet and declared on the webshop to contain 0.25 mg of active material. In France, given the subject was one of the authors, it was not necessary to obtain a written consent as FNTZ is not listed as a drug of abuse. Urine specimens were collected over 72 hours in plastic vials without preservative and stored at +4°C until analysis. Urine was collected at various times, with no fixed interval. Volume of each urine voiding was measured to establish the total urine FNTZ excretion. No blood sample was collected, as this required specific authorization due to the invasive nature of this specimen and specific oxygenotherapy, which was not available at the laboratory.

Chemicals and reagents

FNTZ tablets were obtained from GR8 Research Chemicals - EU (Holland). β-OH-ethyltheophyllin (internal standard), methyl-clonazepam (internal standard), ammonium formate, formic acid, sulfosalicylic acid dihydrate, β- glucuronidase (Helix pomatia), alamethicin (Trichoderma viride), uridine diphosphate glucuronic acid (UDPGA), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), glucose-6-phosphate (G6P), 5-sulfosalicylic acid, were all purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Tetra-sodium salt of a

reduced form of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NADPH) was purchased from Roche (Mannheim, Germany). A pool of human liver microsomes (HLMs) at a concentration of 20 mg of microsomal protein/mL, prepared from livers of 36 donors, including 11 women and 25 men, aged from 31 to 80 years, was purchased from Biopredic (La Bretèche, Saint Grégoire, France) and preserved at -80°C until use. LC-MS grade water, ethanol, methanol and acetonitrile were purchased from Biosolve (Dieuze, France) and all other chemicals were of analytical grade and obtained from common commercial sources.

Nuclear Magnetic Resonance analysis

In order to confirm the absence of other compounds, such as synthesis impurities, and to check announced dosage of the FNTZ tablet (0.25 mg), a liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry detection (LC-HRMS) analysis (see below) was completed by a nuclear magnetic resonance (NMR) analysis, according to previous applications [10,11]. Briefly, the NMR spectra were recorded on AVANCE 300 (Bruker Biospin, France) operating at 300 MHz equipped with a 5 mm quadruple nucleus probe (QNP) probe at 295 K. The 1H spectra were recorded with 64 scans, a 32-K time-domain data points with 4800 Hz spectral width, an acquisition time of 3.42 s, a relaxation delay of 2 s and a flip angle of 30°. The Free Induction Decays (FIDs) were transformed (0.3 Hz broadening) and the baseline was corrected. After thin manual grinding of the powder using a mortar, 7.5 mg was dissolved in 600 µL of methanol-D4 and the ERETIC (Electronic REference To access In vivo Concentrations) method was used for the determination of absolute concentrations of FNTZ. ERETIC consisted of a digitally generated Gaussian peak (on single point calibration calibrated using a reference sample 15 mg of caffeine in 600 µL de CDCl3 and a control point using 10 mg of the same substance in 600 µL de CDCl3) inserted into the spectrum of a sample by the software after processing the FID. With ERETIC, the value peak area integrals in the spectrum give directly information about the concentration of protons sample purity [12].

Liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis

All urines samples were submitted to UPLC-MS/MS analysis on an Acquity class I ultra-high performance liquid chromatography coupled to a Xevo TQD tandem mass spectrometer from Waters (Milford, MA, USA), using a screening method devoted to the identification and quantification of designer benzodiazepines.

For Peer Review

Before analysis, urine specimens were hydrolyzed using 250µL of β-glucuronidase at pH 5.2 for 12 h at 40 °C. FNTZ was extracted from 1 mL hydrolyzed urine in presence of 1 ng of diazepam-d_5 used as internal standard, 1 mL saturated borate buffer pH 9.5 and 5 mL of a mixture of ether/dichloromethane/hexane/isoamyl alcohol (50:30:20:0.5). After 15 minutes of agitation at room temperature, centrifugation (3000 rpm for 15 min) and evaporation to dryness at 45 °C, the residue was reconstituted in 50 µL of 5 mM ammonium formate buffer adjusted at pH 3. Chromatography was achieved using a Waters Acquity HSS C18 column (150 x 2.1 mm x 1.8µm) maintained at 50°C in a thermostatically controlled oven. A gradient elution was performed using formate buffer adjusted to pH 3 (mobile phase A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (mobile phase B). The flow rate was 0.4 mL/min. The initial gradient was 87% phase A and the final gradient, at 15min, was 5% phase A. An injection volume of 10 µL was used in all cases. A Xevo TQD triple quadrupole mass spectrometer was used for the detection of the molecule. Ionization was achieved using electrospray in the positive ionization mode (ES+). The following conditions were found to be optimal for the analysis of FNTZ and the internal standard: capillary voltage at 1.5kV; source block temperature at 149°C; desolvation gas nitrogen heated at 600°C and delivered at a flow rate of 1000L/h. In order to establish appropriate multiple reaction monitoring condition, the cone voltage was adjusted to maximize the intensity of the protonated molecular ion and collision induced dissociated of both species was performed. Cone voltage and collision energy were adjusted to optimize the signal for the 2 most abundant product ions of FNTZ: m/z 337.9 > 263.9 (60 V and 34 eV) and 337.9 > 102.8 (60 V and 40 eV), and the most abundant product ion of internal standard m/z 291.9 > 197.8 (56 V and 32 eV). MassLynx 4.1 software was used for quantification.

Linearity was observed for flunitrazolam concentrations ranging from 0.1 to 100 ng/mL, with a correlation coefficient of $r^2 = 0.992$. QC samples (1 and 10 ng/mL), analysed in duplicate in ten indenpendant experimental assays, were used for determination a coefficient of variation for precisions and accuracy. These CVs were lower than 20 %. The limit of detection and the lower limit of quantification were 0.1 ng/mL. Under the used chromatographic conditions, there was no interference with the analyses by chemicals or any extractable endogenous materials present in urine. The matrix effect (< 20 %) was investigated with spiked flunitrazolam at 200 ng/mL in 10 blank mixed urine.

For Peer Review

Flunitrazolam metabolites investigations

Metabolites of FNTZ were *in vitro* investigated using human liver microsome (HLMs) incubates and retrospectively analysis in urine samples by liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry detection (LC-HRMS) using an already method reported [10, 11]. Once thawed, HLMs (2 mg protein/mL for a final volume of 100 µL) were pre-activated by alamethicin (at 0.1 mmol/L) on ice in an intermediate volume of 50 µL in 0.1 M Tris-HCl-$MgCl_2$ (10 mM $MgCl_2$ and 100 mM Tris-HCl solution) at pH 7.4. This mixture was added to a 50 µL-dried residue of two different concentrations (100 µM or 500 µM) of a FNTZ methanolic solution. Fifty µL of a cofactor mixture (5 mM UDPGA, 1.3 mM NADPH, 3.3 mM G6P and 0.5 U/mL G6PD) in 0.1 M Tris-HCl was then added. The enzymatic reaction was performed at 37 °C for 60 or 120 min and stopped by the addition of 200 µL of methanol and subsequently centrifuged at 4 °C for 14 min at 32000 g. Supernatants were frozen at -20°C until analysis. 10 µL of methanol-containing methyl-clonazepam at 0.125 mg/L and β-OH-ethyltheophyllin at 1.6 mg/L (internal standards) together with 100 µL of ammonium formate buffer 5 mM, pH 3, were added to 50 µL of supernatant.

For urines samples, 10 µL of the same internal standards solution used for metabolite investigations were added to 1 mL of hydrolyzed urine with 500 µL phosphate buffer pH 9.2, 1M, and 3 mL of a mixture of dichloromethane/ether/hexane/isoamyl alcohol (30/50/20/0.5; v/v/v/v). After centrifugation, supernatants were evaporated and 100 µL of a mixture of ammonium formate buffer 5mM, pH 3/acetonitrile in 0.1 v/v % formic acid (87/13; v/v) were added.

LC-HRMS analysis

The chromatographic separation of HLMs incubate or urine extracts (10 µL injected) was performed using an ACQUITY HSS C18 column (150 x 2 mm, 1.8 µm, Waters) in an oven at a temperature of 50 °C, and mobile phases including ammonium formate buffer 5mM, pH 3 (A2) and acetonitrile in 0.1 v/v % formic acid (B2); flow rate of 0.4 mL/min was used. Initial concentration of mobile phase B2 (13 %) held until 0.5 min, increased to 50 % at 10 min, then to 95 % at 10.25 min, and finally held until 12.25 min. Mass spectrometry data were acquired using a XEVO G2-XS QTOF (Waters, Manchester, UK) instrument controlled with MassLynx 4.1 software. Mass spectrometric conditions were as follows: positive electrospray ionization interface (ESI+), ion spray voltage of 20 V, nitrogen as desolvation gas and argon as collision gas, source temperature at 140 °C and desolvation temperature at 500 °C with a desolvation gas (nitrogen) flow rate of 900 L/h. Conditions for the time of flight mass

For Peer Review

spectrometer scan mode were as follows: scan range 100-1000 m/z at 6 eV (low energy) and 50-1000 m/z with a collision energy ramp from 10-40 eV (high energy).

Metabolite identification

Data process was performed using ChromaLynx, TargetLynx, MassFragment and MetaboLynx associated softwares (Waters, Manchester, UK). A software algorithm (MetaboLynx™) was used in order to *in silico* predict FNTZ biotransformations. Briefly, taking into account available data on the metabolism of related substances, sets of theoretically possible biotransformations of FNTZ were created based on the structure of the drug. The automated metabolite profiling process was completed through the use of the fragmentation interpretation software tool MassFragmentTM 4.1 (Waters), to enable software driven assignment of metabolite structures from fragmentation patterns. The LC-HRMS acquired data of HLM incubates are subsequently cross-checked to *in silico* predicted biotransformations : criteria used for identification of the targeted compounds included 3 mDA as exact mass error of the precursor ion as well as product ions, and +/- 0.25 min as tolerance in retention time for the precursor ion.

For Peer Review

Results and discussion

For identification and characterization of FNTZ tablet, LC-HRMS and NMR spectroscopy were applied (Figure 2). No significant organic impurity was detected in the FNTZ tablet using LC-HRMS or NMR. In particular, the absence of other benzodiazepines-related compounds or benzodiazepines precursors (that could influence the *in vitro* experiments) was checked. In addition, using the ERETIC method, NMR analysis revealed a 0.23 mg content in the tablet in agreement with the announced 0.25 mg dosage. Several tablets were tested with the same result, but of course one cannot exclude that the ingested tablet was different.
After oral administration of one tablet of FNTZ, the overall behavior of the subject was not modified. A slight sensation of weakness was noticed, but no physical or behavioral impairment was observed.

Unmetabolized FNTZ could be detected using LC-MS/MS in urine specimens up to 21 hours. A typical chromatogram is presented in Figure 3. The concentration time profile of FNTZ excretion in urines is presented in Figure 4. The drug was present at low concentrations,

always lower than 18 ng/mL. The good sensibility of our MS/MS method is confirmed by the chromatogram in Figure 5, corresponding to a concentration of 0.3 ng/mL. About 3 % of the initially ingested dose was excreted in urine as unchanged FNTZ, during the first 21 hours. All the urine specimens tested negative using the ELISA Alere Microplate kit for benzodiazepines.

In vitro experiments using HLMs incubations and LC-HRMS analysis were performed in order to investigate the potential CYP- and UGT- dependent metabolites of FNTZ ($C_{17}H_{12}FN_5O_2$; *m/z* $[M+H]^+$ 338.1078) [13]. Using a software algorithm, four potential FNTZ metabolites were *in silico* predicted: 4-hydroxy-FNTZ, desalkyl-FNTZ, 7-amino-FNTZ and 7-acetamido-FNTZ. It is not surprising to observe theses metabolites as they correspond to those observed in urine from subject under flunitrazepam therapy [14]. Regarding the two tested concentrations of FNTZ (100 µM or 500 µM) and the two incubation durations (60 and 120 min), a satisfactory metabolite production (highest chromatogram peak area related to metabolite) was observed after incubation of FNTZ for 2 hours at 500 µM with HLMs. Only one metabolite was produced *in vitro* using HLMs: 7-amino-FNTZ ($C_{17}H_{14}FN_5$; *m/z* $[M+H]^+$ 308.1306) that is the product of NO_2 reduction to NH_2. In the urine of the volunteer, 7-amino-FNTZ was identified up to 37 hours. Desalkyl- FNTZ ($C_{17}H_{13}FN_4$; *m/z* $[M+H]^+$ 293.1179) resulting of the loss of nitrogen oxide, and 7-acetamido-FNTZ ($C_{19}H_{16}FN_5O$; *m/z* $[M+H]^+$ 350.1411) that is the result of acetylation of 7-amino function were also identified in the urine, along the excretion time (Figure 6). The concentrations of desalkyl-FNTZ were always lower than those of the 2 others metabolites and during re-analysis showed chemical instability. Hydroxylated form of FNTZ was not detected in HLMS incubates nor in the urine samples.

In the view of metabolite chromatographic peak area in urines samples observed using LC-HRMS (Figure 7), 7-acetamido-FNTZ, and mainly 7-amino-FNTZ, are the main FNTZ forms excreted in urine samples. These two metabolites remain detectable up to 37 hours after FNTZ intake. Even if the *in vivo* observed data on FNTZ metabolism are limited to one subject in this study, 7-acetamido-FNTZ, and above all 7-amino-FNTZ could be proposed as reliable metabolites to be recorded in HRMS libraries in order to improve the detection of FNTZ users.

For Peer Review

The protocol to obtain all this data has already been described for other designer benzodiazepines by Scandinavian and German groups, including flubromazolam [15, 16, 17], pyrazolam [16], diclazepam [18] and somedesigner nitrobenzodiazepines clonazolam, meclonazepam and nifoxipam [19].

Conclusion

The benzodiazepine designer is a class of new psychoactive substances in full expansion. With the establishment of legal barriers for the first benzodiazepines (inscribed on the list of controlled substances, even banned), users are turning to less known molecules. Thus, for some designer benzodiazepines, limited information concerning their effects, their toxicity as well as methods of analysis is available in the literature, while for others, very little information has been published. This is the case for FNTZ. The main findings of this study suggest that FNTZ is metabolized in humans into 7-acetamido-FNTZ and 7-amino-FNTZ. The identification of FNTZ metabolites dramatically improves the detection windows of the drug.

For Peer Review

References

1. Madras BK. The Growing Problem of New Psychoactive Substances (NPS). *Curr Top Behav Neurosci* 2016;32:1-18.

2. Logan BK, Mohr ALA, Friscia M, et al. Reports of Adverse Events Associated with Use of Novel Psychoactive Substances, 2013-2016: A Review. *J Anal Toxicol* 2017;28:1-38.

3. Huestis MA, Brandt SD, Rana S, Auwärter V, Baumann MH. Impact of Novel Psychoactive Substances on Clinical and Forensic Toxicology and Global Public Health. *Clin Chem* 2017; https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.274662

4. EMCDDA - European Drug Report 2017: Trends and Developments. Luxembourg: Publications Office of the European Union ; UNODC (2017) World Drug Report 2017 (ISBN: 978-92-1-148291-1, eISBN: 978-92-1-060623-3, United Nations publication, Sales No. E.17.XI.6).].

5. Moosmann B, King LA, Auwärter V. Designer benzodiazepines: a new challenge. *World Psychiatry* 2015;14(2):248.

6. Chetraru E, Ameline A, Gheddar L, Raul JS, Kintz P. Les « designer benzodiazepines » : qu'en sait-on aujourd'hui? *Toxicol Anal Clin* 2018;30:5-18.

7. Vinkers CH, Tijdink JK, Luykx JJ, Vis R. Choosing the correct benzodiazepine: mechanism of action and pharmacokinetics. *Ned Tijdschr Geneeskd* 2012;155(35):A4900.

8. Griffin CE, Kaye AM, Bueno FR, Kaye AD. Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. *The Ochsner J* 2013;13(2):214-223.

9. Andersson M, Kjellgren A. The slippery slope of flubromazepam: Experiences of a novel psychoactive benzodiazepines as discussed on a Swedish online forum. *Nordic Studies on Alcohol and Drugs* 2017;34(2):217-229.

10. Kintz P, Richeval C, Jamey C, Ameline A, Allorge D, Gaulier JM, Raul JS. Detection of the designer benzodiazepine metizolam, in urine and preliminary data on its metabolism. *Drug Test Anal* 2016;9:1026-1033.

11. Richeval C, Gicquel T, Hugbart C, Le Dare B, Allorge D, Morel I, Gaulier JM. In vitro characterization of NPS metabolites produced by human liver microsomes and the HepaRG cell line using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) analysis: application to furanyl fentanyl. *Curr Pharm Biotechnol* 2017;18(10):806-814.

12. Akoka S, Barantin L, Trierweiler M. Concentration Measurement by Proton NMR Using the ERETIC Method. *Anal Chem* 1999;71:2554-2557.

For Peer Review

13. Boumrah Y, Humbert L, Phanithavong M, Khimeche K, Dahmania A, Allorge D. In vitro characterization of potential CYP- and UGT-derived metabolites of the psychoactive drug 25B-NBOMe using LC-high resolution MS. *Drug Test Anal* 2017;8:248-526.

14. Dinis-Oliveira RJ. Metabolic profile of flunitrazepam: clinical and forensic toxicological aspects. *Drug Metab Lett* 2017;11(1):14-20.

15. Huppertz LM, Moosmann B, Auwärter V. Flubromazolam – Basic pharmacokinetic evaluation of a highly potent designer benzodiazepine. *Drug Test Anal* 2018;10(1):206-211.

16. Pettersson Bergstrand M, Meyer MR, Beck O, Helander A. Human urinary metabolic patterns of the designer benzodiazepines flubromazolam and pyrazolam studied by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Drug Test Anal* 2018;10(3):496-506.

17. Noble C, Mardal M, Bjerre Holm N, Stybe Johansen S, Linnet K. In vitro studies on flubromazolam metabolism and detection of its metabolites in authentic forensic samples. Drug Test Anal 2017;9(8):1182-1191.

18. Moosmann B, Bisel P, Auwärter V. Characterization of the designer benzodiazepine diclazepam and preliminary data on its metabolism and pharmacokinetics. *Drug Test Anal* 2014;6(7-8):757-763.

19. Meyer MR, Bergstrand MP, Helander A, Beck O. Identification of main human urinary metabolites of the designer nitrobenzodiazepines clonazolam, meclonazepam, and nifoxipam by nano-liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for drug testing purposes. *Anal Bioanal Chem* 2016;408(13):3571-3591.

For Peer Review

Article 15 : LSD Detection and Interpretation in Hair

Richeval Camille, Allorge Delphine, Vanhoye Xavier, Gaulier Jean-Michel

Current Pharmaceutical Design 2017;23(36):5496-5501

https://doi.org/10.2174/1381612823666170622102943

Article 16 : Characterization of metizolam, a designer benzodiazepine, in alternative biological specimens

Kintz Pascal, Jamey Carole, Ameline Alice, Richeval Camille, Raul Jean-Sébastien

Toxicologie Analytique et Clinique. 2017;29(1):57-63.

https://doi.org/10.1016/j.toxac.2016.09.004

Article 17 : Behavioural differences in tobacco and tea use (Siberia, 1650-1900 A.D.)

Macé Matthias, Romanova Liubomira, Richeval Camille, Gérard Patrice, Cannet Catherine, Ludes Bertrand, Allorge Delphine, Alekseev Anatoly, Gaulier Jean-michel, Crubézy Eric

Article soumis au journal The New England Journal of Medicine (NEJM)

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

Please review the Supplemental Files folder to review documents not compiled in the PDF.

Behavioural differences in tobacco and tea use (Siberia, 1650-1900 A.D.)

Journal:	*New England Journal of Medicine*
Manuscript ID	18-09693
Article Type:	Letter NOT about NEJM Article
Date Submitted by the Author:	17-Jul-2018
Complete List of Authors:	Macé, Matthias; Université Toulouse III Paul Sabatier - CNRS, Molecular Anthropology and Image Synthesis Laboratory-UMR 5288 Romanova, Liubomira; Université Toulouse III Paul Sabatier - CNRS, Molecular Anthropology and Image Synthesis Laboratory-UMR 5288 Richeval, Camille; Faculté de Médecine-Université Lille 2, Impact of the Chemical Environment on Human Health-EA 4483 Gérard, Patrice; Universite Toulouse III Paul Sabatier, Molecular Anthropology and Image Synthesis Laboratory-UMR 5288 Cannet, Catherine; Institute for Legal Medicine of Strasbourg Ludes, Bertrand; Institute for Legal Medicine of Paris Allorge, Delphine; Faculté de Médecine-Université Lille 2, Impact of the Chemical Environment on Human Health-EA 4483 Alekseev, Anatoly; North-Eastern Federal University in Yakustk Gaulier, Jean-Michel; Faculté de Médecine-Université Lille 2, Impact of the Chemical Environment on Human Health-EA 4483 Crubézy, Eric; Université Toulouse III Paul Sabatier - CNRS, Molecular Anthropology and Image Synthesis Laboratory-UMR 5288
Abstract:	

SCHOLARONE™
Manuscripts

Confidential: Destroy when review is complete.

Behavioural differences at the origins of tobacco and tea use (Siberia, 1650-1900 A.D.)

Macé Matthias D.V.M. Ph.D., Romanova Liubomira M.Sc, Richeval Camille M.Sc. , Patrice Gérard M.Sc, Catherine Cannet M.Sc, Bertrand Ludes M.D. Ph.D, Delphine ALLORGE Pharm.D. Ph.D, Alexeev Anatoly Ph.D, Jean- Michel Gaulier,Pharm.D. Ph.D, Eric Crubézy M.D. Ph.D

The use of tobacco products is the deadliest addiction worldwide, and a positive association between smoking and caffeine consumption was found in some populations[1]. In order to study the potential factors associated with the consumption of and addiction to these products over time, we analysed the hair of 48 autochthonous frozen bodies from Yakutia from the 17th to the 19th century for the main xenobiotic compounds from tea and tobacco consumption: theobromine, theophylline, caffeine, nicotine, and cotinine. The analysis of these compounds is well established in forensic toxicology and procedures from this field can be adopted to rule out post-mortem contamination in archaeological studies. We studied archaeological and historical data associated with the bodies, and, in 7 cases, pulmonary histology to investigate for potential co-morbidities.

Tobacco and tea were introduced by Europeans despite repeated official bans on tobacco. We found a positive, but moderate, correlation between smoking and caffeine consumption in our study sample (0.49). Principal component analysis (PCA) on xenobiotic concentrations displays outliers who are heavy smokers - a woman showing pulmonary emphysema - and tea consumers. Their funerary artefacts include exceptional pipes and in one case a teapot (Figure 1). Those outliers are dispersed over the study area, away from trading posts with Europeans. By interpolation of PCA axes values associated with the two products over the geographical range, we can deduce that these outliers are isolated cases amongst light or passive consumers, at least before 1800. Correlation between nicotine and cotinine levels among individuals showed differences between children and adult age classes ($p = 0.0143$ with older class) thus suggesting passive smoking among children.

Before 1800, women were the first to adopt tobacco, a fact possibly related to their special role in shamanic ceremonies since no psychoactive drugs were found in the samples. In contrast, men display a higher median load of methylxanthines, possibly reflecting a more social-driven tea consumption.

During the 19th century, the European way of life spread, but consumption of tobacco and tea was linked to the supply routes (Figure 1). Interpolation of PCA reflecting the consumption of the two products shows opposite geographic gradients reflecting the supply routes of these two commodities (Figure 1). As shown by the sub-significant difference in caffeine concentration (log. reg., $p = 0.056$), the consumption of tea was higher than before, the practice of smoking spread (the median concentration increased globally), women's role in society lost its importance[2] and men smoked more than women on average (the median of tobacco consumption for men is above that of women). Women still smoked and even today in Yakutia, female smoking remains higher than in other parts of Russia[3].

It appears from these data from virgin Siberian populations that tea and tobacco were luxury products at the start of the period of contact with Europeans. Some individuals immediately became heavy consumers who developed the modes related to these substances.

Confidential: Destroy when review is complete.

For Review Only

Consumption of these products persisted over time but a majority of consumers were average or small consumers for whom accessibility to substances was the limiting factor.

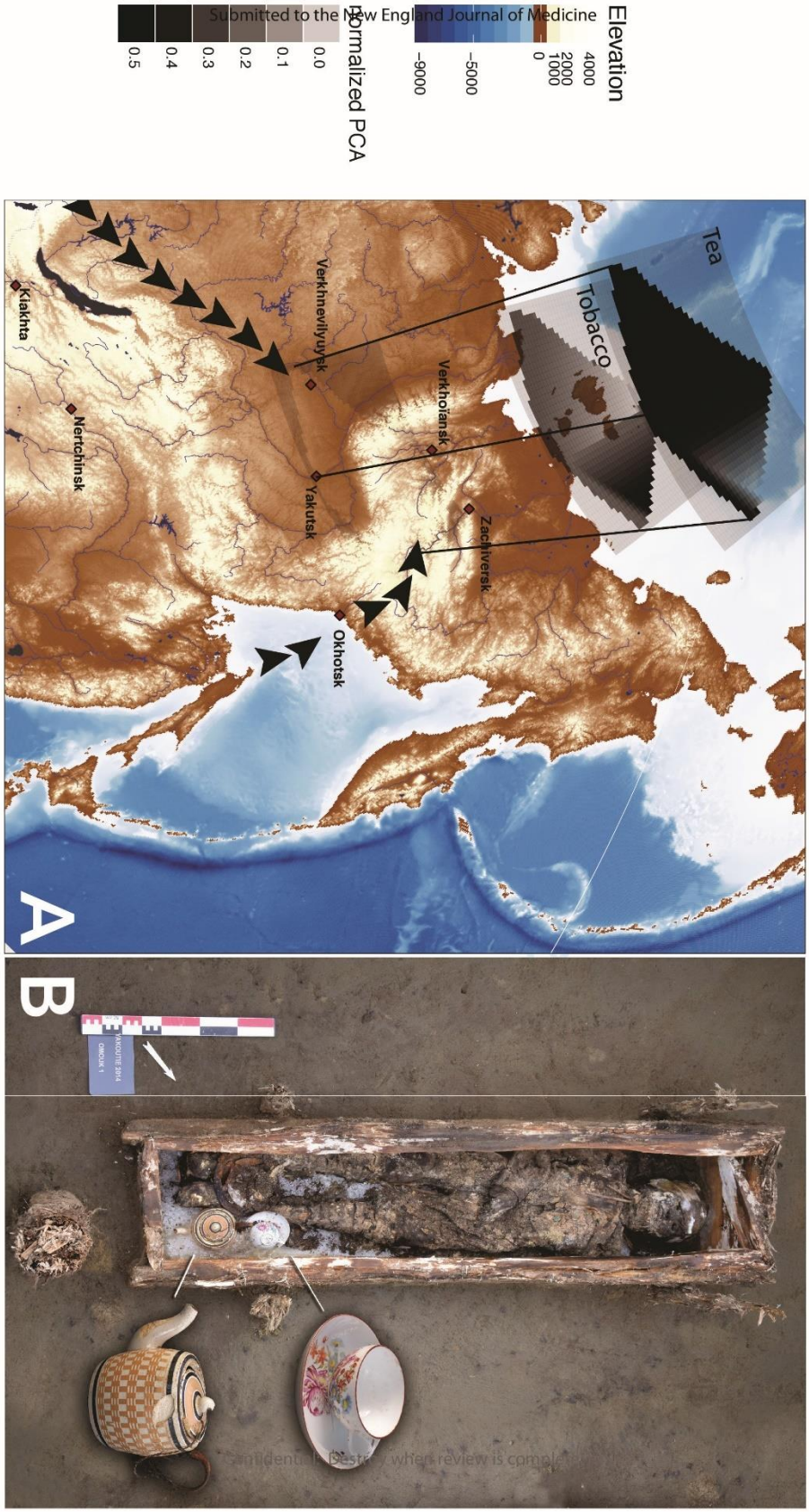
Confidential: For Review

Confidential: Destroy when review is complete.

References

1. Treur JL, Taylor AE, Ware JJ, et al. Associations between smoking and caffeine consumption in two European cohorts. *Addiction*. 2016;111(6):1059-1068. doi:10.1111/add.13298.
2. Okladnikov AP. *Yakutia: Before Its Incorporation into the Russian State*. (Michael HN, ed.). Montreal and London: McGill-Queen's Press-MQUP; 1970.
3. Gambaryan MG, Kalinina AM, Shal'nova SA, Deev AD, Didkovskiy NA. Epidemiology Of Chronic Respiratory Disease In Different Climatic And Geographic Regions Of Russia [In Russian]. *Russ Pulmonol*. 2014;(3):55-61. doi:10.18093/0869-0189-2014-0-3-55-61.

Confidential: For Review



Confidential: Destroy when review is complete

Table of Contents

I. METHODS **2**
- **A. Data collection** **2**
- **B. Historical context** **2**
- **C. Methods for hair analysis** **3**
  1. Chemicals and reagents 3
  2. Sample preparation 3
- **D. Methods for anthracose and emphysema analysis** **5**

II. STATISTICAL ANALYSES **5**
- **A. PCA-based Imputation and outliers** **5**
- **B. Regressions and correlations** **5**
  1. Datation (anterior or posterior to 1800) *vs* Hair Residues 5
  2. Social (chaman) status *vs* Hair Residues 5
  3. Gender *vs* Hair Residues 5
  4. Correlations Nicotine/Cotinine among age classes throughout the time range 6
- **C. PCA by product, interpolation & mapping** **6**

III. RESULTS **7**
- **A. Raw Results** **7**
- **B. Statistical analyses** **9**
  1. Tea or Tobacco use over time 9
  2. Social status vs Hair Residues 11
  3. Gender vs Hair Residues 11
  4. Age classes co-correlations 11

IV. SUPPLEMENTARY FIGURES **13**

V. SUPPLEMENTARY REFERENCES **18**

I. METHODS

A. Data collection

During the last 15 years, we systematically surveyed 31,000 km² of particulary suitable terrain in the Sakha Republic (Yakutia) and completed the archaeological study of 174 graves (some still frozen) dating from the 15th to the 19th century. The tombs were classified in five chrononological periods: before 1700, 1700-1750, 1750-1800, 1800-1850 and after 1860. We categorised and analysed the cultural characteristics of 150 ancient subjects and studied their familial and clan relationships[1,2]. Among these 150 ancient subjects, 47 had well preserved hair which was not in contact with sediment. We analysed hair samples close to the skull corresponding to the last weeks before death. The samples were collected and stored by forensic scientists and professional paleopathologists during the autopsy of the subjects, within minutes or hours of the opening of the tomb, avoiding the possibility of outside contamination. We were able to look for traces of pulmonary anthracosis in 14 out of the 150 subjects, and in 7 cases were able to study hair and lungs concomitantly to establish whether high nicotine use was associated with anthracosis. Out of the 47 subjects, 9 subjects were found with a pipe, and a teapot and a teacup were associated with one early 19th century subject. Remains of brewed tea were found in the latter.

B. Historical context

The first contacts between Russians and autochtonous populations date back to the beginning of the 17th century. The Yakut population hadn't been exposed to tobacco or tea before that time. According to historical data[a] the Yakuts took an immediate liking to these products, notably tobaco, to which a large part of the population including children became rapidly addicted [b]. Repression was swift. The Tsar's intention in conqueria Siberia was to collect taxes on furs, and not for a portion of this potential income to be diverted to tobacco or tea merchants. The sale and use of tobacco became illegal in 1634 in Russia and by extension in Siberia, and incurred capital punishment[c]. These products were authorised again in Russia in 1697 by Peter the Great who established two tobacco manufacturing plants in Ukraine[d]. The tobacco trade however remained forbidden in Siberia until 1822[e], date after which all trade restrictions with autochtonous populations were lifted, with the exception of alcohol[f]. Since 1660 however many traders sold primarily beads and tobacco, as these items were portable and in high demand[g]. From 1690, the importation of tobacco and tea via the Nerchisnk trading post near the border with China increased. The use of both substances spread through the population, faciliated by distance from the central government,

---

[a] Safronov F.G. Russkie promysly i torgi na severo-vostoke Azii v XVII - seredine XIX v. [*Russian shops in Northeast Asia in the 17th century*], Moskva: Nauka, 1980, P.67, 74

[b] Olyksandrovič. Ugolok dalekogo severa [*A little corner in the Far North*]// Sibirskaâ gazeta, Tomsk, 1884, №7 (Frebruary 12th), Kol.185-188

[c] Tomsinov V. A. Sobornoe ulozhenie 1649 goda. Zakonodatel'stva tsarya Alekseya Mikhailovicha [Council Core of 1649. Laws of the Tsar Alexeï Mikhaïlovitch], Moscow: Zertsalo. 2011. P. 258

[d] Polnoe sobranie zakonov Rossiiskoi Imperii [Complete Collection of Russian Empire Laws], V. 3. No. 1570 P.276; No. 1580 P.301, No. 1581 P.303 // http://www.nlr.ru/e-res/law_r/search.php

[e] Akty arkhivov Yakutskoi oblasti [Archive Records of Yakutsk Region] (de 1650 à 1800), V.1, Yakutsk, 1916. Pp.167, 174

[f] Polnoe sobranie zakonov Rossiiskoi Imperii [Complete Collection of Russian Empire Laws], V. 38. No.46. P.397 // http://www.nlr.ru/e-res/law_r/search.php

[g] Safronov F. G. Russkie promysly i torgi na severo-vostoke Azii v 17 – seredine 19 v. [*Russian shops in Northeast Asia in the 17th-19th centuries*], M.: Nauka, 1980. Pp.70, 74, 91, 103

corruption and non-application of the law[h]. After 1792 and until the beginning of the 20th century, tea reached the Russia-Mongolia border via the Kiakhta trading post and, from 1727, tobacco followed this route. **During the 19th century several Russian tobacco manufacturing plants delivered products to Oriental Siberia (including Yakutsk) by sea, via the Far East.**

C. Methods for hair analysis

1. Chemicals and reagents

β-OH-ethyltheophyllin, methyl-clonazepam, 5-sulfosalicylic acid, ammonium formate and formic acid, were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). LC-MS grade water and acetonitrile were purchased from Biosolve (Dieuze, France), while acetonitrile and methanol HPLC grade and 30 % hydrochloric acid were purchased from VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France).

2. Sample preparation

Hair samples (n=47) were photographed and decontaminated using two water baths (2 min each) and two dichloromethane baths (1 min each); the last dichloromethane bath was kept to be tested. The whole length of the sampled hair strands was analysed. After washing, the hair samples were dried, and subsequently cut into small pieces (<1 mm length). For extraction, 20 mg of hair samples were incubated in 500 µL of methanol for 1 hour at 60°C. The methanolic solution obtained after centrifugation (32,000 g for 5 min) was used for analysis.

a) Instrumentation

Previous studies on nicotine and caffeine analysis in hair [3–5] and the use of LC-MS/MS and LC-HRMS tools for toxicological investigations in hair [6,7] supported our decision to use these two analytical methods for the detection of tobacco and tea products in our ancient population sample. We combined these two techniques according to three previously reported methods[8,9] :

1 - A large screening for drugs and toxics compounds was performed in hair samples using LC-HRMS. The Waters ultra-performance liquid chromatography system consisted in two binary solvent manager LC pumps, a sample manager autosampler and an Acquity column manager oven. Mass spectrometry data were acquired using a XEVO G2-XS QTOF instrument (Waters, Manchester, UK) controlled with MassLynx 4.1 software. After addition of 50 µL of internal standards (methyl-clonazepam and β-OH-ethyltheophyllin) to 100 µL of the methanolic hair extract, the obtained mixture was subsequently evaporated to dryness at + 30 °C under a gentle stream of nitrogen. The dry residue was reconstituted using 50 µL of a mixture of ammonium formate buffer 5mM, pH 3/acetonitrile in 1 % formic acid (87/13 ; v/v): 10 µL were injected in the chromatographic system. Chromatographic separation was performed using an ACQUITY HSS C18 column (150 x 2.1 mm, 1.8 µm, Waters) in an oven temperature of 50 °C, and mobile phases including ammonium formate buffer 5mM at pH 3 and acetonitrile in 0.1 % formic acid. For detection, mass spectrometric conditions were as follows: positive electrospray ionization interface (ESI+), ion spray voltage set at 20 V, source temperature set at 140 °C and desolvation temperature at 500 °C with a desolvation gas flow rate of 900 L/h, nitrogen as desolvation gas and argon as collision gas. The data were

[h] Shapovalov A. V. Tabak v Zapadnoj Sibiri v 17-18 vv. [Tobacco in the Occidental Siberia during 17th-18th centuries]. Chuzhdoe — chuzhoe — nashe. Nabljudenija k probleme vzaimodejstvija kul'tur. Novosibirsk, 2000. Pp. 107–121.

processed using ChromaLynx, TargetLynx, MassFragment and MetaboLynx associated softwares (Waters) using a homemade database of more than 1,400 substances.

2 - Using LC-MS/MS (XEVO TQ-S system, Waters, Manchester, UK), another screening for psychoactive drugs including natural alkaloid compounds and related metabolites was performed in hair samples. After addition of 50 µL of internal standards (methyl-clonazepam and β-OH-ethyltheophyllin) to 50 µL of the methanolic hair extract, the obtained mixture was subsequently evaporated to dryness at + 30 °C under a gentle stream of nitrogen. The dry residue was reconstituted using 100 µL of ammonium formate buffer 5mM at pH 3: 10 µL were injected for separation using an Acquity UPLC HSS C18 column (150 x 2.1 mm, 1.8 µm, Waters) and a gradient including ammonium formate buffer 5mM at pH 3 and acetonitrile in 0.1 % formic acid. Xevo TQ-S tandem mass spectrometer was used for detection after positive electrospray ionization mode in the MRM mode (using two transitions for each analyte) for more than 300 compounds and metabolites

3 - Lastly, detection in hair of caffeine, theobromine, theophylline, nicotine and cotinine was performed using the same LC-MS/MS device (XEVO TQ-S system, Waters, Manchester, UK). Calibration curves were extemporaneously achieved in the 0.1 to 20 ng/mg range for caffeine, theobromine and theophylline, and in the 0.2 to 20 ng/mg range for nicotine and cotinine using blank head hair sample. After addition of 50 µL of internal standards (nicotine-D4 and cotinine-D3 at 5 µg/L) to 100 µL of the methanolic hair extract, the obtained mixture was subsequently evaporated to dryness at + 30 °C under a gentle stream of nitrogen. The dry residue was reconstituted using 100 µL of ammonium formate buffer 5mM at pH 3. Chromatographic separation of this extract was performed using an Acquity UPLC HSS C18 column (150 x 2.1 mm, 1.8 µm, Waters) and a gradient of (A) ammonium formate buffer 5mM at pH 3, and (B) ACN / 0.1 % formic acid as mobile phase at a flow-rate of 0.4 mL/min during 5 min. The oven temperature was set at 50°C and the injection volume was 10 µL. The gradient elution started with 100 % of A and decreased to 50 % at 3 min, and to 5 % at 3.3 min. The washing step with 95 % of solution B was held from 3.3 min to 4 min and the initial condition was applied from 4.1 min to 5 min. Xevo TQ-S tandem mass spectrometer was used for detection after positive electrospray ionization mode in the MRM mode using the following transitions: m/z 195.2 to 138.0 (for quantitation) and m/z 195.2 to 110.0 for caffeine; m/z 181.1 to 68.9 (for quantitation) and m/z 181.1 to 95.9 for theobromine; m/z 181.1 to 124.0 (for quantitation) and m/z 181.1 to 68.9 for theophylline; m/z 163.2 to 132.0 (for quantitation) and m/z 163.2 to 117.0 for nicotine; m/z 177.1 to 79.9 (for quantitation) and m/z 177.1 to 98.0 for cotinine; m/z 167.2 to 136.0 (for quantitation) and m/z 167.2 to 134.1 for nicotine-D4; m/z 180.1 to 80.0 (for quantitation) and m/z 180.1 to 100.9 for cotinine-D3. The validation procedure applied for this analytical method complied with both the French Analytical Toxicology Society (SFTA) and international recommendations for the validation of new analytical methods[10,11] including linearity, limit of detection (LOD), lower limit of quantification (LLOQ), accuracy, precision and matrix effects. Calibration curves, estimated using 1/x weighted quadratic regression, were considered acceptable if the coefficient of determination (r^2) was at least 0.99. The LLOQ was the lowest concentration with the two transitions presence and an intra-assay precision CV% and a relative bias lower than 25%. Intra-day and inter-day precision was calculated by analyzing 3 concentration levels in five replicates on five different days. Relative standard deviation (RSD) and percentage deviation of the average concentration from the corresponding nominal value were used to estimate precision and accuracy, respectively. These parameters were considered acceptable when they were lower than 25 % at the LLOQ, and lower than 20% for other levels. Ion suppression phenomenon was studied following the experimental system previously proposed[12]. Briefly, a standard solution containing the compounds of interest (at 100 µg/L) was continuously and directly infused into the mass spectrometer interface. A simultaneous LC flow containing either

a pure mobile phase or a blank biological extract (blank hair) was introduced through a tee. Evolution of the signal of the transitions at the retention times of the corresponding compounds of interest was studied to determine the presence and intensity of ion suppression.

D. Methods for anthracose and emphysema analysis

From our sample of 150 frozen subjects we were able to look for traces of pulmonay anthracosis in 14 subjects. In 7 cases, we could study hair and lungs concomitantly to determine whether important doses of nicotine were associated with anthracosis. Lungs were rehydrated in Ruffer I solution for 3 hours[13] and then immersed in 10% neutral buffered formalin for 7 days. After fixation, tissues were dehydrated through increasing graded series of ethylic alcohol, cleared in xylene and embedded in paraffin wax. Tissue sections of 5µm in thickness were stained with hematoxylin and eosin (H&E) to assess the general morphology.

II. STATISTICAL ANALYSES

A. PCA-based Imputation and outliers

Missing data where imputed using regularised iterative MFA[14] as implemented in the "missMDA" R package[15]. The strength of this method over replacement by median values is the use of iterative PCA for more realistic imputation. Principal Component Analysis is computed at the same time over the levels of the five pooled xenobiotics, and outliers defined from vizualising the PCA projection.

B. Regressions and correlations

Logistic regressions, with or without imputation, were performed according to the following formulae :

1. Datation (anterior or posterior to 1800) *vs* Hair Residues

a) Methylxantines:

date (0 = before 1800, 1 = after 1800) ~ Theophylline + Theobromine + Caffeine

b) Tobacco residues:

date (0 = before 1800, 1 = after 1800) ~ Nicotine + Cotinine

2. Social (chaman) status *vs* Hair Residues

chaman (0 = no, 1 = yes) ~ Theophylline + Theobromine + Caffeine + Nicotine + Cotinine

3. Gender *vs* Hair Residues

sex (0 = F, 1 = M) ~ Theophylline + Theobromine + Caffeine + Nicotine + Cotinine

a) Before 1800

b) After 1800

4. Correlations Nicotine/Cotinine among age classes throughout the time range

a) Correlation by age class

Spearman correlation coefficient was computed between Nicotine and Cotinine concentrations within each age class (0-15, 15-30, 30-50 & over 50 years old).

b) Co-correlation between age classes

Co-correlation between age classes was assessed between the children age class (0-15 y/o) and each one of the others. The computation was performed with data including and not including the 4 outliers (#14, 29, 31, 41, see Figure 1below)
One-sided Fischer Z test was was conducted with null hypothesis being that correlation is lesser in the children group thant in adult group and the alternative being that children data display lesser correlation coefficient. Zou's confidence intervals[16] was also computed. Computations were made using Cocor R package[17].

C. PCA by product, interpolation & mapping

PCA computation was performed on concentrations of xenobiotics grouped according to consumed product (methylxanthines for tea, nicotinoids for tobacco). Resulting PCA first axis values were interpolated over a rhomboid area comprised between the four studied archaeological fields using spline interpolation and triangulation based on Renkas tripack [18] for linear interpolation as implemented in the "akima" R package. The interpolated values were overlaid according to their geographic coordinates over the map as black transparency (values normalized between 0 and 0.7).

Maps were produced using the "marmap" R package and the National Oceanic and Atmospheric Aadministration bathymetrics and global relief data (resolution of 5 minutes) and then drawn following an orthographic projection for 100° longitude, 60° latitude and 0 m elevation.

III. RESULTS

A. *Raw Results*

Caffeine, theobromine, theophylline, nicotine and cotinine

Results for caffeine, theobromine, theophylline, nicotine and cotinine are reported in Table 1. They show a LOD of 0.1 ng/mg and LLOQ of 0.2 pg/mg for nicotine and cotinine; a LOD of 0.05 ng/mg and LLOQ of 0.1 pg/mg for caffeine, theobromine and theophylline. The fit of the 1/x weighted quadratic regression (analyte-to-IS peak area ratio versus theoretical concentration) was verified in hair for all the compounds. The coefficients of determination were superior to 0.99 for each calibration curve (from LLOQ to 20 ng/mg). Precision and accuracy were acceptable for all substances, meeting the criteria set: lower than 25% at LOQ and lower than 20% at other levels for both inter- and intra-day assays. No others drugs or toxics compounds (including natural alkaloid compounds) were detected in the 47 hair samples. The second dichloromethane bath tested negative for all compounds and for all samples.

Theobromine is more often detected than caffeine, which is itself more often detected than theophylline. In 53% of subjects (25/47) at least one of these substances was detected. Six subjects presented the 3 substances (12%). The subject presenting the highest concentration was the women buried with a teapot. The remains of tea leaf tested positive for caffeine (+++), theophylline (++) and theobromine (+), whereas her hair tested positive for these three substances but with a concentration of theobromine higher than that of theophylline. There was no relationship with the sex and age (15 women, 8 men and 2 children of undetermined sex including a 6-9 months old infant). Out of the two subjects anterior to 1700 that were analysed, only the individual from the late 17th century presented traces of theobromine; the other individual tested negative. Some 18th century subjects presented medium concentrations but three young women of the shaman series from the beginning of the 18th century in three different geographic zones had more than traces of the compounds[19].The subjects with the highest levels date from the 19th century.

Cotinine is more often detected than nicotine and 57% (27/47) of the subjects showed traces and/or non-negligible concentrations of one or two substances. 17 women, 9 men and one 6-9 months old child tested positive. 5/47 (68%) showed concentrations corresponding to regular or important use. 8/9 presented very low concentrations, the others had significant concentrations of the substances. Seven of the subjects found with a pipe had traces and/or significant concentrations of cotinine and/or nicotine, 3 had no traces.

34% (16/47) subjects had traces of tea and tobacco. The highest users of the two substances are from the 19th century, as high tea users were only found in the 19th century. Moderate tea users in the 19th century were also tobacco users. Two subjects, a brother and sister who died of smallpox at the same time during the first half of the 18th century were users of both substances, as were two shaman women, one of which was related to the siblings[2]. The brother is the first outlier detected in the series, he has a mongolian hairstyle which suggests contacts with the Khiarta trading post where tobacco was traded. He has a pipe of northern style with a its bowl made of mammoth ivory.

#Sample	Name	Datation_AD	SEX	AGE_class_2	pipe	chaman	Theobromine	Caffeine	Theophylline	Nicotine	Cotinine	GPS : DD Nord	GPS : DD Est
1	EletcheÕ 1	1700-1750	F	30-50			244	NA	NA	33	312	61.69805	131.21388
2	Oyogosse tumula 2 Sujet A	1850-1900	F	15-30			NA	NA	29	14	39	63.58639	119.12943
3	Sergueleakh	1700-1750	F	15-30			NA	NA	NA	68	39	61.99555	132.59888
4	Djoussulen	1600-1700	M	?			32	NA	NA	17	13	62.06361	132.66527
5	Tchenkeloeil	1850-1900	NA	0-15			251	NA	NA	25	28	62.55	117.44028
6	Oyogosse tumula 2 Sujet B	1850-1900	F	15-30	yes, import		13	26	18	NA	22	63.58639	119.12943
7	Ous sirÈ 1	1800-1850	M	15-30	yes		72	14	12	811	153	66.85055	131.75333
8	Kyys	1700-1750	F	15-30		yes	123	26	NA	801	201	62.03666	132.68638
9	Byljasyk 1	1800-1850	M	0-15			495	791	56	125	388	66.88417	131.85139
10	Tysarastaakh 2A	1700-1750	F	30-50			NA	NA	NA	13	31	66.89861	131.83888
11	Tysarastaakh 2E	1700-1750	M	0-15			38	51	19	NA	58	66.89861	131.83888
12	Arbre chamanique femme Sujet 2	1700-1750	F	15-30			103	55	NA	1196	702	62.04388	132.68611
13	Mounour urekh 1	1700-1750	M	>50			NA	NA	NA	126	195	62.06722	132.63916
14	Omouk 1	1800-1850	F	30-50	yes		4712	9304	1929	214	4528	64.14816	141.98561
15	Omouk 3	1800-1850	F	15-30			285	692	116	72	293	64.14870	141.98811
16	Sobolokh 1	1700-1750	F	30-50			NA	76	NA	32	15	63.42815	142.95097
17	Ebuguey 1	1700-1750	F	30-50			11	12	NA	20	10	63.41020	143.03763
18	Ken ÈbÈ 3	1850-1900	M	0-15			323	689	76	145	52	62.31778	133.51388
19	Batta tcharana	1600-1700	M	>50			207	15	NA	31	80	61.27666	132.85583
20	Atyyr meÕte 1	1700-1750	M	15-30			37	NA	NA	19	42	67.00861	133.0125
21	Kouranakh 1	1750-1800	M	15-30	yes		NA	14	27	84	728	67.22083	132.16222
22	Uettekh	1750-1800	F	0-15			NA	NA	NA	37	57	67.00361	133.02333
23	Arbre 2 (okht2)	1750-1800	F	>50			27	NA	NA	99	82	62.04388	132.68611
24	Mounour urekh 1 bis	1750-1800	F	>50	yes		NA	NA	NA	127	82	62.06805	132.64694
25	Targana 1	1800-1850	NA	0-15			49	NA	NA	NA	10	66.98611	132.98444
26	Arbre 1 Sujet3	1700-1750	F	30-50			219	48	42	89	89	62.04388	132.68611
27	Arbre 3	1700-1750	F	30-50	yes		124	16	NA	124	612	62.04166	132.69361
28	Bouogaryma 2	1750-1800	F	>50			17	30	NA	20	194	62.28555	132.83444
29	Arbre 1 Sujet 1	1700-1750	M	30-50	yes		NA	NA	NA	194	12055	62.04388	132.68611
30	Ordiogone 2	1750-1800	M	?			NA	NA	60	210	2083	63.57028	119.18389
31	Balaganakh 3	1850-1900	M	30-50			NA	17	10	21	46	63.28064	143.40828
32	Tomtor 2	1800-1850	M	15-30			75	55	19	NA	46	63.25023	143.13750
33	Touora urekh 1	1850-1900	F	30-50	yes		1716	4464	607	192	562	63.60080	142.50740
34	Tomtor 1	1750-1800	M	30-50			50	19	11	37	106	63.25023	143.13750
35	Kerdugen 1	1700-1750	M	15-30			228	252	57	66	313	67.17361	134.78583
36	Alyy	1700-1750	M	?	yes		270	61	112	42	173	67.14444	134.43916
37	Urun myran	1700-1750	M	30-50			NA	NA	NA	15	24	61.76972	130.89083
38	Ordiogone 1	1700-1750	M	>50			NA	NA	NA	28	67	63.57027	119.18388
39	Ottokh 2	1800-1850	F	>50			NA	15	NA	88	433	63.509067	118.713767
40	Boulgounniakh 2	1700-1750	F	30-50		yes	10	12	NA	46	40	61.96333	117.1375
41	Bakhtakh 1	1750-1800	F	>50	yes, peculiar		104	93	NA	628	14749	67.15444	134.52833
42	OtchugouÕ 1	1800-1850	F	30-50			82	NA	NA	66	100	61.70945	131.03111
43	Sordonokh 1	1700-1750	F	15-30		yes	387	19	NA	58	146	67.15527	132.07666
44	EletcheÕ 2	1700-1750	F	0-15		yes	84	NA	NA	92	92	61.70111	131.31444
45	Haras	1700-1750	F	0-15		yes	388	33	16	47	22	63.4975	118.765
46	Kureleekh 2	1700-1750	F	>50			NA	11	13	171	35	67.14916	132.5075
47	Ottokh 1	1800-1850	F	>50			NA	10	NA	249	126	63.50889	118.71362

Table 1: Table displaying levels of xenobiotic by analysed individuals alongside the available datations, age class and archæological data.

Anthracosis and emphysema

Eight lungs out of 14 present traces of anthracosis. There is no relationship with sex (5 women, 3 men), age (15 year olds present traces, some over 60 don't). Two subjects with very low levels of nicotine didn't show signs of anthracosis, while in two other subjects nicotine levels and presence/absence of anthracosis were in opposite directions. Baktah 1, an older women who was found with a unique model of pipe, is the only case with level of cotinine associated with the highest level of nicotine and died with anthracosis pigments associated with emphysema. Emphysema is a chronic lung disease characterized by enlargement of air spaces with destruction of alveolar walls. Anthracosis is observed in mummies from all historical periods and geographical, sometimes in 100% of cases[20]. Anthracosis is usually associated with the inhalation of smoke from solid fuel, in particular biomass (wood) and smoke from the use of an indoor open hearth[20]. The major cause of emphysema is smoking. The presence of anthracosis pigment (carbon pigment) is in favour of long-lasting tobacco smoke inhalation. Anthracosis pigments were observed in the lungs of the mummy in association with emphysema.

Consistency of the results

Our study is the first to analyse such a large number of hair samples collected in the minutes or hours following the excavation of frozen bodies. Posterior contaminations can be excluded, considering that the mean growth rate of human scalp hair is approximately 1 cm/month (range from 0.7 to 1.4 cm/month with a mean of about 1 cm/month accepted by the scientific community[21]). Our results are consistent: a teapot associated with the highest tea comsumer, the biggest smoker presenting pulmonay emphysema, presence of a pipe associated with smoking in 7 out of 9 cases. One of the methods of smoking in the 18th century used a Chinese "bubble pipe" and consisted in passing the pipe from one subject to the next. Pipes were therefore not systematically a personal object.

The measurement of nicotine concentration in hair can be an informative tool to assess tobacco smoke exposure (whether active or passive) and related illnesses. The main pitfall of nicotine hair concentration interpretation is the impossibility to discriminate between active and passive exposure[22]. Indeed, a positive result for nicotine in hair (usually greater than 0.2 ng/mg) could not confirm with any certainty an active use of nicotine by the deceased during their lifetime. Contamination from external sources cannot be ruled out, such as smoking by other members of the communities in which the deceased individuals lived. Several authors reported the inability of this method to differentiate active and passive exposure[23–25]. In fact, observed hair concentrations for smokers range usually between 0.4 and 11 ng/mg and between 0.9 and 11 ng/mg for nicotine and cotinine, respectively. But comparable hair values are reported in non-smoker populations, especially in the case of passive exposure[26]. All in all, the determination of nicotine (and/or continine) in mummy hair samples cannot definitely confirm active nicotine use during the lifetime of the deceased, as external contamination and exposure to second-hand smoke during the lifetime of the patients cannot be excluded[22].

Tea contains several 3-methylxanthines (caffeine, theophyline and theobromine) which are stimulants. Theophylline and theobromine hair concentrations generally range between 0.1 and 0.6 ng/mg and between 0.3 and 10 ng/mg, respectively[27]. In case of positive result for caffeine, theophylline or theobromine in hair (usually greater than 0.1 ng/mg), there is no data in the literature allowing us to assess the level of tea drinking by the subject.

B. *Statistical analyses*

1. Tea or Tobacco use over time

The only subsignificant association is for caffeine concentrations amongst time period.

a) *Tea associated xenobiotics*

Without imputations, with outliers

	Estimate	*Std. Error*	*z value*	*Pr(>|z|)*
(Intercept)	1.20658	1.33040	0.907	0.364
Theophylline	-0.04307	0.06443	-0.668	0.504
Theobromine	-0.01967	0.02078	-0.947	0.344
Caffeine	0.01933	0.01651	1.171	0.242

Without imputation, without outliers

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(>lzl)
(Intercept)	1.88041	2.35674	0.798	0.425
Theophylline	-0.09379	0.19470	-0.482	0.630
Theobromine	-0.01797	0.02169	-0.829	0.407
Caffeine	0.02421	0.02923	0.828	0.407

With imputations, with outliers

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(>lzl)
(Intercept)	-0.847279	0.483804	-1.751	0.0799
Theophylline	-0.022137	0.014181	-1.561	0.1185
Theobromine	-0.001457	0.004808	-0.303	0.7618
Caffeine	0.005451	0.003063	1.780	0.0751

With imputations, without outliers

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(>lzl)
(Intercept)	-0.125516	0.873265	-0.144	0.8857
Theophylline	-0.017203	0.028605	-0.601	0.5476
Theobromine	-0.007762	0.006084	-1.276	0.2020
Caffeine	0.007938	0.004168	1.904	0.0569

b) Tobacco associated xenobiotics

Without imputations, with outliers

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(>lzl)
(Intercept)	-0.9649	0.4054	-2.380	0.0173
Nicotine	0.00057	0.001.367	0.421	0.6738
Cotinine	-0.00009	0.0001.625	-0.583	0.5601

Without imputation, without outliers

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(>lzl)
(Intercept)	-1.0162648	0.4653205	-2.184	0.029
Nicotine	0.0008032	0.0014906	0.539	0.590
Cotinine	-0.0008649	0.0015702	-0.551	0.582

With imputations, with outliers

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(>lzl)
(Intercept)	-0.7589196	0.3757101	-2.020	0.0434
Nicotine	0.0005511	0.0013445	0.410	0.6819
Cotinine	-0.0001195	0.0001691	-0.707	0.4797

With imputations, without outliers

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(>lzl)
(Intercept)	-0.728616	0.430330	-1.693	0.0904 .
Nicotine	0.001037	0.001498	0.692	0.4887
Cotinine	-0.001570	0.001920	-0.817	0.4137

2. Social status vs Hair Residues

The only subsignificant association is for Theobromine.

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(>|z|)
(Intercept)	-2.121772	1.161690	-1.826	0.0678
Theobromine	0.014519	0.008582	1.692	0.0907
Theophylline	-0.039655	0.047568	-0.834	0.4045
Caffeine	-0.007103	0.006212	-1.143	0.2528
Nicotine	0.002124	0.002538	0.837	0.4026
Cotinine	-0.004708	0.005562	-0.846	0.3973

3. Gender vs Hair Residues

a) Before 1800

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(>|z|)
(Intercept)	-0.0627080	0.8165486	-0.077	0.939
Theobromine	-0.0003670	0.0044932	-0.082	0.935
Theophylline	-0.0065332	0.0176749	-0.370	0.712
Caffeine	0.0021683	0.0026033	0.833	0.405
Nicotine	-0.0051899	0.0069626	-0.745	0.456
Cotinine	0.0002636	0.0006640	0.397	0.691

b) After 1800

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(>|z|)
(Intercept)	-8.169820	7.229920	-1.130	0.258
Theobromine	0.076908	0.062876	1.223	0.221
Theophylline	0.009191	0.040560	0.227	0.821
Caffeine	-0.027589	0.024864	-1.110	0.267
Nicotine	0.031000	0.029524	1.050	0.294
Cotinine	-0.028310	0.025701	-1.102	0.271

4. Age classes co-correlations

Correlation coefficient values between Nicotine and Cotinine levels are given in 2 within each of the the age class group. Comparison of correlation between age classes are given in Table 3. The most significant difference is between young (0-15 years old) and the second adult quartile (30-50 yeas old), the difference with older people being mainly the result of one heavy smoker.

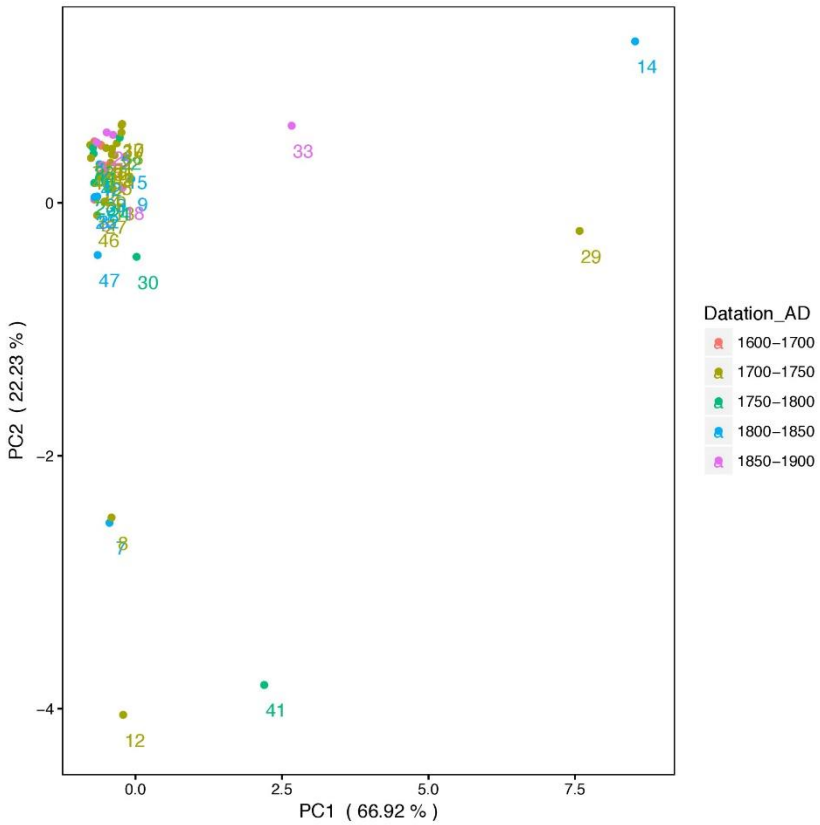
	0-15 y/o	15-30 y/o	30-50 y/o	> 50 y/o
With outliers	0.2883401	0.4202312	0.6623275	0.9183372
Without outliers	0.2883401	0.4202312	0.7315768	-0.1123998

Table 2: Correlation coefficients between Nicotine and Cotinine levels amongst age class

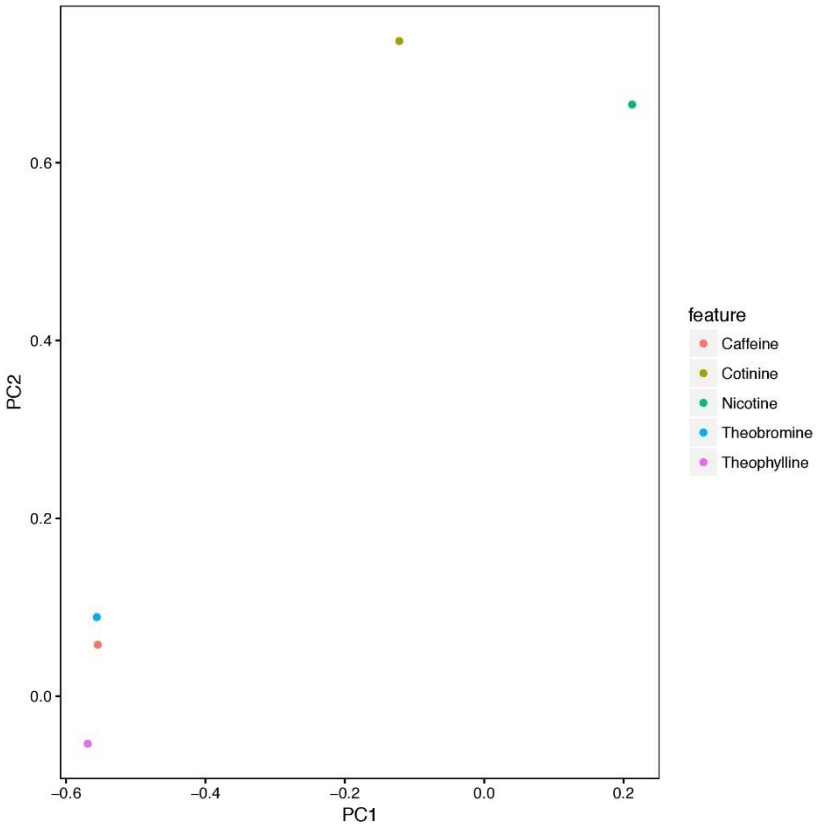
	Comparison	N1 / N2	Fischer's Z	p-value	Zou's C.I.
With outliers	*0-15 vs 15-30*	8 / 12	-0.2711	0.3932	-1.0277 ; 0.6904
	0-15 vs 30-50	8 / 14	-0.9274	0.1769	-1.2142 ; 0.3326
	0-15 vs over 50	8 / 10	-2.1887	0.0143	-1.4432 ; -0.0443
Without outliers	*0-15 vs 15-30*	8 / 12	-0.2711	0.3932	-1.0277 ; 0.6904
	0-15 vs 30-50	8 / 11	-1.1145	0.1325	-1.2769 0.2884
	0-15 vs over 50	8 / 9	0.6765	0.7506	-0.6761 1.2136

Table 3: Co-correlation between children and the three other age classes taking or not into accound the outliers.

IV. SUPPLEMENTARY FIGURES



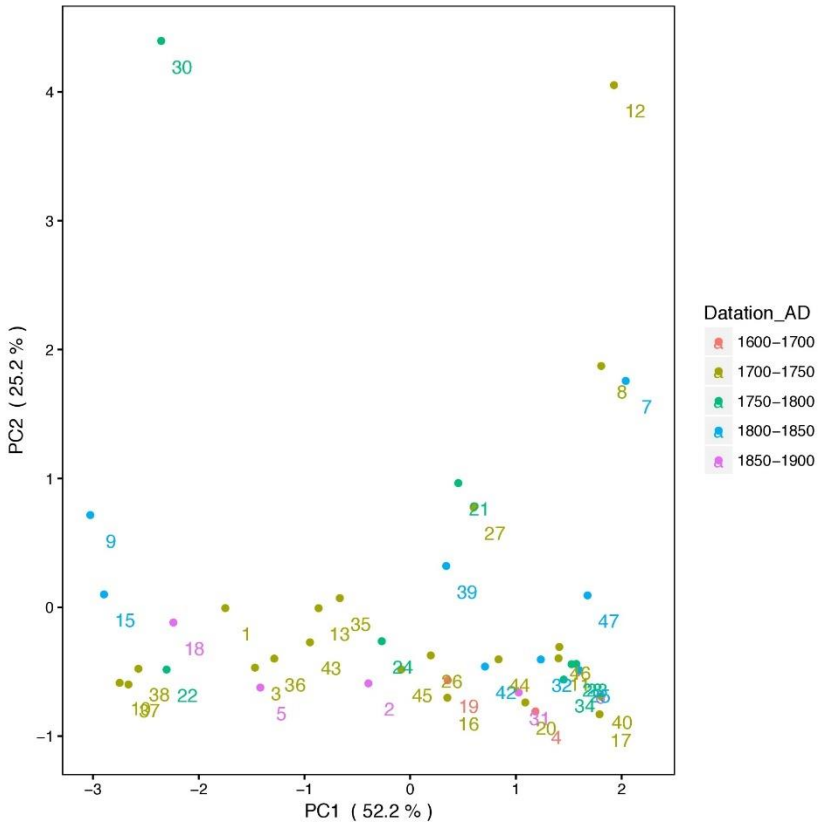
1.



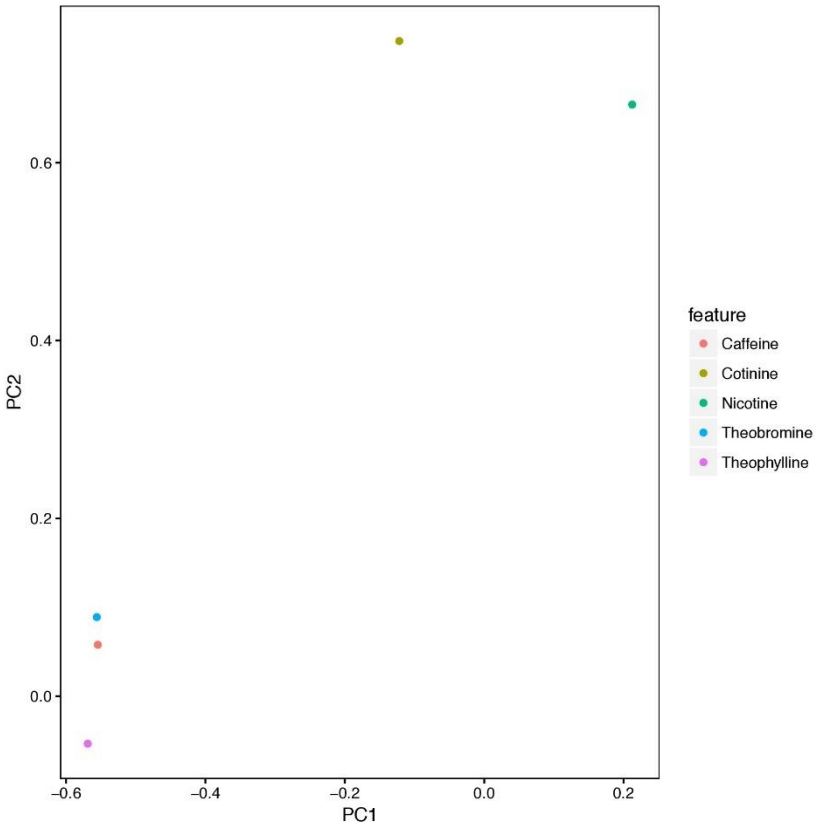
3.

Figure 1: Principal Component Analysis on xenobiotic concentrations.

1. *PCA with outliers*
2. *PCA without outliers*
3. *Contribution of each xenobiotic to PCA classification (without outliers)*


Datation_AD
1600–1700
1700–1750
1750–1800
1800–1850
1850–1900
PC1 (52.2 %)
PC2 (25.2 %)

2.



3.

Figure 1: Principal Component Analysis on xenobiotic concentrations.

1. *PCA with outliers*
2. *PCA without outliers*
3. *Contribution of each xenobiotic to PCA classification (without outliers)*

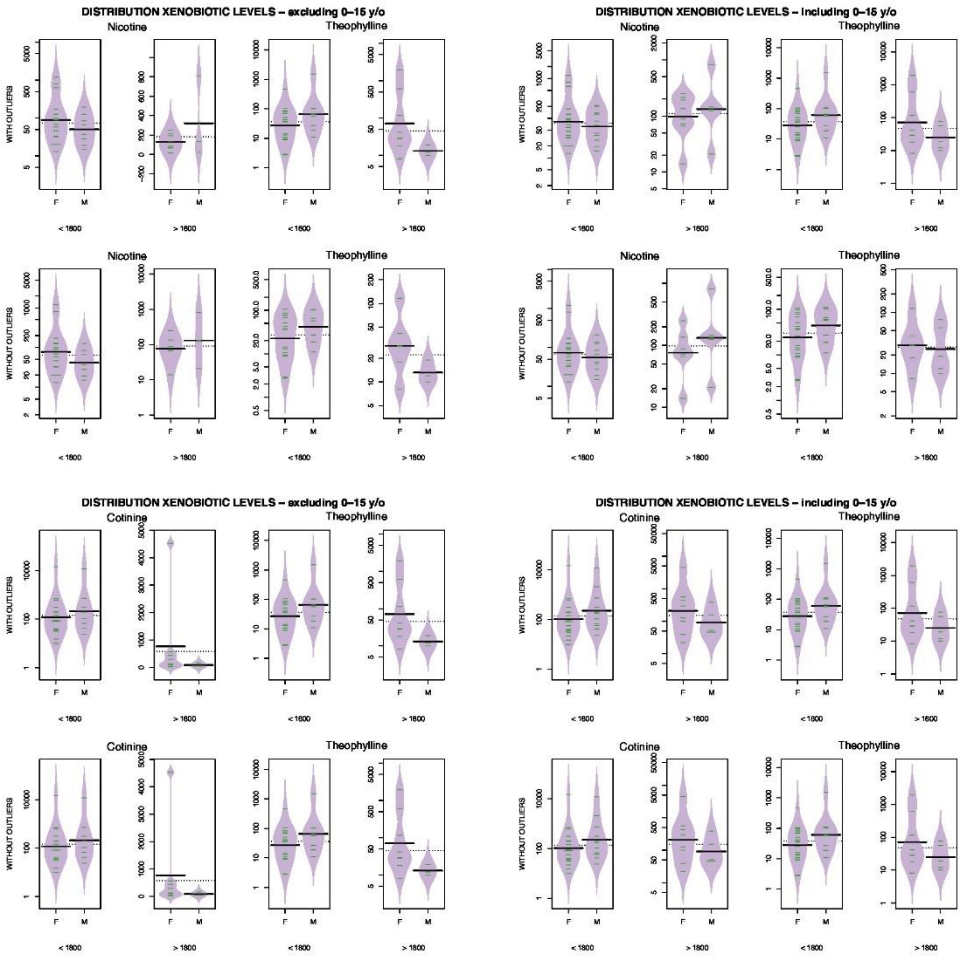


Figure 2: Distribution of xenobiotic hair level over time and gender.

Above: Nicotine vs Theophylline

Below: Cotinine vs Theophylline

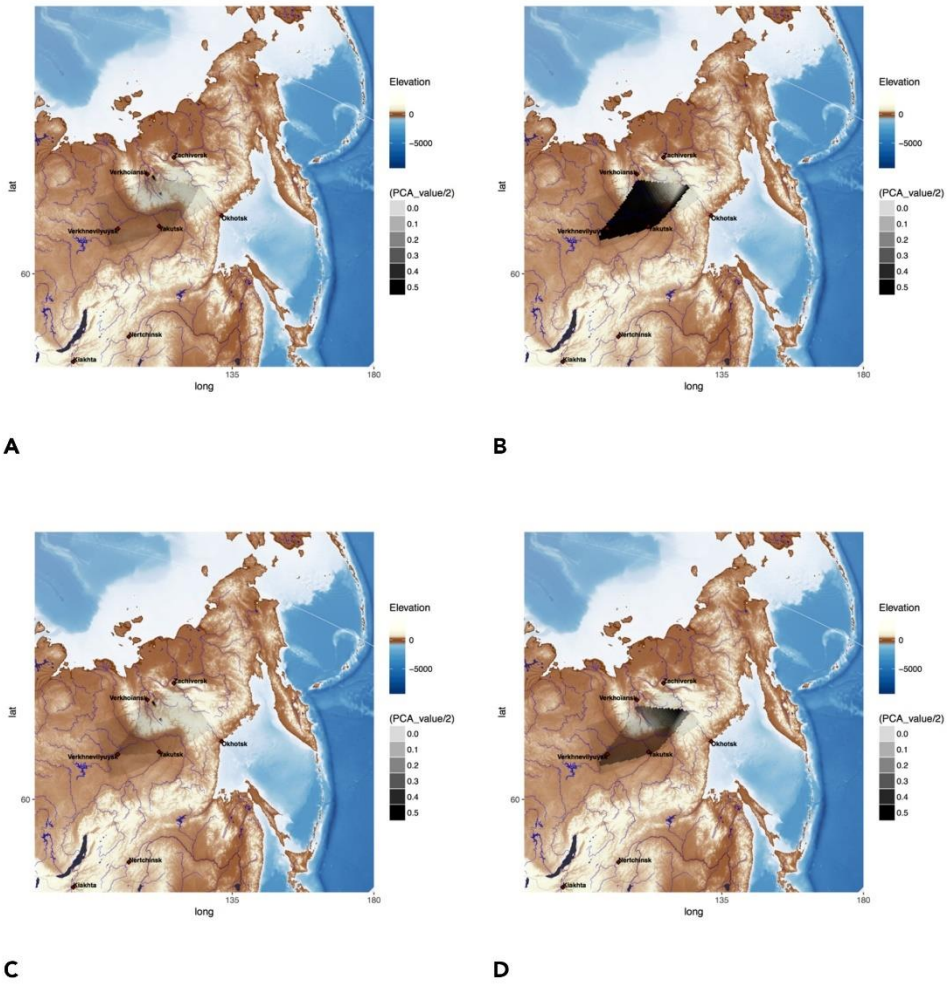


Figure 3: Maps displaying Principal Component Analysis gradients overlaid with geographical data of the studied area.

A. Tea, before 1800

B. Tea, after 1800

C. Tobacco, before 1800

D. Tobacco, after 1800

V. SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Zvénigorosky V, Crubézy E, Gibert M, et al. The genetics of kinship in remote human groups. Forensic Sci Int Genet [Internet] 2016;25:52–62. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497316301387
2. Zvenigorosky V, Duchesne S, Gerard P, et al. Relationships between clans and genetic kin explain cultural similarities over vast distances: the case of Yakutia. bioRxiv [Internet] 2017 [cited 2018 Jun 27];168658. Available from: https://www.biorxiv.org/content/early/2017/07/26/168658
3. Pichini S, Altieri I, Pellegrini M, Pacifici R, Zuccaro P. Hair analysis for nicotine and cotinine: Evaluation of extraction procedures, hair treatments, and development of reference material [Internet]. In: Forensic Science International. 1997 [cited 2018 Jun 27]. p. 243–52.Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073896020683
4. Mahoney GN, Al-Delaimy W. Measurement of nicotine in hair by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. J Chromatogr B Biomed Sci Appl [Internet] 2001 [cited 2018 Jun 27];753(2):179–87. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434700005405
5. Musshoff F, Fels H, Carli A, Piombino-Mascali D. The anatomical mummies of Mombello: detection of cocaine, nicotine, and caffeine in the hair of psychiatric patients of the early 20th century. Forensic Sci Int [Internet] 2017 [cited 2018 Jun 27];270:20–4. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037907381630487X
6. Dulaurent S, Gaulier JM, Imbert L, Morla A, Lachâtre G. Simultaneous determination of δ9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol, cannabinol and 11-nor-δ9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Forensic Sci Int [Internet] 2014 [cited 2018 Jun 27];236:151–6. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037907381400019X
7. Maublanc J, Dulaurent S, Morichon J, Lachâtre G, Gaulier J michel. Identification and quantification of 35 psychotropic drugs and metabolites in hair by LC-MS/MS: application in forensic toxicology. Int J Legal Med [Internet] 2015 [cited 2018 Jun 27];129(2):259–68. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00414-014-1005-1
8. Boumrah Y, Humbert L, Phanithavong M, Khimeche K, Dahmani A, Allorge D. In vitro characterization of potential CYP- and UGT-derived metabolites of the psychoactive drug 25B-NBOMe using LC-high resolution MS. Drug Test Anal [Internet] 2016 [cited 2018 Jun 27];8(2):248–56. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/dta.1865
9. Kintz P, Richeval C, Jamey C, et al. Detection of the designer benzodiazepine metizolam in urine and preliminary data on its metabolism. Drug Test Anal [Internet] 2017 [cited 2018 Jun 27];9(7):1026–33. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/dta.2099
10. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. Forensic Sci Int [Internet] 2007 [cited 2018 Jun 27];165(2–3):216–24. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073806003239
11. Musshoff F, Madea B. New trends in hair analysis and scientific demands on validation and technical notes. Forensic Sci Int [Internet] 2007 [cited 2018 Jun 27];165(2–3):204–15. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073806003227
12. Antignac JP, De Wasch K, Monteau F, De Brabander H, Andre F, Le Bizec B. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis [Internet]. In: Analytica Chimica Acta. Elsevier;

2005 [cited 2018 Jun 27]. p. 129–36.Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267004011158
13. Mekota A-M, Vermehren M. Determination of optimal rehydration, fixation and staining methods for histological and immunohistochemical analysis of mummified soft tissues. Biotech Histochem [Internet] 2005 [cited 2018 Jun 27];80(1):7–13. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10520290500051146
14. Husson F, Josse J. Handling missing values in multiple factor analysis. 2013 [cited 2018 Jun 14];Available from: https://ac.els-cdn.com/S0950329313000700/1-s2.0-S0950329313000700-main.pdf?_tid=2cf8605b-0ee3-439f-9a87-4e3995c8562f&acdnat=1528985197_39a8707632ab3a23dc7006db2723f021
15. Josse J, Husson F. missMDA : A Package for Handling Missing Values in Multivariate Data Analysis. J Stat Softw [Internet] 2016;70(1):1–31. Available from: http://www.jstatsoft.org/v70/i01/
16. Zou GY. Toward Using Confidence Intervals to Compare Correlations. Psychol Methods 2007;12(4):399–413.
17. Diedenhofen B, Musch J. Cocor: A comprehensive solution for the statistical comparison of correlations. PLoS One [Internet] 2015 [cited 2018 Jun 28];10(4):e0121945. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0121945
18. Akima H. Algorithm 761; scattered-data surface fitting that has the accuracy of a cubic polynomial. ACM Trans Math Softw [Internet] 1996 [cited 2018 Jun 14];22(3):362–71. Available from: http://portal.acm.org/citation.cfm?doid=232826.232856
19. Crubézy E, Nikolaeva D. Vainqueurs ou vaincus ? [Internet]. Paris: Odile Jacob; 2017. Available from: zn
20. Walker R, Parsche F, Bierbrier M, McKerrow JH. Tissue identification and histologic study of six lung specimens from Egyptian mummies. Am J Phys Anthropol [Internet] 1987 [cited 2018 Jul 3];72(1):43–8. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/ajpa.1330720106
21. Pecoraro V, Astore IPL. Measurements of Hair Growth Under Physiological Conditions [Internet]. In: Hair and Hair Diseases. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1990 [cited 2018 Jun 27]. p. 237–54.Available from: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-74612-3_10
22. Musshoff F, Brockmann C, Madea B, Rosendahl W, Piombino-Mascali D. Ethyl glucuronide findings in hair samples from the mummies of the Capuchin Catacombs of Palermo. Forensic Sci Int [Internet] 2013 [cited 2018 Jun 27];232(1–3):213–7. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073813003770
23. Haley NJ, Hoffmann D. Analysis of nicotine and cotinine in hair to determine cigarette smoker status. Clin Chem [Internet] 1985 [cited 2018 Jun 27];31(10):1598–600. Available from: http://clinchem.aaccjnls.org/content/31/10/1598.short
24. Kintz P. Gas chromatographic analysis of nicotine and cotinine in hair. J Chromatogr B Biomed Sci Appl [Internet] 1992 [cited 2018 Jun 27];580(1–2):347–53. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037843479280542X
25. Al-Delaimy WK, Crane J, Woodward A. Questionnaire and hair measurement of exposure to tobacco smoke. J Expo Anal Environ Epidemiol [Internet] 2000 [cited 2018 Jun 27];10(4):378–84. Available from: https://www.nature.com/articles/7500102
26. Al-Delaimy WK. Hair as a biomarker for exposure to tobacco smoke. Tob Control [Internet] 2002 [cited 2018 Jun 27];11(3):176–82. Available from: http://tobaccocontrol.bmj.com/content/11/3/176.short
27. Tracqui A, Kintz P, Mangin P. Hair analysis: a worthless tool for therapeutic compliance monitoring. Forensic Sci Int [Internet] 1995 [cited 2018 Jun 27];70(1–3):183–9. Available from:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037907389401626G

Camille RICHEVAL
Thèse pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Lille - Spécialité : Sciences biologiques
2018

Titre : Développement d'outils analytiques de mise en évidence de biomarqueurs d'une exposition aux nouvelles substances psychoactives (NPS) : approches *in vivo, in silico, in vitro*

Résumé :
En raison de leur diffusion sauvage sur le e-commerce, leur soi-disant sécurité d'usage et l'alternative légale aux stupéfiants habituels qu'ils constituent, les nouvelles substances psychoactives (NPS) sont un phénomène mondial émergeant. Au-delà de différents défis dans nos sociétés (législation, prévention,...), la capacité d'identifier les NPS dans des échantillons biologiques présente de nombreux challenges analytiques : ces nouvelles substances ne sont pas référencées dans les bibliothèques habituelles de spectrométrie de masse commerciales, leur métabolisme est inconnu (avec parfois des métabolites actifs), les doses actives sont parfois très faibles et par conséquent, les concentrations dans le sang ou l'urine sont également faibles. Dans ce contexte, notre laboratoire effectue régulièrement des analyses toxicologiques dans un contexte clinique, et pour les forces de l'ordre, dans des échantillons biologiques à l'aide de deux principaux types d'analyseurs : la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem (CL-SM/SM) pour le criblage ciblé et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (CL-SMHR) pour le criblage non ciblé. Cette dernière technique est basée sur la masse exacte (mais également, le profil isotopique et le temps de rétention) des composés de l'échantillon à partir de laquelle la formule chimique est déterminée et recherchée dans une base de données spectrales en utilisant un logiciel dédié. L'objectif de ma thèse est de caractériser des NPS et leurs métabolites (afin d'alimenter cette base de données) en utilisant une stratégie combinant des approches *in vitro*, *in silico* et *in vivo*. Il s'agit, en particulier, d'augmenter la sensibilité de détection de la prise de NPS en se focalisant sur les métabolites qui sont le plus souvent les produits majeurs d'élimination des NPS.
A cet effet, une méthode *in vitro* destinée à produire les métabolites des NPS et utilisant des microsomes hépatiques humains a été mise en œuvre. Les métabolites obtenus, comparés aux prédictions *in silico*, ont été enregistrés dans la base de données. Cette approche a été confrontée à l'analyses de comprimés et d'autres produits non biologiques contenant des NPS, mais également, à des données *in vivo* d'exposition aux NPS : cas d'intoxications, études expérimentales et études épidémiologiques prospectives et rétrospectives dans des populations ciblées, ou non…
Au total, ce travail basé sur cette stratégie *in vitro, in silico, in vivo* m'a permis d'enrichir notre base de données de spectres de masse haute résolution (SMHR) pour le criblage non ciblé et également notre base de données de criblage ciblé (SM/SM). Notre méthode en haute résolution, qui s'est enrichie au cours de ces 3 années de thèse de 83 nouveaux NPS et 281 métabolites, constitue aujourd'hui un outil analytique efficient pour la détection d'une exposition aux NPS.

Mots clés : Nouvelles substances psychoactives (NPS), approches *in vitro*, *in silico*, *in vivo*, chromatographie liquide coupée à la spectrométrie de masse haute résolution (CL-SMHR)

Title: Development of analytical tools for biomarkers detection of exposure to new psychoactive substances (NPS): *in vivo, in silico, in vitro* approaches

Abstract:
Owing to wild e-commerce diffusion, alleging safety and legal alternative to usual drugs of abuse arguments, the new psychoactive substances (NPS) are emerging phenomenon in the world. In our societies, through various consecutive challenges (legislation, prevention, …), the ability to identify NPS in biological samples exhibits numerous analytical pitfalls: new substances which are not referenced in the usual commercial mass spectrometric libraries, unknown metabolism (with sometimes active metabolites), sometimes very low active dosages and consecutively low concentrations in blood or urine. In this context, clinical and forensic toxicological analyses in biological samples are routinely performed in our laboratory using two main analytical devices: liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for targeted screening and liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) for non-targeted screening. This last technique is based on the accurate mass (together with isotopic pattern and retention time) of sample components, from which the chemical formula is calculated and searched against a database of mass spectra using dedicated software. The aim of my thesis is to characterize NPS and metabolites (in order to increase the spectral database) using a strategy combining *in vitro*, *in silico*, and *in vivo* approaches. Therefore, the main goal is to increase the detection sensitivity of the NPS use by focusing on the metabolites that are most often the major products of NPS elimination.
For this purpose, an *in vitro* method designed to produce NPS metabolites using human liver microsomes incubations was applied. Obtained metabolites, after confrontation with metabolites *in silico* predicted, were saved in database. This approach was subsequently confronted with analysis of tablets or other non-biological product containing NPS, but also, with *in vivo* observed data from NPS exposure: intoxication cases, experimental studies and prospective and retrospective epidemiological studies in targeted population or not …
All in all, this work based on this *in vitro*, *in silico* and *in vivo* strategy allowed me to enhance our high resolution spectra database (HRMS) for non-targeted screening and also our spectra database for targeted screening (MS/MS). Today, our HRMS device, with a database that was increased with 83 new NPS and 281 metabolites for the duration of my thesis, is an efficient analytical tool for NPS use detection.

Keywords: new psychoactive substances (NPS), *in vitro*, *in silico*, *in vivo* approaches, liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-SMHR)