

UNIVERSITE DE LILLE
Ecole Graduée Biologie Santé

THESE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Mention : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

ENDOCANNABINOÏDES ET CANNABINOÏDES

BIOMARQUEURS, MATRICES ALTERNATIVES, METHODES
ALTERNATIVES DE PRELEVEMENT ET APPLICATIONS EN TOXICOLOGIE
BIOLOGIQUE ET MEDICOLEGALE

Soutenue publiquement le 11 décembre 2025

Par **Alexandr GISH**
né le 22 février 1995

Jury :

PELISSIER-ALICOT Anne-Laure , Professeur à l'Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
MEGARBANE Bruno , Professeur à l'Université de Paris Cité	Rapporteur
DELBAERE Stéphanie , Professeur à l'Université de Lille	Membre du jury
CARRIERI Patrizia , Docteur à l'Université d'Aix-Marseille	Membre du jury
KINTZ Pascal , Professeur conventionné à l'Université de Strasbourg	Membre du jury
GAULIER Jean-michel , Docteur au CHU de Lille	Directeur de Thèse

Remerciements

Je remercie les membres du jury de thèse de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail. Je remercie Madame le Professeur Anne-Laure PELISSIER-ALICOT, Madame le Professeur Stéphanie DELBAERE, Madame le Docteur Patrizia CARRIERI, Monsieur le Professeur Bruno MEGARBANE et Monsieur le Professeur Pascal KINTZ d'avoir accepté de juger mes travaux.

Je remercie Monsieur le Docteur Jean-Michel GAULIER pour avoir accepté de m'encadrer sur ce projet, pour votre suivi, vos conseils et tout le temps que vous avez investi dans ce travail. Je vous remercie également de m'avoir toujours soutenu sur le plan professionnel, ainsi que sur le plan personnel.

Je remercie Madame le Professeur Claire-Marie DHAENENS de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer votre service de Toxicologie et Génopathies en tant qu'Interne, puis en tant qu'Assistant.

Je tiens à remercier Madame le Professeur Delphine ALLORGE de m'avoir accueilli dans votre laboratoire de Toxicologie, qui m'a permis de trouver ma vocation.

Je remercie Monsieur le Docteur Jean-Marc LO-GUIDICE de m'avoir accueilli dans son équipe de recherche IMPECS (ULR4483) « Impact de l'environnement chimique sur la santé », ainsi que toute l'équipe d'IMPECS.

Je remercie Monsieur le Professeur Guillaume GARÇON et Madame le Docteur Anne GARAT de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de toxicologie et santé publique de la Faculté de Pharmacie de Lille. Merci également aux collègues enseignants.

Je remercie Madame le Docteur Camelia PROTOPOPESCU, Monsieur le Docteur Tangui BARRE, Madame Eqbal RADWAN et toute l'équipe SESSTIM de leur aide et le travail dans le cadre du protocole « ELICSIR ».

Je tiens également à remercier au travers de ce manuscrit Monsieur le Docteur Damien DEVAULT, porteur du protocole « Chasse-Marée », l'Université de Mayotte et l'ARS de Mayotte.

Je remercie Madame le Docteur Myriam BERTRAND-NDOYE, Monsieur le Docteur Hugo GIRARD et toute l'équipe de IML du CHU de Lille pour leur investissement dans le protocole « IN CADAVER ».

Je tiens à remercier également Monsieur le Docteur Florian HAKIM, Monsieur le Docteur Corentin GRENIER, Madame le Docteur Marie LENSKI, Monsieur le Docteur Benjamin HENNART, Monsieur le Docteur Nicolas BEAUVAL, Monsieur Jean-François WIART, Monsieur Luc HUMBERT, Madame le Docteur Camille RICHEVAL, Madame Linda BOONE, Madame Virginie CLIN, Madame Mélodie NACHON, Madame Marie CUGIER et tout le personnel du laboratoire de toxicologie du CHU de Lille dans l'ensemble de m'avoir soutenu durant la préparation de ma thèse et également pour toutes les connaissances pratiques qu'ils m'ont apporté.

Je remercie l'ensemble des Internes de biologie, les externes et les stagiaires du service de toxicologie pour leur aide dans l'accomplissement de ce travail,

J'adresse également tous mes remercîments :

A ma compagne, Lia, de m'avoir soutenu dans ce projet de thèse et de son encouragement tout au long de ces années,

A mes parents de pouvoir m'offrir la possibilité de faire mes études supérieures et leur soutien,

A mes sœurs, Anastassiya et Alissiya, pour leurs présences et la joie qu'elles m'ont apporté,

A toute ma famille avec toute mon affection,

A ma belle-famille avec toute mon amitié,

A mes amis Malo, Thibault, Avand, Hashmee, Omar, Raza, Marc, Gyanish, Ryane, Caroline et tous mes autres amis de la faculté, de la résidence et de l'Internat pour avoir partagé des magnifiques moments ensemble.

Table des matières

Liste des figures	5
Liste des tableaux	6
Abréviations	7
Travaux en lien avec la thèse	9
Publications	9
Communications.....	10
I - INTRODUCTION	13
II - RAPPELS	15
II.1 Endocannabinoïdes	15
II.2 Phytocannabinoïdes	16
II.3 Cannabinoïdes de synthèse et d'hémisynthèse	18
III - TRAVAUX ANALYTIQUES.....	21
III.1 Dosage des endocannabinoides plasmatiques	21
<i>III.1.1 Discussion (intérêt et limites) de cette méthode</i>	21
III.2 ECS et phytocannabinoïdes sur DBS	23
<i>III.2.1 Discussion (intérêt et limites) de cette méthode</i>	24
III.3 Développement de dosage des endocannabinoïdes dans les cheveux	26
<i>III.3.1 Paramètres pré-analytiques et analytiques de dosage des endocannabinoïdes dans les cheveux</i>	26
<i>III.3.2 Optimisation de la méthode</i>	27
<i>III.3.3 Discussion</i>	30
III.4 Exploration métabolique in silico : prédiction structurale et de temps de rétention par utilisation de logiciels, programmation et deep learning.....	31
<i>III.4.1 Exploration métabolique in vitro : exemple MDMB-INACA</i>	31
<i>III.4.2 Exploration métabolique in silico</i>	33
<i>III.4.2.1 Récupération de structure chimique.....</i>	33
<i>III.4.2.2 Prédiction des métabolites</i>	33
<i>III.4.2.3 Prédiction des métabolites</i>	34
<i>III.4.2.4 Prédiction de temps de rétention</i>	34
<i>III.4.2.5 Exploitation des résultats sur MS-DIAL et création du réseau moléculaire</i>	36
<i>III.4.3 Discussion et les limites.....</i>	38
IV – TRAVAUX APPLICATIFS	39
IV.1 ELICSIR.....	39
<i>IV.1.2 Résultats préliminaire du projet ELICSIR</i>	41
<i>IV.1.2.1 Endocannabinoïdes et guérison VHC.....</i>	41
<i>IV.1.2.2 Phytocannabinoïdes dans la population co-infectée VIH-VHC</i>	43
<i>IV.1.2.3 Consommation de cannabis et endocannabinoïdes</i>	45

<i>IV.1.2.4 Phytocannabinoïdes, endocannabinoïdes et interleukines</i>	46
IV.2 CHASSE-MAREE	49
<i>IV.2.1 Etude <i>in vitro</i> et <i>in silico</i> du métabolisme des cannabinoïdes de synthèse</i>	51
<i>IV.2.2 Discussion et les limites</i>	52
IV.3 Protocole « IN CADAVER »	54
<i>IV.3.1 Résultats de dosage des ECs du protocole « IN CADAVER ».....</i>	55
VI – SYNTHESE, PERSPECTIVES ET CONCLUSION.....	57
Références	59
Publications.....	67
Article 1.....	67
Article 2.....	68
Article 3.....	69
Article 4.....	70
Article 5.....	71
Article 6.....	72
Article 7.....	73
Article 8.....	74
Article 9.....	116
Article 10.....	117
Article 11.....	118
Article 12.....	119

Liste des figures

Figure 1: Comparaison des résultats de THC, THC-OH et THC-COOH entre la méthode de dosage sur le sang total et le dépôt du DBS	25
Figure 2: Pics de AEA et de 2-AG / 1-AG obtenues avec 20mg des cheveux l'extraction méthanolique avec l'analyse directe de sur l'extrait (A), l'extraction méthanolique suivi d'un séchage de 500 µL et une reprise par 200 µL d'eau MilliQ® suivi d'une extraction LLE (B) et l'extraction SPE avec une élution par toluène (C).....	28
Figure 3: Résultats des essais des solutions d'élution de l'extraction SPE avec du méthanol (MeOH), du méthanol avec 1 % d'acide formique (MeOH + 1% AF), du toluène (Tol), des mélanges toluène/méthanol 50/50 (Tol-MeOH 1 :1) ; 75/25 (Tol-MeOH 3 :1), 25/75 (Tol-MeOH 1 :3) v/v, de l'acetonitrile (ACN) et de l'acetonitrile avec 1% d'acide formique (ACN + 1% AF).....	29
Figure 4: Interface de programmation de l'outil de prédition	33
Figure 5: Extrait du fichier des prédictions de la structure des métabolites du MDMB-INACA	34
Figure 6: Comparaison du temps de rétention prédit et mesuré pour 1 000 molécules (a) et spécifiquement pour les cannabinoïdes de synthèse (b).....	35
Figure 7: Pharmacophore des SCRA au travers de la structure de JWH-018.....	36
Figure 8: Extrait du fichier final des prédictions	36
Figure 9: Réseau moléculaire généré par le logiciel MS-Dial (en haut) et MetGem (en bas).....	37
Figure 10: Résultats finaux récupérés à partir de logiciel MS-Dial	38
Figure 11: Analyse en composante principale des concentrations en endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like	42
Figure 12: Comparaison des concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes et d'endocannabinoïdes-like avant (groupe 1) et après (groupe 2) guérison de VHC	43
Figure 13 : Molécules les plus fréquemment retrouvées dans les prélèvements positifs au Δ9-THC et/ou ses métabolites.....	44
Figure 14: Comparaison des concentrations plasmatiques de TNF-alpha chez les sujets avant la guérison du VHC, entre les échantillons négatifs au THC-COOH et les échantillons positifs en THC-COOH (concentration en THC-COOH libre inférieur à 50 µg/L).	46
Figure 15: Corrélation entre les concentrations plasmatiques de THC-COOH libre (inférieures à 50 µg/L) et de TNF-alpha dans les échantillons avant la guérison du VHC.....	47
Figure 16: Corrélations entre les endocannabinoïdes (AEA et 2-AG/1-AG) et les cytokines (IL10, TNF-alpha et IL6).	47
Figure 17: Comparaison des concentrations en IL-10 et TNF-alpha avant (groupe 1) et après (groupe 2) la guérison du VHC.....	48
Figure 18 : Comparaison des concentrations d'OEA et de PEA entre T1 et T2.....	56

Liste des tableaux

Tableau 1: Gradient de séparation chromatographique	32
Tableau 2 : Concentrations plasmatiques des endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like obtenues à partir des échantillons du protocole ELICSIR.....	41
Tableau 3 : Présence de $\Delta 9$ -THC et métabolites dans la population étudiée avant (groupe 1) et après (groupe 2) de la guérison de VHC.....	44
Tableau 4 : Proportions des échantillons comportant les éléments d'intérêt par campagne (Vert : >50%, Orange : entre 20% et 50% ; Orange clair : entre 10% et 20% ; Jaune : <10%)	50
Tableau 5: Transformations majoritaires retrouvées après l'étude de métabolisme <i>in silico</i> et <i>in vitro</i> . [% aire d'intensité : pourcentage de rapport des aires des métabolites vs l'aire de la molécule mère respective]	51
Tableau 6: Comparaison des concentrations en endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like retrouvées dans l'étude "IN CADAVER" en comparaison avec les résultats de littérature.	55

Abréviations

11-OH THC : 11-hydroxy - Δ9-tétrahydrocannabinol

1-AG : 1-arachidonoylglycérol

2-AG : 2-arachidonoylglycérol

AEA : arachidonoyléthanamide ou anandamide

CB : récepteur cannabinoïde

CBD : cannabidiol

CHS : cannabinoïdes hémi-synthétiques

CL-SMHR : chromatographie liquide avec détection par spectrométrie de masse haute résolution

CL-SM/SM : chromatographie liquide avec détection par spectrométrie de masse en tandem

CRP : protéine C réactive

CUFR : Centre Universitaire de Formation et de Recherche de Mayotte

Δ9-THC : Δ9-tétrahydrocannabinol

Δ8-THC : Δ8- tétrahydrocannabinol

DBS : dried blood spot

DPM : délai post-mortem

ECs : molécules endocannabinoïdes et molécules endocannabinoïdes-like

ESI : électrospray

ETGS : éthylglucuronide

EUDA : European Union Drugs Agency, anciennement l'EMCDDA

FAAH : fatty acid amide hydrolase

GPR : G protein-coupled receptor

HHC : hexahydrocannabinol

HLMs : microsomes hépatiques humain

HOMA – IR : homeostasis model assessment – insulinorésistance

IL-10 : interleukine-10

IL-1beta : interleukine-1 beta

IL-6 : interleukine-6

IR : insulinorésistance

JAVA script : langage de programmation

LLE : l'extraction liquide-liquide

LLOD : limite de détection basse

LLOQ : limite basse de quantification

[M+H]⁺ : ion pseudomoléculaire protoné

MAGL : monoacylglycerol lipase

MPNN-RT : Message-passing neural network-retention time

NPS : nouveaux produits de synthèse

OEA : N-oleoyléthanolamine

OFDT : Observatoire français des drogues et toxicomanies

PBS : tampon phosphate salin

PEA : N-palmitoyléthanolamide

POPAM : Prévention et soin des addictions de Mayotte

PPAR : peroxisome proliferator-activated receptors

Python : langage de programmation

QTOF : spectromètre de masse quadripolaire à temps de vol

SCRAs : Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists ou cannabinoïdes de synthèse

script shell ou BASH : interpréteur de commandes interactif et langage de programmation développé pour les systèmes d'exploitation de type Unix

SFTA : Société Française de Toxicologie Analytique

SMILES : Simplified Molecular Input Line Entry System, un langage symbolique de description des molécules chimiques sous forme de courtes chaînes de caractères

SNC : système nerveux centrale

SPE : extraction en phase solide

THC-COOH : 11-nor-9-carboxy- Δ 9-tétrahydrocannabinol

TNF-alpha : Facteur de Nécrose Tumorale alpha

ToxAC : revue Toxicologie Analytique et Clinique

TRPV1 : transient receptor potential vanilloid 1

UNODC : Office des Nations Unies contre la Drogue et le Crime

VAMS : dispositifs de collecte de micro-échantillons

VEA : vaccenic acid ethanolamide

VHC : virus de l'hépatite C

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Travaux en lien avec la thèse

Publications

- A1 - **Gish A**, Wiart J.F, Turpin E, Allorge D, Gaulier J.-M. État de l'art et intérêt des dosages plasmatiques des substances endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like, *Tox Anal Clin.* 2021 ; ISSN 2352-0078, [doi: 10.1016/j.toxac.2021.07.004](https://doi.org/10.1016/j.toxac.2021.07.004). - (Not currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2024: 1,7)
- A2 - **Gish A**, Hakim F, Richeval C, Gaulier JM. Nouveau Produits de Synthèse, *EMC Biologie Médicale*, Elsevier, Paris, 2024;19(1):1-6. [doi : 10.1016/S2211-9698\(23\)69423-3](https://doi.org/10.1016/S2211-9698(23)69423-3).
- A3 - André C, Baudriller A, Bellouard M, Boudin C, Carles M, **Gish A**, Kernelleguen A, Kolmayer M, Le Carpentier E, Lenski M, Rahali MA, Bendjilali-Sabiani JJ, Ameline A. Les cannabinoïdes semi-synthétiques : revue de la littérature et mise à jour, *Tox Anal Clin.* 2021; 37(2) :204-222. [doi :10.1016/j.toxac.2025.01.101](https://doi.org/10.1016/j.toxac.2025.01.101). - (Not currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2024: 1,7)
- A4 - **Gish A**, Radwan E, Richeval C, Protopopescu C, Wiart JF, Hakim F, Allorge D, Carrieri P, Barré T, Gaulier JM. An LC-MS/MS method for simultaneous quantification of four endocannabinoids and endocannabinoid-like substances in plasma: application to a HIV-HCV co-infected population. *Ther Drug Monit.* 2025; 10.1097/FTD.0000000000001397. [doi:10.1097/FTD.0000000000001397](https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000001397) - (Currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2023: 2,8)
- A5 - **Gish A**, Wiart JF, Richeval C, Allorge D, Gaulier JM. Simultaneous analysis of four endocannabinoids and endocannabinoid congeners together with delta-9 tetrahydrocannabinol and related metabolites in dried blood spots. *J Pharm Biomed Anal.* 2025;265:116991. [doi: 10.1016/j.jpba.2025.116991](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2025.116991). - (Currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2023: 3,1)
- A6 - **Gish A**, Peyré A, Richeval C, Pleignet E, Cottereau V, Cherki S, Daveluy A, Gaulier JM, Devault DA. Presence of a synthetic cannabinoid, MDMB-INACA, in "Chimique" in Mayotte: preliminary data on metabolism with a view to a future epidemiological study based on wastewater. *Environ Sci Pollut Res Int.* [doi: 10.1007/s11356-025-36789-3](https://doi.org/10.1007/s11356-025-36789-3) - (Currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2022: 5,8)
- A7 - Richeval C, **Gish A**, Cottereau V, Peyre A, Pleignet E, Cherki S, Allorge D, Gaulier JM, Devault DA. A current overview of the pharmacological composition of "La Chimique" consumed in Mayotte: Preliminary results of the CHASSE-MAREE protocol. *Drug Test Anal.* 2024;16(6):558-569. [doi:10.1002/dta.3585](https://doi.org/10.1002/dta.3585). - (Currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2023: 2,6)
- A8 - Devault DA, Fabien L, **Gish A**, Richeval C, Gaulier JM, Nefau T. Synthetic cannabinoids in Mayotte over a year in time and space: an example of highfrequency evolution of market. *Environ Sci Pollut Res Int.* (soumis) - (Currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2022: 5,8)

- A9 - **Gish A**, Peyré A, Richeval C, Pleignet E, Cottreau V, Gaulier JM, Devault DA. Elucidation of human metabolism of ADB-FUBIATA for population exposure assessment. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2025. [doi : 10.1007/s11356-025-36571-5](https://doi.org/10.1007/s11356-025-36571-5). - (Currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2022: 5,8)
- A10 - Devault DA, Peyré A, **Gish A**, Richeval C, Pleignet E, Cottreau V, Gaulier JM. Data for the epidemiological study of CH-PIATA in wastewater from the study of its presence over 12 months in “la chimique” in Mayotte. *Environ Sci Pollut Res Int.* [doi: 10.1007/s11356-025-36689-6](https://doi.org/10.1007/s11356-025-36689-6). - (Currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2022: 5,8)
- A11 - Devault DA, Peyré A, **Gish A**, Richeval C, Pleignet E, Cottreau V, Gaulier JM. From the curb to the curve : population exposure to the synthetic cannabinoid receptor agonist synthetic cannabinoid MDMB-4en-PINACA in Mayotte. *Environ Sci Pollut Res Int.* [doi: 10.1007/s11356-025-36744-2](https://doi.org/10.1007/s11356-025-36744-2). - (Currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2022: 5,8)
- A12 – Bertrand-NDoye M, Girard H, **Gish A**, Hakim F, Ghoul C, Hedouin V, Delannoy Y, Scavion Q, Gaulier JM. Use of blood micro-samples in forensic thanatology. *Forensic Sci Int* (soumis) - (Currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2024: 2,5)

Communications

- C1- **Gish A**, Wiart JF, Hakim F, Richeval C, Humbert L, Allorge D, Gaulier JM. Développement, validation et mise en œuvre d'une méthode de dosage par CL-SM/SM des endocannabinoïdes plasmatiques. *31^{ème} Congrès de la Société Française de Toxicologie Analytique*, Strasbourg, France, Mai 2023
- C2 - **Gish A**, Richeval C, Hakim F, Protopopescu C, Barré T, Allorge D, Carieri P, Gaulier JM. Panorama de consommations de substances psychoactives dans une population de patients co-infectés VIH-VHC (2006–2021) : résultats toxicologiques de l'étude ELICSIR. *33^{ème} Congrès de la Société Française de Toxicologie Analytique*, Chamonix, France, mars 2025
- C3 - Gaulier JM, **Gish A**, Ghoul C, Bertrand N Doye M, Girard H, Scavion Q, Goldsztajn D, Hakim F, Richeval C, Wiart JF, Humbert L, Delannoy Y, Hédouin V, Allorge D. Étude pilote du projet IN CADAVER : preuve de concept d'une voie future de la toxicologie post-mortem (et nouveau paradigme ?) *31^{ème} Congrès de la Société Française de Toxicologie Analytique*, Strasbourg, France, Mai 2023
- C4 - Gaulier JM, **Gish A**, Ghoul C, Bertrand N, Doye M, Girard H, Scavion Q, Goldsztajn D, Hakim F, Richeval C, Wiart JF, Humbert L, Delannoy Y, Hédouin V, Allorge D. Etude pilote du projet IN CADAVER : toxicologie post-mortem sur microprélèvements ? *53^{ème} Congrès Francophone International de la Société Française de Médecine Légale*, Tours, France, juin 2023
- C5 - Hakim F, Ghoul C, Girard H, Scavion Q, Delannoy Y, Wiart JF, Humbert L, Allorge D, Hédouin V, Gaulier JM, **Gish A**, Bertrand-NDoye M, Richeval C. Main results of the IN CADAVER

protocol: The value of using dried blood spots (DBS) in post-mortem forensic toxicology. *33ème Congrès de la Société Française de Toxicologie Analytique*, Chamonix, France, mars 2025

- C6 - Bertrand-Ndoye M, Girard, H, Gaulier JM, Hakim F, **Gish A**, Hédonin V. Utilisation des micro-prélèvements sanguins en thanatologie médicolégale. *53ème Congrès Francophone International de la Société Française de Médecine Légale*, Megève, France, juin 2025
- C7 - Devault D, Peyré A, Pleynet E, Cottreau V, **Gish A**, Richeval C, Gaulier JM. "Chimique" synthetic cannabinoids in Mayotte: molecule identification, elucidation of their metabolites and Drug Target Residues proposals for a monitoring by wastewater-based epidemiology. *SETAC Europe 34th Annual Meeting*, Seville Espagne, mai 2024
- C8 - Richeval C, **Gish A**, Deschodt A, Croquet F, Cottreau V, Peyre A, Pleynet E, Cherki S, Allorge D, Devault D, Gaulier JM. Synthetic cannabinoid receptor agonists used in the composition of "La Chimique" consumed in Mayotte: current overview and one-year assessment with the analytical results of the CHASSE-MAREE protocol. *6th International Conference Research & Innovation CBRNE*, Strasbourg, mars 2024
- C9 - **Gish A**, Richeval C, Deschodt A, Croquet F, Humbert L, Wiart JF, Cottreau V, Peyré A, Pleynet E, Cherki S, Allorge D, Devault DA, Gaulier JM. Agonistes synthétiques des récepteurs cannabinoïdes entrant dans la composition de « La Chimique » consommée à Mayotte : état des lieux et bilan à un an à travers les résultats analytiques du protocole CHASSE-MAREE. *32ème Congrès de la Société Française de Toxicologie Analytique*, Dijon, France, Juin 2024
- C10 - Devault D, Peyré A, Richeval C, **Gish A**, Cherki S, Daveluy A, Pleynet E, Cottreau V, Gaulier JM. La « chimique » à Mayotte. *13ème Colloque de la Fédération Addiction*, Bordeaux, France juin 2024
- C11 - Devault DA, Cottreau V, Gaulier JM, Daveluy A, Peyré A, Richeval C, **Gish A**, Pleynet E Chasse-marée : étude de la « chimique » à Mayotte. *2e colloque Mayotte en Santé - Territoires défavorisés*, Mayotte, septembre 2023. Abstract publié en *Med Trop Sante Int* 2024;4(2):mtsi.v4i2.2024.528. doi: 10.48327/mtsi.v4i2.2024.528

I - INTRODUCTION

« *Ce que le haschisch te donne d'un côté, il te le retire de l'autre... Il te donne le pouvoir de l'imagination mais t'enlève la possibilité d'en profiter.* ». Charles BAUDELAIRE – 1860

Souvent reprise, cette citation de Charles Baudelaire, poète français de 19^{ème} siècle, exprime les effets ressentis après la consommation de « haschisch », le chanvre indien ou le cannabis, l'une des plantes les plus anciennement connues et utilisées par l'homme. C'est environ un siècle après cette citation de Charles BAUDELAIRE que les chercheurs ont pu identifier la molécule psychoactive principale, le Δ9-tétrahydrocannabinol (Δ9-THC), plus couramment connue sous l'abréviation de THC. Cette découverte fut suivie quelques années plus tard par l'identification des récepteurs cannabinoïdes et des ligands endogènes de ces récepteurs (endocannabinoïdes). Les recherches menées dans le but de reproduire et d'étudier les effets pharmacologiques du Δ9-THC ont abouti à une synthèse des premières molécules de la classe des cannabinoïdes de synthèse. Initialement développés comme potentiels agents thérapeutiques, les cannabinoïdes de synthèse possédant des propriétés d'agonistes des récepteurs cannabinoïdes sont maintenant principalement connus pour leur usage récréatif et font partie d'une classe plus large de nouvelles substances psychoactives, aussi appelées couramment nouveaux produits de synthèse (NPS). Plus récemment, les cannabinoïdes hémisynthétiques produits à partir du cannabidiol, sont apparus sur le marché.

La complexité de l'abord analytique des molécules agissant sur les récepteurs cannabinoïdes réside dans la multitude et variété des substances, leurs particularités physicochimiques, les concentrations généralement très faibles dans les matrices biologiques et les particularités de métabolisme de chaque molécule. Compte tenu de cette complexité, la capacité d'identifier, de quantifier ces molécules et d'interpréter les résultats présentent de nombreux challenges sur les plans pré-analytique, analytique et post-analytique.

L'objectif de ma thèse est d'étudier les implications des endocannabinoïdes, et des cannabinoïdes d'une manière générale, dans les domaines de la toxicologie biologique et médico-légale, à travers de développement d'outils analytiques permettant leurs mises en évidence dans les différentes matrices biologiques.

Après avoir effectué des rappels sur les endocannabinoïdes, les phytocannabinoïdes et les cannabinoïdes de synthèse et d'hémisynthèse, j'exposerai mes travaux analytiques de développement d'outils analytiques pour la détection et la quantification des endocannabinoïdes et des phytocannabinoïdes dans les différentes matrices biologiques. Cet exposé sera suivi par la présentation de l'outil l'exploration métabolique *in silico* que j'ai développé à travers l'exemple détaillé d'un cannabinoïde de synthèse, le MDMB-INACA. Par la suite, je déclinerai la mise en œuvre de ces outils analytiques à travers trois projets de recherche : « ELICSIR », « Chasse-marée » et « IN CADAVER ».

II - RAPPELS

II.1 Endocannabinoïdes

Le système endocannabinoïde ou endocannabinoïdome est un système endogène complexe puisqu'il est composé par (1-3)

1- les récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2, CB3 ou autrement appelé G protein-coupled receptor 55 (GPR55), GRP119, Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) et Peroxisome proliferator-activated receptors α et γ (PPAR α et γ),

2- les ligands de ces récepteurs (ECs) c'est à dire les molécules endocannabinoïdes et les molécules endocannabinoïdes-like,

3- et les enzymes nécessaires à leur synthèse et leur dégradation.

L'identification et le clonage du récepteur CB1 ont permis en 1992 de découvrir le premier agoniste endogène de ce récepteur, l'arachidonoylénanolamide (anandamide ou AEA) possédant des propriétés d'agoniste partiel des récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2 (4). Ces observations ont mené à la découverte du 2-arachidonoylglycérol (2-AG), agoniste complet des récepteurs cannabinoïdes (5,6). A ce jour, 13 autres molécules endocannabinoïdes sont décrites dans la littérature et présentent des propriétés activatrices ou inhibitrices des récepteurs cannabinoïdes (7).

Les autres molécules qu'il est nécessaire d'aborder sont les médiateurs endocannabinoïdes-like. Ces composés sont structurellement apparentés aux « vrais » endocannabinoïdes, mais ne contiennent pas d'acides gras hautement insaturés et ne se lient pas aux récepteurs cannabinoïdes. Ces médiateurs comportent la classe des *N*-acyle-amides à longues chaînes qui inclue les *N*-acyle-taurines, *N*-acyle-séronines, *N*-acyle-dopamines, les amides primaires des acides gras et les *N*-acyle acides aminés. Leurs voies métaboliques et les récepteurs ciblés sont souvent partagés avec les molécules endocannabinoïdes. Ces acteurs moléculaires font partie du système endocannabinoïde élargi, connu sous le nom d'« endocannabinoïdome » (8). Dans ce travail, nous allons plus particulièrement nous intéresser aux deux principales molécules endocannabinoïdes-likes suivantes : *N*-oleoylénanolamine (OEA) et *N*-palmitoylénanolamide (PEA).

L'endocannabinoïdome intervient dans l'homéostasie de plusieurs systèmes : le système nerveux central et périphérique, le système gastro-intestinal, le système immunitaire, le système de reproduction, au niveau hépatique, musculaire et cutanée.

Dans l'idée de la diffusion à la communauté scientifique francophone de ces informations et données scientifiques concernant les ECs, j'ai écrit un article de synthèse (article 1) qui a été publié dans la revue Toxicologie Analytique et Clinique (ToxAC).

[Article 1, page 67](#)

II.2 Phytocannabinoïdes

Le cannabis est une plante annuelle dioïque originaire de l'Asie centrale de la famille des *Cannabaceae*, remarquable par sa variabilité morphologique et polyvalence. Tout au long de l'histoire humaine, les produits des différentes espèces de cette plante ont été utilisés en tant qu'aliments et combustibles (akènes ou graines), fibres textiles (tiges) et produits thérapeutiques (sommités fleuries non fertilisées). Les plus anciens documents (en Chine, il y a environ 5000 ans) rapportent l'usage médical du cannabis dans le traitement de la douleur (9). Les trois principales espèces de cannabis ont été décrites par Schultes *et al.* et Anderson (10,11) dans les années 70 -80 du siècle dernier : *Cannabis sativa L.* (plantes hautes et ramifiées pour la fibre, les graines ou l'usage psychoactif), *Cannabis indica Lam.* (plantes courtes et à larges feuilles d'Afghanistan utilisées pour produire du haschisch) et *Cannabis ruderalis Jan.* (plantes de bord de route courtes et non ramifiées, généralement pauvres en phytocannabinoïdes). Le chanvre de *Cannabis sativa var. indica* pousse dans le monde entier dans les régions tempérées et tropicales (12). Le terme « phytocannabinoïde », ou plus simplement, les « cannabinoïdes », définit les dérivés mérotepénoïdes contenus dans le cannabis, dont le noyau résorcinyl est complété d'une chaîne latérale isoprényle, alkyle ou aralkyle en position para (13). Cependant, le terme « cannabinoïde », bien que le plus souvent associé à une structure chimique spécifique, peut également désigner des ligands pharmacologiques des récepteurs endocannabinoïdes humains (14).

Le siècle dernier a été celui de la découverte de phytocannabinoïde principal psychoactif du cannabis, le Δ9-THC, parmi 113 autres phytocannabinoïdes décrits à ce jour, principalement responsable de l'usage récréatif de cette plante (15). La teneur en Δ9-THC dans les produits de la plante est hautement variable selon l'espèce, la variété de l'espèce, les conditions de culture et la forme du produit (résine, herbe ou l'huile). Le deuxième phytocannabinoïde le plus étudié est le cannabidiol (CBD). Le CBD est un phytocannabinoïde isolé pour la première fois en 1940 (16). Contrairement au Δ9-THC, le CBD ne possède pas de propriétés psychoactives. Cependant les mécanismes d'action neuromoléculaires de cette substance restent très partiellement élucidés à l'heure actuelle.

A noter que, la plante de cannabis n'est pas le seul organisme végétal capable de synthétiser des phytocannabinoïdes. Les espèces de *Rhododendron* (*Ericaceae*), *Helichrysum umbraculigerum* (*Asteraceae*), *Amorpha fruticosa* et *Glycyrrhiza foetida* (*Fabaceae*) sont capables d'en produire.

En ce qui concerne la réglementation en France : le cannabis (et sa résine) est classé parmi des produits stupéfiants par l'arrêté du 22 février 1990 (17) en appliquant une interdiction plus stricte qu'au niveau international. L'article R. 5132-86 du Code de la Santé Publique interdit toutes les opérations (production, consommation, détention, usage, etc.) portant sur tout produit extrait de la plante cannabis avec les sanctions pénales prévues par l'article 222-37 du Code de Procédure Pénal pour le transport, la détention, l'offre, la cession, l'acquisition ou l'emploi illicites de stupéfiants, et par l'article L. 3421-1 du Code de la Santé Publique pour l'usage. Certaines dérogations sont prévues par les textes, notamment

l'article R. 5132-86-1 du Code de la Santé Publique autorisant « *la culture, l'importation, l'exportation et l'utilisation, à des fins industrielles et commerciales, de variétés de Cannabis sativa L. dépourvues de propriétés stupéfiantes ou de produits contenant de telles variétés* ». Cet article fait mention du chanvre industriel et de CBD de bien-être (18). Enfin, l'arrêté du 30 décembre 2021 (19) modifie la teneur légale maximale en Δ9-THC porté à 0,3 % contre 0,2 % antérieurement dans l'arrêté du 22 août 1990 (20), afin de s'aligner avec le droit Européen. La vente, la consommation et la détention de fleurs ou de feuilles brutes « CBD » sont finalement autorisées par une décision du Conseil d'Etat de 29 décembre 2022 (21).

Actuellement, le cannabis est le produit illicite le plus consommé dans le monde. En 2023, en France, 50,4 % des adultes âgés de 18 à 64 ans déclaraient avoir déjà consommé du cannabis au cours de leur vie. Cette consommation semble toucher plus particulièrement les jeunes adultes de 18 à 25 ans (22). Selon les données épidémiologique, le nombre d'utilisateurs occasionnels et des consommateurs quotidiens est en hausse au fil des années. Les deux principales formes consommées actuellement en France sont l'herbe (feuilles, tiges et sommités fleuries séchées) et la résine (haschisch). L'huile et d'autres produits, extraits concentrés en Δ9-THC inspirés des marchés légaux nord-américains, sont moins observés (23). L'herbe et le haschisch se fument, généralement, sous forme de « joint » (*i.e.* avec du tabac, sous la forme d'une cigarette roulée). D'autres modes de consommation moins fréquents sont également rapportés comme le vapotage, la vaporisation, dans une chicha, les préparations alimentaires (*space-cakes*), les infusions, et également sous forme de baumes, d'huiles essentielles ou de cosmétiques (23). La teneur moyenne des produits de cannabis est en hausse depuis plusieurs années avec une augmentation de plus de 50 % pour les résines (12,3 % en 2011 contre 29% en 2023) et de 35 % pour l'herbe (de 10,4 % en 2011 à 14,0 % en 2023) (23).

Sur le plan clinique, le cannabis présente une relative faible toxicité organique directe chez les adultes. Toutefois, au décours d'une intoxication aigue par le cannabis, des troubles de l'état de conscience avec désorientation temporelle et troubles mnésiques, perturbations sensorielles (vision, ouïe, ...), troubles thymiques et dissociatifs (euphorie, anxiété, hallucinations), bradycardie et arythmies sont observés (24,25). Ces effets sont variables selon la dose, la teneur en Δ9-THC et la tolérance du sujet. Enfin, même lorsqu'il est consommé de manière occasionnelle, le cannabis augmente le risque de syndrome coronarien aigu dans les heures qui suivent la consommation (26). La clinique des intoxications aigues pédiatriques est bien plus marquée, et se manifeste généralement par une dépression du système nerveux centrale (SNC) et une dépression respiratoire, un coma, des convulsions et une apnée (27).

Une consommation régulière de cannabis peut entraîner une altération des performances cognitives, avec notamment des troubles de la mémoire, des troubles des fonctions exécutives et des difficultés attentionnelles, troubles psychiatriques ... et le syndrome d'hyperémèse cannabinoïde.

En dehors du cadre de l'usage récréatif, les propriétés pharmacologiques du cannabis sont utilisées dans la prise en charge de certains pathologies comme les nausées et vomissements induits par la chimiothérapie, l'anorexie et la perte d'appétit chez les patients séropositifs au virus de

l'immunodéficience humaine (VIH), ou encore pour soulager les douleurs chroniques et la spasticité dans le cadre de la sclérose en plaques (28). Le CBD est actuellement utilisé comme une option thérapeutique en association au clobazam dans le traitement des crises d'épilepsie associées au syndrome de Dravet, chez les patients pharmaco-résistants de 2 ans d'âge et plus.

II.3 Cannabinoïdes de synthèse et d'hémisynthèse

Les nouvelles substances psychoactives, appelées plus couramment NPS (en France et par l'observatoire français des drogues et toxicomanies - OFDT) ou New Psychoactive Substances en anglais, sont définies de la manière suivante (EU Council Decision 2005/387/JHA (29) et Office des Nations Unies contre la Drogue et le Crime – UNODC (30)) : toutes substances ou préparations, consommées à des fins abusives, qui ne sont pas listées par la Convention des Nations Unies sur les stupéfiants de 1961, ni par celle sur les psychotropes de 1971, et qui représentent une menace pour la santé publique.

Ces NPS sont des substances psychoactives qui miment les effets de substances déjà connues, que ce soit des médicaments ou des stupéfiants, en contournant la législation. En effet, les NPS ne sont généralement pas connus et répertoriés par les différentes législations nationales réglementant les produits stupéfiants au moment du début de commercialisation. La vente des NPS s'effectue très majoritairement via l'Internet, souvent sur les sites du « deep web », à des coûts généralement plus faibles que ceux des substances ou produits stupéfiants qu'ils imitent. Sur l'Internet, de nombreuses appellations leur sont donnés tels que Research Chemicals, smart-drugs, party-pills, designer drugs, sels de bain, encens, Legal Highs, ... Expédiés par voie postale à l'usager ou des revendeurs, ils peuvent faire l'objet d'une revente (deal), en particulier dans les lieux festifs.

Les principales caractéristiques des NPS sont leur diversité et une temporalité particulière de circulation et d'usage car cette dernière est marquée par un rythme soutenu de « nouveautés », et un renouvellement régulier. Les « nouveaux » NPS apparaissent chaque année en Europe depuis 2012, avec un pic de « nouveaux » NPS dans les années 2014 et 2015. Fin 2024, L'EUDA (European Union Drugs Agency, autrefois l'EMCDDA) surveillait environ 1000 nouvelles substances psychoactives, dont 47 avaient été signalées pour la première fois en Europe en 2024. Ce chiffre est proche du nombre annuel généralement rapporté entre 2016 et 2022. Mais dans le même temps, près de 400 NPS signalées les années précédentes en Europe, n'ont plus été détectées sur le marché en 2020 (29,30). Sur les données de 2021, les laboratoires de synthèse de NPS étaient essentiellement localisés en Asie du Sud-Est et en Chine. Cependant, depuis 2021, les sites de production dans des laboratoires « artisanaux » sont en expansion sur le territoire européen (31).

Les cannabinoïdes de synthèse, également dénommés SCRAs (Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists) sont donc des substances qui présentent des effets pharmacologiques similaires au Δ9-THC. Les SCRAs constituent le groupe le plus important en nombre des NPS (25% de tous les NPS) et probablement également en termes de diversité de structure chimique. Le premier SCRA fut le l'HU-

210, synthétisé en 1988. Les SCRAs appartiennent à différentes familles chimiques : naphthoylindoles (JWH-018), naphthylméthylindoles (JWH-175), naphthoylpyrroles (JWH-030), phénylacétylindoles (JWH-250), naphthylméthylindènes (JWH-176), benzoylindoles (AM-2233), cyclohexylphénols (CP 47,497), adamantoylindoles (AKB-48), ... Environ 247 SCRAs sont suivis en Europe depuis 2008 et 5 de ces substances ont été signalées pour la première fois en 2023 (29,30). Entre 2016 et 2020, le nombre de nouveaux cannabinoïdes synthétiques apparus sur le marché demeurait stable, à environ 10 par an, contre une moyenne de 27 par an au plus fort du phénomène des « drogues légales » entre 2011 et 2015. Toutefois, en 2021 et 2022, le nombre de substances notifiées a augmenté, avec respectivement 15 et 22 substances signalées avec notamment l'apparition d'une nouvelle sous-classe des « OXIZIDs ». Ce phénomène d'augmentation du nombre des nouveaux cannabinoïdes est probablement associé à des tentatives de contourner « la surveillance des structures génériques », réglementation introduite en juillet 2021 en Chine. En effet, à la suite de la mise en œuvre de ces mesures de contrôle juridique, l'approvisionnement de l'Europe pour presque tous les cannabinoïdes synthétiques connus a été perturbé, ce qui a réduit la disponibilité de composés qui étaient alors dominants, tels que le MDMB-4en-PINACA et l'ADB-BUTINACA. C'est probablement en conséquence que les données de saisie de 2023 rapportent la création de petit nombre des laboratoires sur le territoire européen qui, depuis, synthétisent ces SCRAs notamment à partir du précurseur MDMB-INACA.

Selon les données de 2023, le marché actuel des SCRAs s'oriente vers la 3ème génération tels que le 5F-ADB (ou 5F-MDMB-PINACA), le MDMB-4en-PINACA, le MDMB-5F-PICA, le FUB-AMB, l'ADB-BUTINACA ou encore le MDMB-BUTINACA. En France, la plupart des SCRAs (soit nominativement, soit leurs familles) sont inscrits sur la liste des substances classées comme stupéfiants rendant illégales leur production, vente, et consommation.

Consommés à but récréatif avec des effets recherchés équivalents à ceux du cannabis, les SCRAs étaient initialement commercialisés pulvérisés sur un support végétal, puis séchés et broyés, et portaient la dénomination de « Spices » (en référence à la drogue fictive du roman « Dune »), destinés à être fumés après mélange, ou non, avec du tabac. Mais aujourd'hui, les SCRAs sont plus généralement consommés à l'aide d'e-cigarettes : e-liquides directement achetés sur l'Internet ou SCRAs ajoutés dans un e-liquide, notamment sur le territoire français métropolitain (32,33).

Les SCRAs sont des agonistes puissants du CB1 avec une affinité pour les récepteurs cannabinoïdes très souvent supérieure à celle du Δ9-THC. En conséquence, leur consommation entraîne des effets recherchés généralement plus intense (ivresse, euphorie, intensification/modification des perceptions sensorielles et spatiotemporelles) et plus rapidement qu'avec le chanvre indien. Les intoxications aiguës sont également plus sévères qu'avec le Δ9-THC avec notamment la survenue de convulsions (crises généralisées tonico-cloniques) et de troubles cardio-vasculaires (tachycardie prolongée, infarctus de myocarde, hypertension artérielle). L'usage régulier semble entraîner des complications psychiatriques (épisodes psychotiques avec hallucinations, idées suicidaires et automutilation) plus sévères et fréquentes qu'avec le chanvre indien.

Les concentrations très faibles (généralement, moins de 1 µg/L) dans les matrices biologiques liquides, et la métabolisation intense au niveau hépatique rendent les molécules mères des SCRAs difficilement détectables dans les matrices biologiques. Leur recherche et identification et/ou dosage (et donc, surtout celle de leurs métabolites) est réalisé par méthodes analytiques de chromatographie liquide avec détection par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) et/ou par spectrométrie de masse haute résolution (CL-SMHR) dans le sang, l'urine, la salive ou les matrices kératinisées (cheveux et ongles) (32,34,35).

J'ai publié un chapitre dans l'EMC Biologie Médicale présentant une synthèse de l'état de connaissance actuel sur les NPS.

[Article 2, page 68](#)

Depuis 2019, une autre classe, celle des cannabinoïdes hémi-synthétiques (CHS) produits principalement à partir de CBD, est apparue sur le marché mondial. Le Δ8-tetrahydrocannabinol (Δ8-THC) est la première substance apparue sur le marché des USA à la suite de l'adoption par certains Etats Américains de l'«Agriculture Improvement Act» ou du «2018 Farm Bill» portant sur les changements de la législation sur la culture de chanvre. En 2022, des cannabinoïdes hémi-synthétiques, qui ne sont pas contrôlés par les conventions internationales sur les drogues, ont commencé à apparaître sur le marché européen.

Le premier à apparaître en Europe était l'hexahydrocannabinol (HHC). Les CHS ont été vendus ouvertement comme substituts légaux du Δ9-THC, plus souvent pulvérisés sur du chanvre à faible taux de Δ9-THC. De plus, comme pour les SCRAs, les vapoteuses et les produits comestibles (gummies) constituent un moyen facile et discret de consommer les CHS, en particulier dans les lieux publics. Selon les données de l'EUDA en 2024, six CHS circulent actuellement sur le marché européen (HHC, HHC-O, HHC-P, H4-CBD, THC-P et HHCH). Les données de la littérature sur les effets observés après la consommation des CHS chez l'homme demeurent faibles, mais des rapports de consommateurs suggèrent qu'ils pourraient être subjectivement similaires à ceux du cannabis. Cependant, certains produits sont disponibles sous des formes pouvant délivrer des doses importantes et la variabilité des structures des CHS soulèvent des inquiétudes quant aux implications possibles de la disponibilité de ces substances pour la santé publique.

Dans l'idée de la diffusion plus large possible des informations concernant les CHS à la communauté scientifique francophone, j'ai participé à une rédaction d'une revue de la littérature (article 3) dans le cadre d'un travail collaboratif avec des « Jeunes scientifiques » de la Société Française de Toxicologie Analytique (SFTA) qui a été publié dans la revue ToxAC.

[Article 3, page 69](#)

III - TRAVAUX ANALYTIQUES

III.1 Dosage des endocannabinoides plasmatiques

La quantification des ECs dans les matrices constitue un défi analytique, d'une part de par leur nature physicochimique (lipides), d'autres part en raison de concentrations très faibles de ces substances dans le sang. De plus, la mesure des ECs et des substances apparentées est très sensible à des facteurs pré-analytiques tels que la nature de prélèvement sanguin, le délai et la température d'acheminement et le stockage des échantillons, qui peuvent augmenter artificiellement les niveaux d'AEA, de PEA et en particulier de 2-AG par transformation *in vitro* en 1-arachidonoylglycérol (1-AG) (36–38). Au vu de ces propriétés, le dosage des ECs dans le plasma nécessite une méthodologie validée et des procédures maîtrisées qui tiennent compte de cette instabilité physico-chimique, des interférences matricielles et de leur sensibilité à la dégradation enzymatique. Malgré un nombre croissant de méthodes analytiques pour la quantification des ECs, peu de méthodes répondant simultanément aux défis analytiques et à la complexité de la prise en charge d'échantillons biologiques réels ont été proposées.

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) demeure la méthode de choix pour ces analyses en raison de sa sensibilité, de sa spécificité et de sa robustesse (39–41). Néanmoins, le choix de la colonne et des paramètres chromatographiques est primordial pour la séparation de composés isomères qui interfèrent dans la détection, notamment, ceux de l'AEA et de l'OEA.

J'ai développé une méthode de dosage des endocannabinoïdes dans le plasma. Cette méthode et sa validation complète font l'objet d'un article accepté par la revue Therapeutic Drug Monitoring.

[Article 4, page 70](#)

III.1.1 Discussion (*intérêt et limites*) de cette méthode

La principale force de cette méthode réside dans la validation complète d'une méthode LC-MS/MS suffisamment robuste pour quantifier en routine l'AEA, le 2-AG/1-AG, l'OEA et le PEA dans le plasma humain avec des valeurs de limites basses de quantification (LLOQ) faibles et adaptées pour les applications cliniques. En se basant sur les données analytiques et les données de littérature (38,40,42), je peux proposer des recommandations générales pour la quantification des ECs dans le plasma :

- Les échantillons sanguins doivent être centrifugés dans les 30 à 60 minutes suivant le prélèvement afin de minimiser l'activité enzymatique *ex vivo* et l'isomérisation.
- Les échantillons sanguins doivent être conservés dans la glace ou à 4 °C entre le moment du prélèvement et la centrifugation, afin de ralentir l'efflux d'AEA, d'OEA et de PEA.

- Le plasma obtenu après centrifugation à 4 °C doit être aliquoté immédiatement et conservé à -80 °C afin de garantir la stabilité des analytes.
- Il faut éviter les cycles répétés de congélation-décongélation et analyser extemporanément les échantillons décongelés.

Cependant, il également est important de souligner les faiblesses de cette méthode analytique que je propose :

1. La séparation chromatographique complète entre l'OEA et le vaccenic acid ethanolamide (VEA) n'a pas été aboutie. L'utilisation des techniques chromatographiques plus résolutives (comme par exemple la chromatographie supercritique) est probablement nécessaire pour palier à ce manque de séparation.
2. L'étude de stabilité au long court à -80°C et l'influence des cycles de congélation et décongélation n'ont pas été évalués,
3. Bien que le tampon phosphate salin (PBS) ait été utilisé comme matrice de substitution avec des écarts de pente vis-à-vis du plasma inférieurs à 15 % lors de la validation, il ne reproduit pas entièrement la complexité biologique du plasma natif et peut ne pas tenir compte d'effets matriciels susceptibles d'apparaître dans certaines populations de patients.
4. L'étude plus approfondie de l'isomérisation spontanée de 2-AG et 1-AG n'a également pas pu être réalisée.
5. En raison de contraintes pré-analytiques et de la difficulté d'identifier d'autres laboratoires effectuant couramment ce type d'analyse, cette méthode analytique n'a pas été comparée à d'autres méthodes validées.

III.2 ECS et phytocannabinoïdes sur DBS

Le dosage des ECs sur dried blood spot (DBS) représente une approche innovante et très prometteuse dans le suivi des concentrations ECs à long terme. A l'heure actuelle, l'identification et le dosage des molécules xénobiotiques sur une goutte de sang total déposée et séchée sur buvard (DBS) constitue une tendance actuelle d'évolution du domaine de la pharmacologie et de la toxicologie analytique. C'est notamment le cas pour les dosages des médicaments antiépileptiques (43) et les biomarqueurs de la consommation d'éthanol (44).

Dans ce domaine, la bibliographie des méthodes analytiques du dosage des ECs sur DBS est pauvre car elle se restreint à une étude d'estimation relative du 2-AG sur 10 µL du sang déposé sur le buvard dans le cadre d'études métabolomiques (45).

Compte tenu du peu de données bibliographiques sur les méthodes de dosage des ECs sur DBS, la mise en place d'une telle méthode demeure complexe :

- un faible volume du sang déposé sur un buvard ;
- de faibles concentrations d'ECs dans le plasma et donc dans le sang total ;
- l'absence des données bibliographiques concernant une méthode d'extraction efficace d'ECs à partir du buvard ;
- et l'absence des données sur la stabilité des ECs sur le buvard incluant la transformation partielle et/ou totale de 2-AG vers 1-AG.

Par ailleurs, quelques méthodes de détermination simultanée du Δ9-THC et de ses métabolites sur DBS ont été rapportées dans la littérature (46,47). Ces méthodes sont généralement associées à la détection et au dosage d'autres stupéfiants et à des limites de détection (LLOD) et de quantification basse (LLOQ) relativement élevées.

L'objectif principal de cette partie de mes travaux est d'évaluer la faisabilité d'un analyse simultané pour la détection et la quantification d'ECs et de cannabinoïdes dans des échantillons de sang séché (DBS) afin de servir de base à la recherche fondamentale pour de futures applications sur divers dispositifs volumétrique de collecte de micro-échantillons (VAMS). Dans ce contexte, j'ai élaboré une méthode de CL-SM/SM pour la quantification simultanée de 4 ECs (AEA, 2-AG, OEA et PEA), du Δ9-THC et de ses métabolites [11-nor-9-carboxy-Δ9-tétrahydrocannabinol (THC-COOH) et 11-hydroxy - Δ9-tétrahydrocannabinol (11-OH THC)] dans le DBS.

Le développement de la méthode et sa validation ainsi que l'étude de stabilité pré-analytique en lien a fait un objet d'un article (Article 5)

[Article 5, page 71](#)

III.2.1 Discussion (intérêt et limites) de cette méthode

En résumé, cette méthode analytique s'est avérée efficace pour détecter et quantifier les 7 analytes cibles dans les DBS. La méthode analytique offre une sensibilité suffisamment élevée pour permettre la détection et la quantification des analytes, même à de faibles concentrations, à partir d'un faible volume de sang (10 µL) déposé sur le buvard. Cependant, la stabilité limitée dans le temps des EC sur les DBS restreint l'utilisation de cette méthode alternative de prélèvement pendant une période relativement courte après le prélèvement. L'utilisation de cartes imprégnées de stabilisateurs pourrait être étudiée dans le cadre de futures études de stabilité. De même, le manque de données dans la littérature sur (1) un éventuel impact en termes physico-chimique sur les ECs lors des dépôts de sang total sur les DBS et lors du séchage, (2) les concentrations physiologiques/usuelles dans le sang total, (3) et la stabilité des ECs sur un tel support, peut limiter l'interprétation des résultats. Le rendement absolu et le rendement d'extraction des DBS n'ont également pas été étudiés dans ce travail.

Une limitation majeure de cette étude est que seuls des échantillons de sang total prélevés par ponction veineuse dans un tube EDTA ont été utilisés, sans analyse d'échantillons DBS capillaires authentiques. Cependant, les données rapportées démontrent la possibilité d'utiliser le DBS dans l'analyse simultanée des ECs et des cannabinoïdes. L'un des problèmes de l'analyse volumétrique sur DBS résulte dans la difficulté de mettre en place une telle méthode dans la pratique clinique actuelle, qui nécessite nécessairement une étape de dépôt de sang sur DBS à l'aide d'une pipette. Cependant, depuis quelques années, des dispositifs de micro-prélèvement volumétrique (VAMS, par exemple HemaXis-DB10 ou Neoteryx-Mitra) sont disponibles sur le marché. Ces dispositifs permettent de prélever un volume précis (dans une fourchette physiologique de valeurs d'hématocrite) de sang capillaire faciles à utiliser dans le contexte clinique.

Le dosage des ECs sur DBS constitue donc une alternative élégante au prélèvement sanguin par ponction veineuse et pourraient servir de base fondamentale pour le développement de l'utilisation de dispositifs VAMS (par exemple, HemaXis-DB10 ou Neoteryx-Mitra) pour le sang capillaire prélevé au bout du doigt.

En ce qui concerne les phytocannabinoïdes, la comparaison des résultats des concentrations en Δ9-THC et ses métabolites avec la méthode conventionnelle démontre une différence moyenne inférieure de 15% pour l'ensemble des analytes et un $R^2 > 0,97$ pour l'ensemble des analytes (Figure 1)

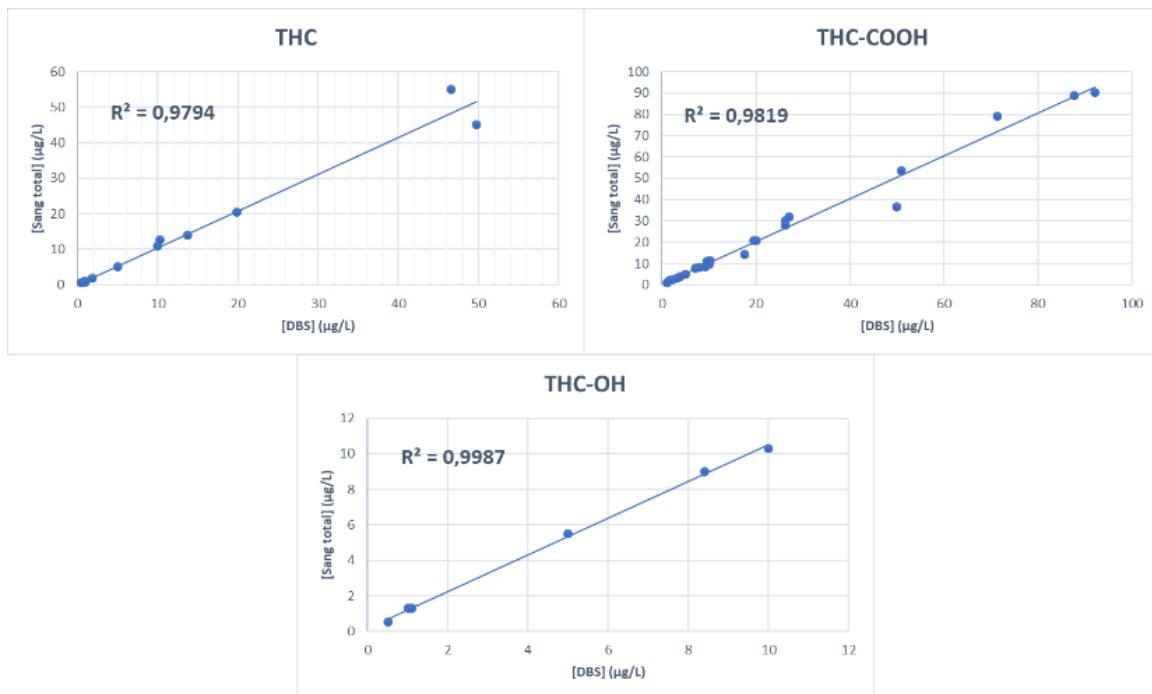


Figure 1: Comparaison des résultats de THC, THC-OH et THC-COOH entre la méthode de dosage sur le sang total et le dépôt du DBS

III.3 Développement de dosage des endocannabinoïdes dans les cheveux

Le dosage des ECs dans les cheveux représente, dans le suivi des concentrations ECs à long terme, une autre approche innovante et très prometteuse. A l'heure actuelle, l'identification et le dosage des molécules xénobiotiques dans les matrices kératinisées est une pratique courante dans les domaines de toxicologie hospitalière, professionnelle et médico-légale (48).

Compte tenu du peu de données bibliographiques sur les méthodes de dosage capillaire des ECs, la mise en place d'une telle méthode est complexe :

- la dispersion importante des concentrations des différents ECs dans les cheveux (qui est connue) nécessite une adaptation de la méthode extraction ;
- des interférences analytiques telles qu'un bruit de fond avec l'effet de suppression d'ions diminuant la sensibilité de la méthode de manière encore plus importante que dans le plasma ou sur DBS ;
- l'absence de données bibliographiques sur la corrélation entre les concentrations des mélanines (phéomélanine et eumélanine) ainsi que la couleur des cheveux, et les endocannabinoïdes ;
- la transformation complète de 2-AG vers 1-AG dans les cheveux nécessitant une adaptation de la méthode pour dosage de 1-AG.

III.3.1 Paramètres pré-analytiques et analytiques de dosage des endocannabinoïdes dans les cheveux

Premièrement, chaque mèche de cheveux prélevée en vertex postérieur est soumise à l'étape de décontamination qui consiste en la mise en contact de la mèche avec 5 mL d'isopropanol (Biosolve Chimie (France) 2-propanol qualité ULC-MS – CC/SFC) pendant 3 minutes (49). Par la suite les cheveux sont séchés à l'air libre et découpés en fragment de 1 cm correspondant approximativement à un mois d'historique du patient. Dans la suite, les cheveux sont finement coupés à l'aide d'une paire de ciseaux. La prise d'essai des cheveux coupés de 20 mg est pesée et 100 µL d'échantillon interne (AEA-D4, PEA-D4, OEA-D4 et 2-AG/1-AG-D5 à 50 µg/L) a été ajouté. L'extraction est réalisée avec 1 mL de méthanol pendant 24 heures à 4°C.

La prise d'essai des cheveux coupés de 20 mg a été retenue pour l'analyse. Les données bibliographiques sur l'absence de 2-AG et la présence de 1-AG dans les cheveux ont été confirmées. L'utilisation de la méthode d'extraction en phase solide (SPE) avec une utilisation Oasis® HLB 1cc et une élution avec le toluène a été retenue comme ayant moins d'inconvénients par rapport à l'extraction liquide-liquide

(LLE). La matrice « vierge » a été obtenue utilisation des cheveux blonds décolorées lavées de façon répétée au méthanol durant une semaine. Les paramètres analytiques sont inchangés par rapport à la méthode du dosage dans le plasma ou dans le DBS.

III.3.2 Optimisation de la méthode

En termes de matrice vierge, il n'existe pas de cheveux ne contenant pas d'ECs. Les essais de la méthode décrite par Chu *et al.* (utilisation de cheveux bruns, lavés de manière très intense) a permis d'une élimination de 1-AG et d'AEA, mais les molécules de PEA et OEA n'ont pas été totalement éliminées. Par contre, l'utilisation des cheveux blonds et décolorés, lavées pendant une semaine, a démontré la concentration bien moins importante d'ECs par rapport aux cheveux bruns.

L'optimisation de la méthode de dosage des ECs dans les cheveux a été principalement basée sur la possibilité de détection des molécules peu abondantes notamment l'AEA et le 1-AG.

Trois méthodes de prétraitement des échantillons (avec un ajout de 5 pg/mg d'ECs) ont été testées dans ce travail (chromatogramme présenté dans la Figure 2) :

- Les premiers essais d'extraction ont été basés sur les données de Croissant *et al.* (50) consistant en un séchage de 1 mL du surnageant et une récupération avec 100 µL de phase mobile. Ces essais ont montré un important bruit de fond dans notre périmètre analytique, ne permettant pas de la détection de AEA et 1-AG dans l'échantillon.
- L'extraction LLE utilisée pour l'analyse des ECs plasmatiques a été également testée après le séchage de 500 µL de l'extrait méthanolique et reprise par 200 µL de l'eau. Cette méthode a démontré les résultats positifs au niveau de la détection des 4 molécules. Néanmoins, l'inconvénient majeur de cette méthode est la durée importante de l'étape préanalytique.
- L'extraction en phase solide (SPE) avec une utilisation Oasis® HLB 1cc basées sur les données Ottria *et al.* (51). Les résultats les plus concluants ont été obtenus avec l'extraction SPE notamment pour AEA et 1-AG.

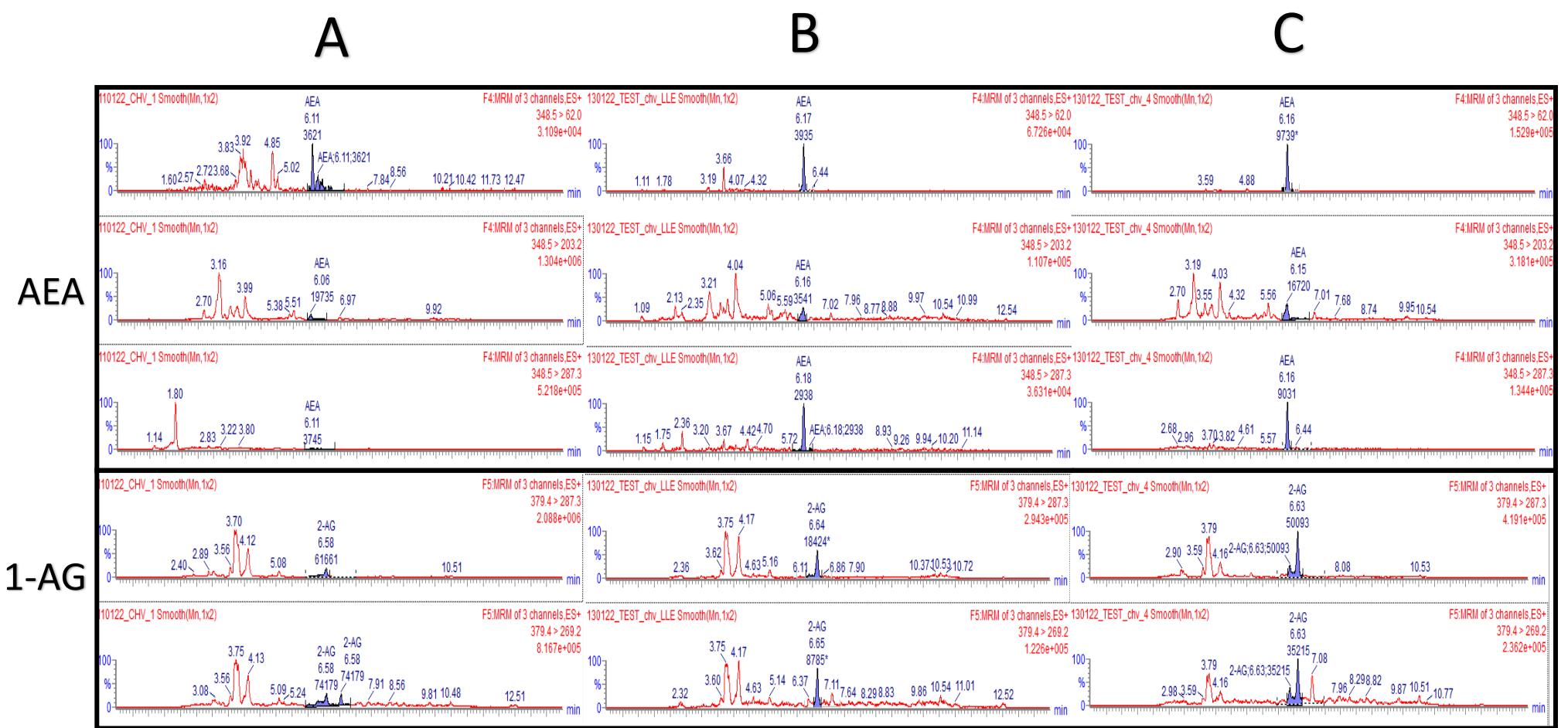


Figure 2: Pics de AEA et de 2-AG / 1-AG obtenues avec 20mg des cheveux l'extraction méthanolique avec l'analyse directe de sur l'extrait (A), l'extraction méthanolique suivi d'un séchage de 500 µL et une reprise par 200 µL d'eau MilliQ® suivie d'une extraction LLE (B) et l'extraction SPE avec une élution par toluène (C).

En SPE, les résultats obtenus avec les différentes solutions d’élution ne démontrent pas de différence significative en termes d’aire sous la courbe du pic chromatographique avec les différentes solutions d’extraction (Figure 3). L’élution avec une mélange équimolaire toluène et méthanol ne permet pas d’élution de l’AEA. Cependant, l’élution avec le toluène a démontré les meilleurs résultats sur le plan du rapport signal / bruit du fond, et elle a été choisi pour le reste du développement.

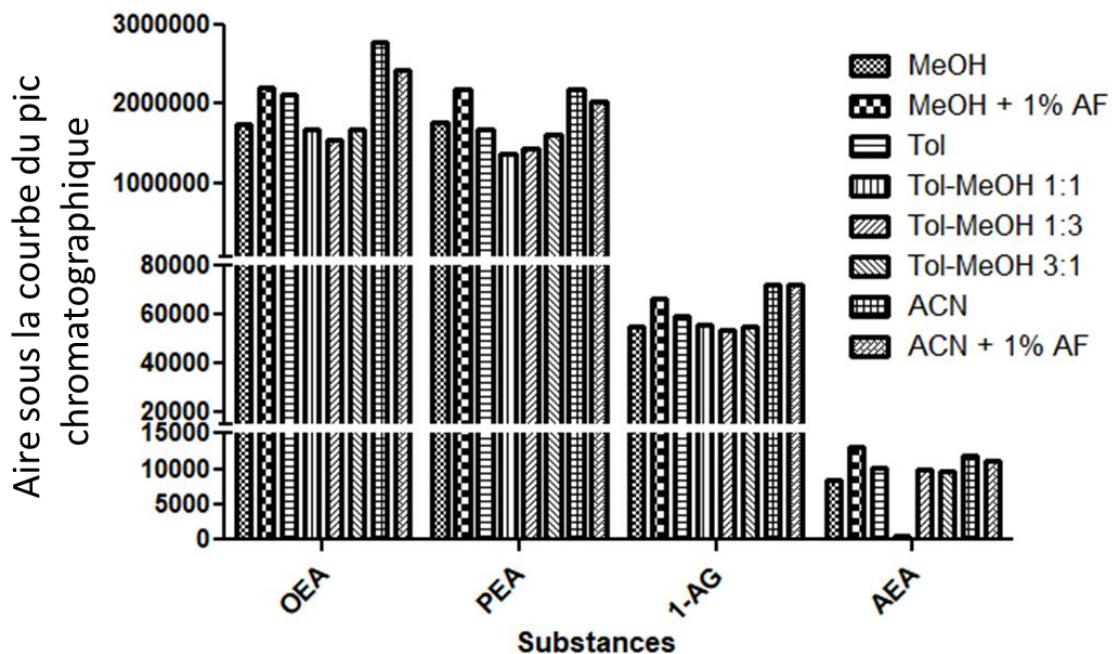


Figure 3: Résultats des essais des solutions d’élution de l’extraction SPE avec du méthanol (MeOH), du méthanol avec 1 % d’acide formique (MeOH + 1% AF), du toluène (Tol), des mélanges toluène/méthanol 50/50 (Tol-MeOH 1 :1) ; 75/25 (Tol-MeOH 3 :1), 25/75 (Tol-MeOH 1 :3) v/v, de l’acétonitrile (ACN) et de l’acétonitrile avec 1% d’acide formique (ACN + 1% AF).

En synthèse, la méthode finale est la suivante : la mèche de cheveux est lavée 3 minutes dans 5 mL d’isopropanol. Par la suite les cheveux sont coupés en fins segments (>1 mm) et 20 mg sont pesés. 20 µL de la solution d’étalon interne (50 µg/L de AEA-D4, PEA-D4, OEA-D4 et 2-AG/1-AG-D5) sont ajoutés et l’extraction est réalisée par 1 mL de méthanol à 4 - 8 °C durant 24 heures. A la suite, les tubes sont centrifugés à 4 600G pendant 10 minutes. 500 µL du surnageant sont mélangés avec 1 mL d’eau. Le pré-conditionnement des cartouches SPE (Oasis® HLB 1cc) est réalisé par 1 mL d’une solution méthanol/eau (60/40 ; v/v). 1,5 mL de la solution du surnageant dilué au 1/3 dans de l’eau est introduite dans la cartouche. Le nettoyage est réalisé avec 1 mL de la solution contenant du méthanol/eau (60/40 ; v/v) et la cartouche est ensuite séchée pendant 5 minutes sous vide. L’élution est réalisée par 1 mL de toluène. La vitesse d’écoulement pour chaque étape est 1 mL/minute. Par la suite, 1 mL de solution d’élution est séché à température ambiante sous un flux d’azote. La récupération du résidu sec s’effectue avec 100 µL de méthanol.

III.3.3 Discussion

Ce travail exploratoire a permis la mise au point d'un protocole pré-analytique et analytique de dosage des ECs dans les cheveux.

Cependant compte tenu de la complexité importante du traitement préanalytique, la réalisation de la validation complète de cette méthode n'a pas été entièrement réalisée. Cette validation finale est une perspective de mes travaux futurs.

III.4 Exploration métabolique *in silico* : prédition structurale et de temps de rétention par utilisation de logiciels, programmation et deep learning

Dans le cadre de ce travail, un outil informatique automatisé de prédition de structure, de temps de rétention et de spectre de fragmentation des métabolites des xénobiotiques a été développé. Cet outil a été, en particulier, appliqué dans le cadre de l'étude de métabolisme *in vitro* des cannabinoïdes de synthèse.

Ces étapes d'utilisation d'outils *in-silico* (outils informatiques) sont présentés, ici, à travers mon travail d'étude du métabolisme du MDMB-INACA qui a fait l'objet d'un article publié dans Environmental Science and Pollution Research.

Le choix de cette molécule est justifié par le fait qu'au moment de la réalisation des analyses et l'interprétation des résultats, aucun article s'intéressant au métabolisme de MDMB-INACA n'avait été publié.

[Article 6, page 72](#)

III.4.1 Exploration métabolique *in vitro* : exemple MDMB-INACA

L'exploration métabolique *in vitro* à l'aide de microsomes hépatiques humain (HLMs) des cannabinoïdes de synthèse a été réalisée selon la procédure préalablement publiée et appliquée dans le laboratoire (52). Brièvement, des HLMs (2 mg de protéines/mL) obtenus auprès de Biopredic (La Bretèche, Saint Grégoire, France) ont été pré activées par de l'alaméthicine (0,1 mmol/L) sur de la glace dans un volume intermédiaire de 50 µL dans du Tris-HCl-MgCl₂ 0,1 M (10 mM MgCl₂ et 100 mM solution de Tris-HCl) à pH 7,4. Ce mélange a été ajouté à un résidu séché de 50 µL d'une solution méthanolique de xénobiotique à 100 µM et 500 µM. Environ 50 µL d'un mélange de cofacteurs (composé de 8,9 mM UDPGA, 5,8 mM NADPH, 15 mM G6P et 6,7 UI/mL de G6PD dans 0,1 M Tris-HCl) ont ensuite été ajoutés. La réaction enzymatique a été réalisée à 37°C pendant 60 min et stoppée par l'ajout de 100 µL de méthanol. Environ 50 µL de la solution de réaction enzymatique ont été mélangés avec 100 µL de la phase mobile et 50 µL du mélange étalon interne (52,53). Environ 15 µL ont été injectés pour séparation chromatographique sur une colonne Acquity HSS C18 (150 x 2,1 mm 1,8 µm) (Waters, Milford, MA, USA) maintenue à 50°C. Les phases mobiles étaient constituées d'une solution d'eau de formiate d'ammonium 5 mM avec 0,1% d'acide formique (A) et de 0,1% d'acide formique dans acetonitrile (B). La séparation est réalisée en mode gradient (Tableau 1). La détection a

été effectuée à l'aide d'un spectromètre de masse quadripolaire à temps de vol (QTOF) (XEVO G2-XS QTOF, Waters, Milford, MA, USA) en utilisant deux modes d'acquisition (Data-independent Analysis de type MSe et Data-Dependent Analysis de type Fast-DDA) en ionisation positive.

Tableau 1: Gradient de séparation chromatographique

TEMPS (MIN)	PHASE MOBILE A %	PHASE MOBILE B %
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

Les paramètres du Xevo® G2-QTOF (Waters) qui a été utilisé pour la détection, et qui était équipé d'une interface d'ionisation de type Z-spray en mode positif, sont les suivants :

- 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

Les paramètres d'acquisition des données en mode MSe sont les suivants :

- Fonction 1 : 100 – 1000 m/z sans application de l'énergie de collision pendant 0,2 seconde
- Fonction 2 : 50 – 1000 m/z avec une rampe de l'énergie de collision de 10 à 40 eV pendant 0,2 seconde

Les paramètres d'acquisition des données en mode Fast-DDA sont les suivants :

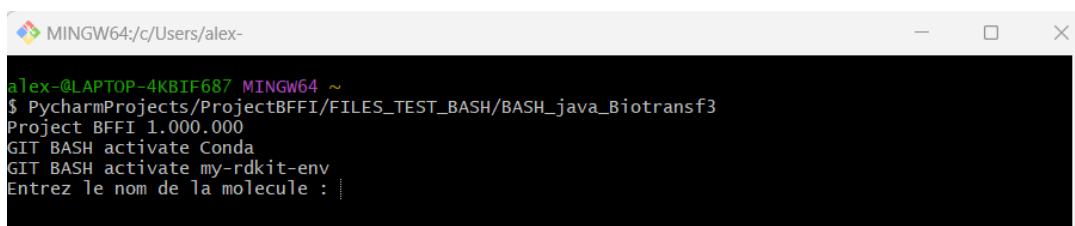
- Fonction MS 1 :
 - o 50-1000 m/z pendant 0,1 seconde avec la bascule vers le mode SM/SM avec l'intensité de signal de masse au-dessus de 5000 coups,
 - o Dé-isotopage des pics du spectre MS1,
 - o Application de liste d'exclusion
- Nombre maximal des ions par acquisition SM pouvant être analysé en SM/SM (Top) : 8,
- Fonction SM/SM : 50 – 1000 m/z avec une rampe de l'énergie de collision de 10 à 40 eV pendant 0,05 s par m/z ou jusqu'au l'intensité de signal supérieure à 10 000 coups.

III.4.2 Exploration métabolique *in silico*

Dans le cadre de ce travail de thèse et pour faciliter l'exploration des données acquises dans le cadre d'étude de métabolisme *in vitro*, j'ai développé un outil prédictif *in silico* automatisé. Cet outil est basé sur l'assemblage des 4 algorithmes (scripts) précédemment publiés dans la littérature, pilotés par un script shell (ou BASH) que j'ai écrit, permettant l'automatisation. L'export des résultats de la prédiction est directement applicable sur le logiciel MS-DIAL.

III.4.2.1 Récupération de structure chimique

La récupération de la structure chimique de xénobiotique encodé en « canonical SMILES » est réalisée via l'accès de programmation (Power User Gateway) du répertoire Pubchem (54) à partir du nom de la molécule (Figure 4).



```
alex-@LAPTOP-4KBIF687 MINGW64 ~
$ PycharmProjects/ProjectBFFI/FILES_TEST_BASH/BASH_java_Biotransf3
Project BFFI 1.000.000
GIT BASH activate Conda
GIT BASH activate my-rdkit-env
Entrez le nom de la molecule : |
```

Figure 4: Interface de programmation de l'outil de prédiction

III.4.2.2 Prédiction des métabolites

L'outil Biotrasformer 3.0 est ensuite exécuté sur une base de langage de programmation JAVA script (55) permettant la prédiction des métabolites selon les paramètres suivants :

- Transformations métaboliques : AllHuman (Human and Human Gut Microbial Transformation),
- CYP450 mode : combiné (c'est-à-dire regroupant les prédictions de l'outil de machine learning CyProduct et les prédictions basées sur les règles du métabolisme),
- Nombre d'itérations de réaction à calculer : 2 (c'est-à-dire, prédictions réalisées en 2 niveaux : métabolites primaires et métabolites secondaires).

L'extrait du fichier des prédictions des métabolites du MDMB-INACA est présenté dans la Figure 5.

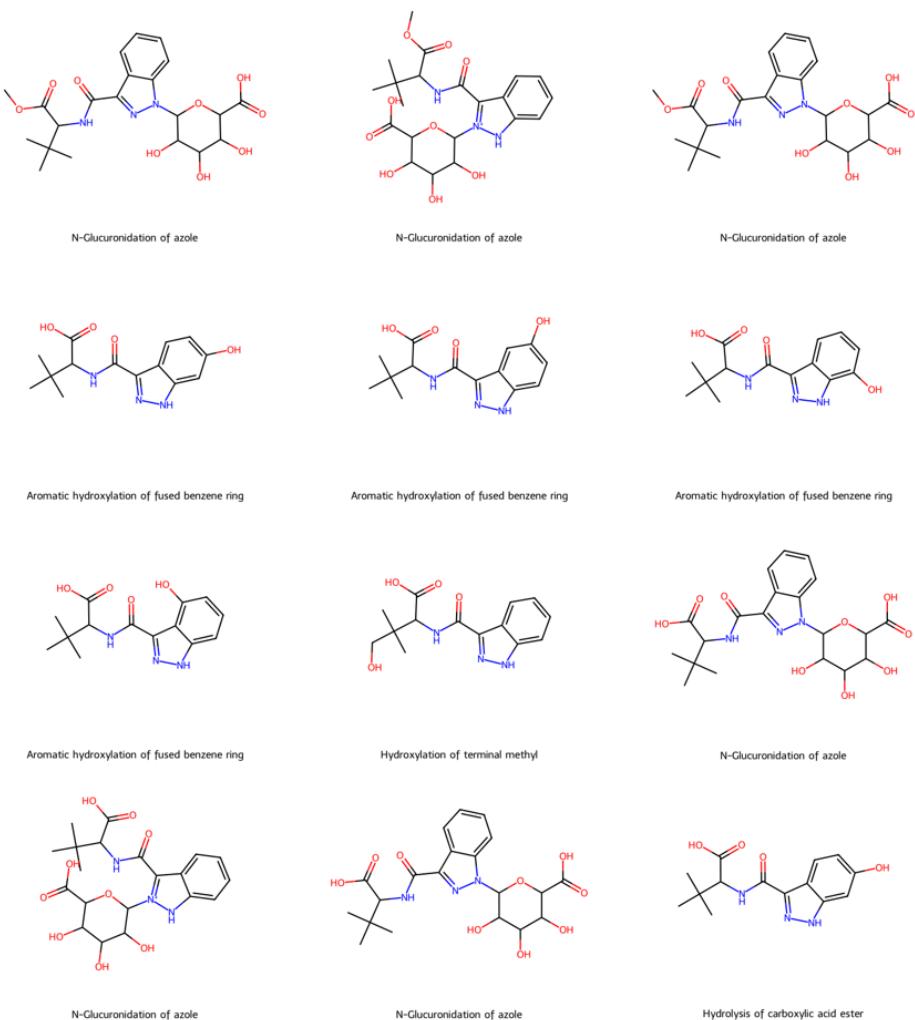


Figure 5: Extrait du fichier des prédictions de la structure des métabolites du MDMB-INACA

III.4.2.3 Prédiction des métabolites

A partir des métabolites prédits, le script CFM-ID 4.0 est exécuté en docker image (Python) (56) permettant la prédition de spectre de fragmentation de la molécule mère et des métabolites prédits. Les paramètres suivants sont appliqués : électrospray (ESI) en ionisation positive pour l'ion pseudomoléculaire protoné $[M+H]^+$ avec trois énergies de collision : 10 eV, 20 eV et 40 eV.

III.4.2.4 Prédiction de temps de rétention

Le script Message-passing neural network-retention time (MPNN-RT) (57) est exécuté en langage de programmation Python permettant la prédition de temps de rétention de la molécule mère et des métabolites prédits. L'avantage de cet algorithme réside dans la possibilité d'ajuster le modèle entraîné sur un grand nombre des molécules (80 038 molécules de METLIN SMRT) sur un système chromatographique avec les différents paramètres en lien. Pour cela « le transfert des connaissances » en deux étapes a été réalisé en utilisant les structures et les temps de rétention (environ 1000 molécules) de la base de données de screening utilisé dans le laboratoire, et 216 autres structures ont été employées pour l'évaluation du modèle final. Les résultats d'évaluation sont présentés dans la Figure 6,A : 12,5%

des prédictions sont réalisées avec un écart de plus de +/- 2 min par rapport au temps de rétention mesuré, le R² est à 0,85 et l'erreur moyenne quadratique est de 1,72 min² sur le temps d'acquisition total de 14 min. Ces résultats sont en cohérence avec la grande diversité des structures chimiques des molécules xénobiotiques et de gradient séquentiel utilisé dans la méthode employée. La modèle de prédiction a été également évalué rétrospectivement sur 100 structures des cannabinoïdes de synthèse et leurs métabolites, n'ayant pas été entrés initialement dans l'entraînement initial du modèle (Figure 6, B). Les résultats ont démontré que 3% des prédictions présentent un écart de plus de +/- 1,5 min par rapport au temps de rétention mesuré, et que 11% des prédictions présentent un écart de plus de +/- 1 min par rapport au temps de rétention mesuré. Le R² est à 0,92 et l'erreur moyenne quadratique est à 0,4 min² sur le temps d'acquisition de 14 min.

Cette différence notable entre les résultats d'évaluations sur les structures de l'ensemble des xénobiotiques, et spécifiquement sur les SCRA, peut être expliquée par une homologie dans les structures des SCRA, ce qui leur permet d'ailleurs d'activer les récepteurs CB1 et CB2 (Figure 7). Ils possèdent un noyau principal, les plus répandus étant les noyaux indole ou indazole. Ce noyau est relié par un pont (carboxamide, carboxylate, ...) à un substitut pouvant être un phényle, une pipérazine, ... [10]. Sur la base de ces résultats, la limite de tolérance de l'écart entre les temps de rétention prédit et mesuré pour l'étude de métabolisme des SCRA a été défini à +/- 1,5 min.

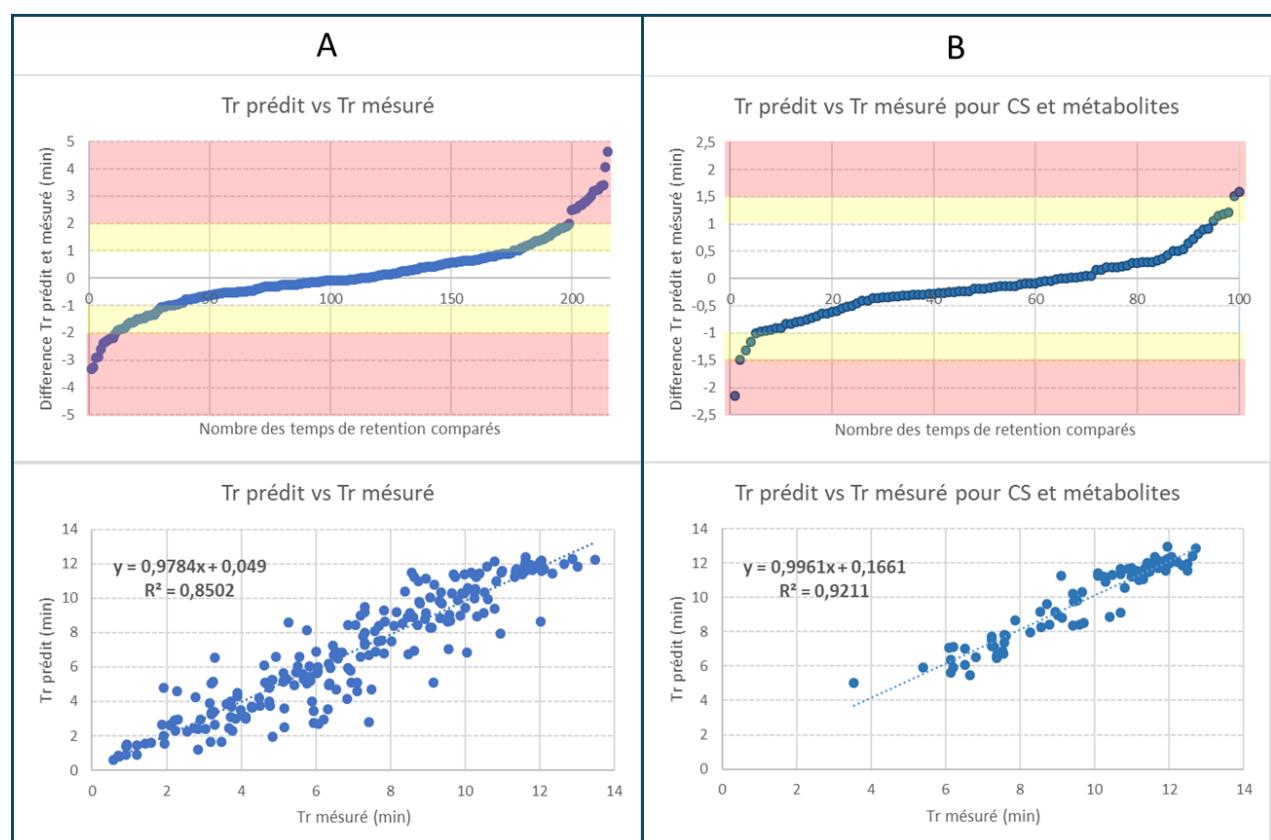
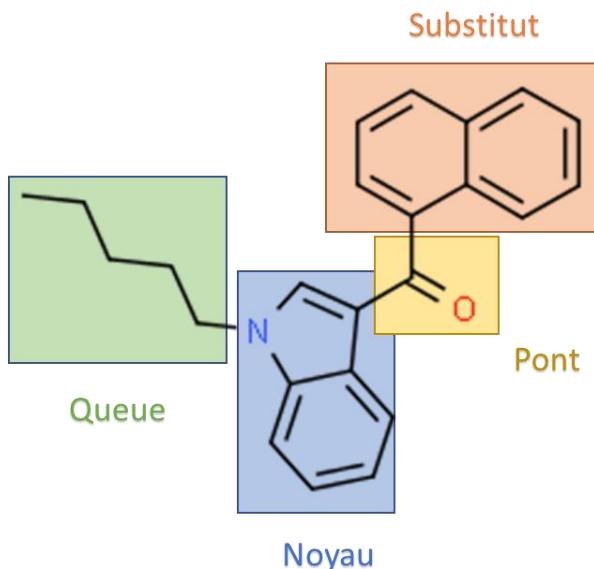


Figure 6: Comparaison du temps de rétention prédit et mesuré pour 1 000 molécules (a) et spécifiquement pour les cannabinoïdes de synthèse (b).



JWH-018

Figure 7: Pharmacophore des SCRAs au travers de la structure de JWH-018.

III.4.2.5 Exploitation des résultats sur MS-DIAL et création du réseau moléculaire

En étape finale, l'ensemble des résultats des prédictions (Figure 8) sont regroupés sous forme de format (.msp) permettant leur utilisation comme base de données de logiciel open-source MS-DIAL 4.0 (58).



Figure 8: Extrait du fichier final des prédictions

A partir de ces résultats, une vérification « manuelle » de l'intégration est bien entendu réalisée. Par la suite, les données, principalement acquises en mode Fast-DDA, sont utilisées pour générer le réseau moléculaire propre à la logiciel MS-Dial, ou dans le logiciel MetGem, avec un « cosine score » à définir à 0,7 (Figure 9) (59).

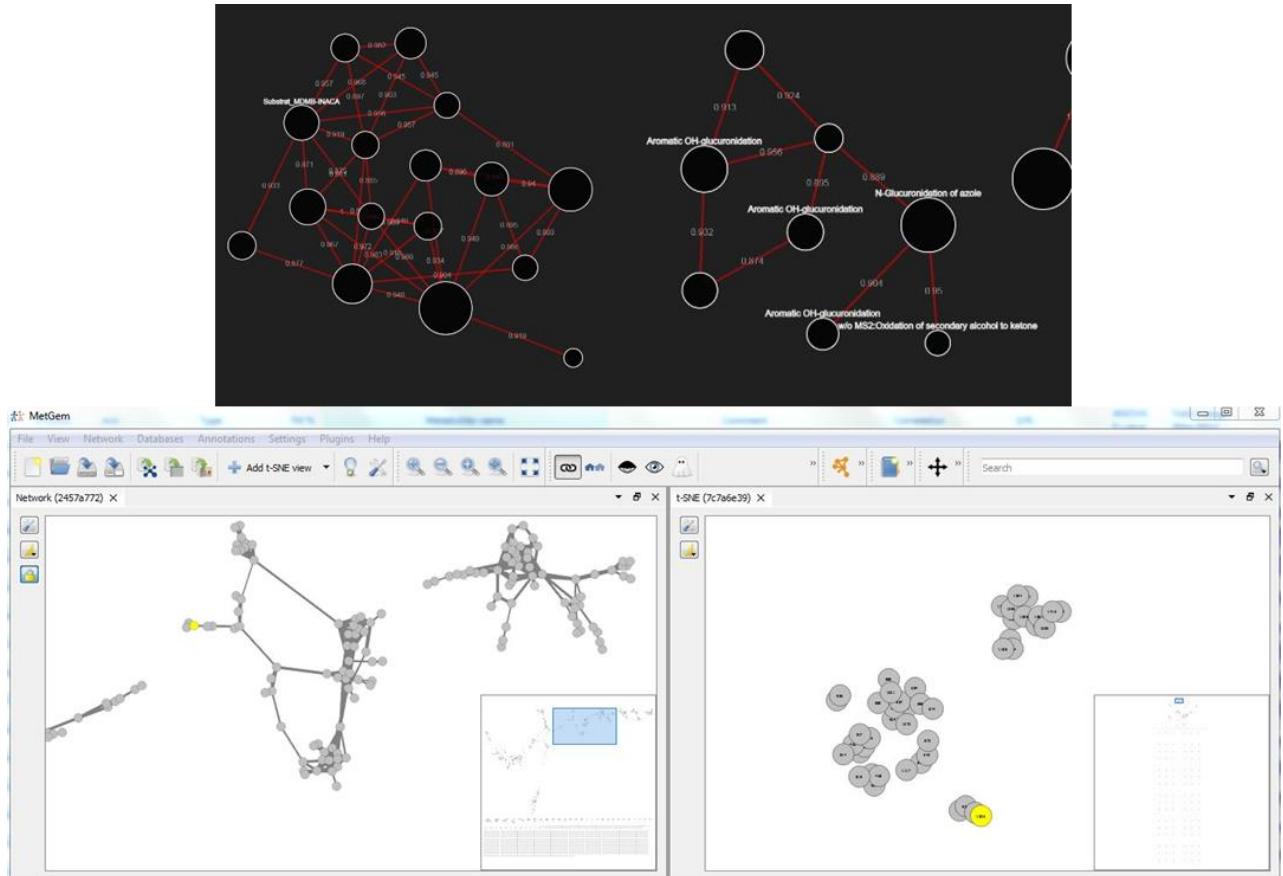


Figure 9: Réseau moléculaire généré par le logiciel MS-Dial (en haut) et MetGem (en bas).

Les données de chaque nœud entrant dans le réseau moléculaire de la substance analysé (ou des métabolites de substance) sont récupérées pour être retraitées dans l'algorithme de prédiction afin de vérifier si l'ion concerné peut correspondre à un métabolite.

Les résultats finaux sont récupérés de le logiciel MS-DIAL sous format d'un fichier EXCEL (Figure 10).

Alignment ID	Pred_RT	Average Rt(r delta_RT (mi)	Metabolite name	Adduct ion	n	Post curation	Fill %	MS/MS incl.	Formula	Ontology	INCHIKEY	SMILES	Comment
2217	5,39	5,94	-0,55 Alkyl-OH-glucuronidation	[M+H] ⁺			0,5	True			UQQQCUVDC(C(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)QWUVSKLPA	CC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)QWUVSKLPA	CC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)
684	6,15	6,381	-0,231 Aromatic hydroxylation of fused benzene ring	[M+H] ⁺		adduct linke	1	True			YMSRPUJFVI	CCC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)YMSRPUJFVI	CCC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)
686	6,15	5,638	0,512 Aromatic hydroxylation of fused benzene ring	[M+H] ⁺		adduct linke	1	True			GDPOLULFHEI	CCC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)GDPOLULFHEI	CCC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)
798	7,57	7,367	0,203 Aromatic hydroxylation of fused benzene ring	[M+H] ⁺		adduct linke	1	True			YH2RFSCRIE	CCC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)YH2RFSCRIE	CCC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)
799	7,57	7,808	-0,238 Aromatic hydroxylation of fused benzene ring	[M+H] ⁺		adduct linke	0,5	True			AEDRGIZQJY	CCC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)AEDRGIZQJY	CCC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)
801	8,56	8,27	0,29 Aromatic hydroxylation of fused benzene ring	[M+H] ⁺		adduct linke	1	True			SKSQVXOTA	CCC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)SKSQVXOTA	CCC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)
802	9,13	8,827	0,303 Aromatic hydroxylation of fused benzene ring	[M+H] ⁺		adduct linke	1	True			CPHMGHIDQI	CCC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)CPHMGHIDQI	CCC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)
2218	6,52	7,036	-0,516 Aromatic OH-glucuronidation	[M+H] ⁺		adduct linke	0,5	True			TUWJLWODL	C(C(C)C(C(=O)O)NC(=O)TUWJLWODL	C(C(C)C(C(=O)O)NC(=O)
2219	6,52	6,096	0,424 Aromatic OH-glucuronidation	[M+H] ⁺		adduct linke	1	True			RERPYHWEX	CCC(C)(C)C(C(=O)O)NC(=O)RERPYHWEX	CCC(C)(C)C(C(=O)O)NC(=O)
2221	6,823	6,536	0,287 Aromatic OH-glucuronidation	[M+H] ⁺		adduct linke	1	True			BFDGWCDH	CCC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)BFDGWCDH	CCC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)
556	7,62	7,754	-0,134 Hydrolysis of carboxylic acid ester	[M+H] ⁺		adduct linke	1	True			BFDGWCDH	CCC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)BFDGWCDH	CCC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)
683	3,54	5,026	-1,486 Hydroxylation of terminal methyl	[M+H] ⁺		adduct linke	1	True			MSAPEUYEF	CCC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)MSAPEUYEF	CCC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)
1999	6,21	5,902	0,308 N-Glucuronidation of azole	[M+H] ⁺		adduct linke	1	True			QEXPVGIGO	CCC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)QEXPVGIGO	CCC(C)(C)C(C(=O)OC)NC(=O)
2100	7,37	6,64	0,73 N-Glucuronidation of azole	[M+H] ⁺		adduct linke	0,5	True					
2101	7,37	6,476	0,894 N-Glucuronidation of azole	[M+H] ⁺		adduct linke	1	True					
2220	6,65	5,49	1,16 N-Glucuronidation of azole	[M+H] ⁺		adduct linke	1	True					
664	9,66	10,297	-0,637 Substrat_MDMB-INACA	[M+H] ⁺		adduct linke	1	True					

Figure 10: Résultats finaux récupérés à partir de logiciel MS-Dial.

Ce sont ces données qui ont permis d'établir la liste des 16 métabolites du MDMB-INACA proposés dans l'article 6.

[Article 6, page 72](#)

III.4.3 Discussion et les limites

Ce travail a permis la mise au point d'un outil *in silico* de prédiction à la fois du métabolisme et des paramètres analytiques de biomarqueurs (métabolites) d'exposition à des SCRAs. L'avantage de cet outil est son adaptabilité avec une possibilité d'utilisation dans un périmètre élargi en toxicologie biologique et médicolégale.

Toutefois, il également est important de souligner les faiblesses de cette méthode *in silico* que je propose :

1. La nature de l'outil de prédiction des métabolites *in silico* présente des imperfections liées aux modèles prédictifs avec un risque non négligeable de faux positifs et de faux négatifs, qui ne permet pas de s'affranchir de l'expertise humaine ;
2. La quantité importante de données générées par l'outil nécessite un retraitement approfondi des données finales ;
3. L'exécution du script s'effectue via des lignes de code BASH et cet outil est dépourvu d'interface graphique, ce qui requiert des connaissances informatiques avancées ;
4. La prédiction des paramètres en spectrométrie de masse est limitée à l'ion [M+H]⁺ ;
5. La limite de tolérance (+/- 1,5 min) choisie pour l'écart entre les temps de rétention prédit et mesuré demeure élevée

IV – TRAVAUX APPLICATIFS

IV.1 ELICSIR

Par rapport à la population générale, les personnes souffrant d'une infection chronique par le virus de l'hépatite C (VHC) présentent un risque plus élevé d'insulinorésistance (IR) en fonction de leur génotype. L'IR contribue à son tour à l'apparition du diabète, à l'augmentation du risque cardiovasculaire (60) et à la progression de la stéatose et de la fibrose hépatique (61–63). Cette progression de la maladie VHC peut être influencée par la co-infection par le VIH et les antécédents associés (immunosuppression et inflammation systémique, exposition à des médicaments antiviraux spécifiques), ainsi que par des modes de vie (64–68) tels que des habitudes alimentaires, la consommation d'alcool ou le tabagisme. Ces facteurs sont susceptibles d'interagir et donc de favoriser le développement ou la progression des complications métaboliques et/ou hépatiques (69–71). Des études antérieures ont souligné l'importance de certains comportements, comme la consommation de boissons alcoolisées, dans la morbidité liée au VHC (72) et son impact sur la fibrose et la stéatose (66,67,73). Plus récemment, une étude longitudinale basée sur la cohorte ANRS CO13 HEPAVIH a confirmé l'effet néfaste du tabagisme sur la mortalité liée au VHC. Cependant, de source déclarative par les patients en réponse aux questions d'un questionnaire médical, une consommation élevée de café et un usage régulier de cannabis se sont avérés négativement associés à la mortalité liée au VHC, probablement en raison des propriétés anti-inflammatoires de ces deux substances (74). En outre, la consommation autodéclarée de cannabis a été associée à une réduction de la stéatose hépatique et de la résistance à l'insuline, mesurée par le modèle d'évaluation de la résistance à l'insuline (HOMA-IR), chez les personnes co-infectées par le VIH et le VHC (67,75), chez les personnes mono-infectées par le VHC (76), ainsi que dans la population générale (77,78).

En effet, les personnes souffrant d'inflammation chronique induite par le VIH et le VHC peuvent particulièrement souffrir de comportements pro-inflammatoires spécifiques (consommation d'alcool et tabagisme), mais également bénéficier de modes de vie anti-inflammatoires (incluant la consommation de café et/ou de cannabis). Ces comportements/modes de vie peuvent reposer sur un mécanisme complexe qui doit encore être exploré, et impliquer des marqueurs inflammatoires, le système endocannabinoïde (79), le système métabolique et la fonction hépatique (80–82). La co-infection VIH-VHC permet d'explorer de manière innovante l'influence des comportements pro- et anti-inflammatoires, de la guérison du VHC et du fonctionnement du système endocannabinoïde sur les troubles métaboliques. Dans ce contexte, l'indice HOMA-IR est un biomarqueur intéressant, qui permet non seulement de prédire la résistance à l'insuline mais également, avec des seuils appropriés, les complications métaboliques et hépatiques (83,84).

ELICSIR est un projet de recherche utilisant les données cliniques et comportementales de la cohorte ANRS CO13 HEPAVIH afin d'étudier l'influence des comportements pro- et anti-inflammatoires sur les marqueurs inflammatoires, les endo et exo cannabinoïdes et l'IR (en utilisant l'HOMA-IR) chez les individus co-infectés VIH-VHC à l'ère des nouveaux traitements contre le VHC. L'analyse de la régulation de l'ECs et de sa relation avec l'histoire clinique, la guérison du VHC, les comportements addictifs et les marqueurs inflammatoires représente une approche innovante pour mieux comprendre l'apparition et la progression des complications métaboliques et hépatiques. De plus, ELICSIR a pour but d'identifier de nouveaux marqueurs de la progression des maladies métaboliques et hépatiques, basés sur le système endocannabinoïdes, et ainsi d'améliorer la prise en charge clinique et les résultats à long terme des personnes vivants avec le VIH et/ou le VHC.

Le projet ELICSIR est donc une étude cas-témoins emboîtée dans la cohorte ANRS CO13 HEPAVIH, comparant les participants avec un HOMA-IR $> 2,77$ et ceux avec un HOMA-IR $\leq 2,77$ dans les 36 mois avant la guérison du VHC (groupe 1). Une seconde mesure du HOMA-IR est réalisée chez les mêmes participants dans les 36 mois après la guérison du VHC (groupe 2) pour répondre aux objectifs secondaires de l'étude. Sont éligibles pour l'étude les participants guéris du VHC, ayant des données disponibles sur l'HOMA-IR, la consommation éventuelle de substances et deux prélèvements de sérum réalisés dans les 36 mois avant la guérison et dans les 36 mois après la guérison du VHC. Nous avons également récupéré les données médicales enregistrées dans la cohorte, ainsi que les données déclarées par les participants *via* les auto-questionnaires.

L'objectif principal de ce projet est d'étudier la relation entre cannabinoïdes sériques et insulinorésistance (HOMA-IR) avant la guérison VHC, chez les participants coinfestés VIH-VHC de la cohorte ANRS CO13 HEPAVIH. Les objectifs secondaires sont : évaluer l'association entre cannabinoïdes sériques et fibrose hépatique (mesurée par le FIB-4) avant la guérison VHC ; mesurer l'effet de la guérison VHC sur les ECs, les marqueurs inflammatoires, l'HOMA-IR et le FIB-4 ; estimer l'association entre d'autres xénobiotiques sériques (alcool, cannabis et autres drogues) et HOMA-IR, FIB-4 et marqueurs inflammatoires ; évaluer la concordance entre usage auto-déclaré de substances psychoactives et biomarqueurs sérologiques de consommation ; explorer l'effet de l'âge et du sexe sur les cannabinoïdes sériques.

Pour répondre à ces objectifs, la recherche et le dosage de phytocannabinoïdes, de produits stupéfiants et leurs métabolites, d'éthylglucuronide (ETGS), de médicaments psychoactifs, de nouvelles substances psychoactives (NPS, incluant les SCRAs), et le criblage large non ciblé de xénobiotiques, ont été réalisés par les méthodes dédiées en CL-SM/SM et CL-SMHR de type qTOF.

Les ECs ont été dosé par la méthode précédemment décrite.

[**Article 4, page 70**](#)

Ces analyses ont été complétées avec les dosages des interleukines IL-1beta, TNF-alpha, Il-6 et IL-10 par ELISA et de protéine C réactive (CRP) par l'immunoturbidimétrie.

IV.1.2 Résultats préliminaire du projet ELICSIR

IV.1.2.1 Endocannabinoïdes et guérison VHC

Au total, 518 prélèvements sanguins (513 plasmas et 5 sérum) prélevés entre 2006 et 2021, correspondant à 270 patients, ont été analysés en double aveugle. Les 248 patients avec deux points de suivi (avant et après la guérison) et les 22 patients avec un seul point de suivi.

Les valeurs des ECs observées dans la population étudiée (Tableau 2) sont de l'ordre des valeurs rapportées dans la littérature, hormis le OEA qui a une tendance d'être légèrement supérieure aux valeurs rapportées.

Tableau 2 : Concentrations plasmatiques des endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like obtenues à partir des échantillons du protocole ELICSIR.

	Moyenne (µg/L)	Médiane (µg/L)	Etendu (µg/L)	Valeurs usuelles (µg/L)
AEA	0,83	0,72	[0,1 – 3]	[0,24 – 0,88]
2-AG/1-AG	6	3,55	[0,4 – 52,2]	[1,97 – 4,14]
OEA	5,13	4,49	[0,57 – 28]	[1,2 – 15]
PEA	5,04	4,47	[0,92 – 27]	[1,77 – 6,3]

[Article 4, page 70](#)

L'analyse en composante principale démontre que les concentrations de PEA et OEA ont une tendance de se comporter de manière similaire dans les échantillons de cette population comparant à AEA et 2-AG/1-AG (Figure 11). Ces résultats sont cohérents avec une corrélation positive entre les deux molécules (PEA et OEA).

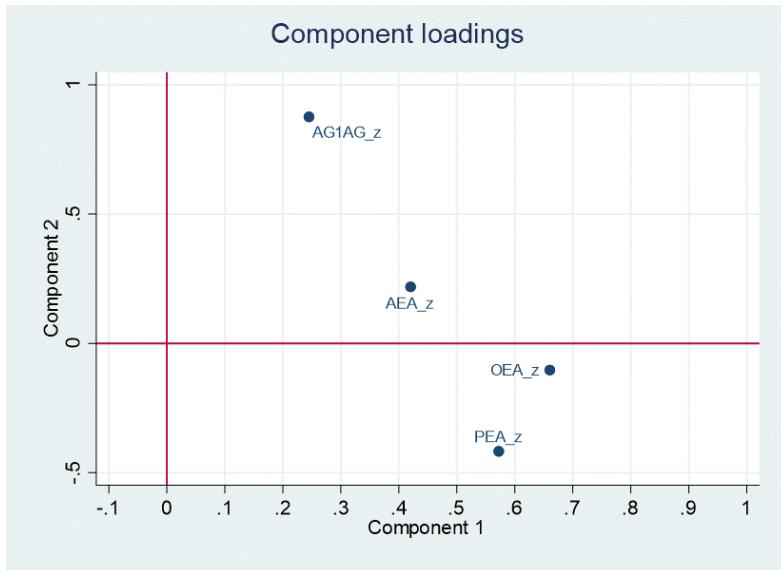


Figure 11: Analyse en composante principale des concentrations en endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like.

La comparaison des concentrations en ECs avant et après la guérison démontre une augmentation significative de l'AEA ($p\text{-value} = 0,005$, Wilcoxon 95%) après la guérison (Figure 12). Ces résultats sont cependant contraires aux données de la littérature. En effet, Patsenker *et al.* (85) rapportent une augmentation significative des concentrations plasmatiques d'AEA et de 2-AG chez les patients infectés par le VHC par rapport aux patients sains. Beyoğlu *et al.* (86) rapportent également des résultats similaires pour l'AEA. Cependant, les auteurs montrent des concentrations plus faibles de 2-AG chez les personnes séropositives pour le VHC par rapport aux personnes en bonne santé, contrairement à l'étude de Patsenker *et al.* La différence constatée entre cette étude et les études précédentes peut être expliquée par la co-infection avec VIH de la population étudiée, ainsi que par la comparaison longitudinale des concentrations des ECs dans l'étude ELICSSIR. De plus, le traitement antirétroviral, la fonction hépatique et l'inflammation systémique ont pu influencer les concentrations d'ECs.

Enfin, un biais potentiel subsiste : les échantillons analysés ont subi un délai de stockage important, ce qui pourrait potentiellement influencer les résultats des dosages des ECs.

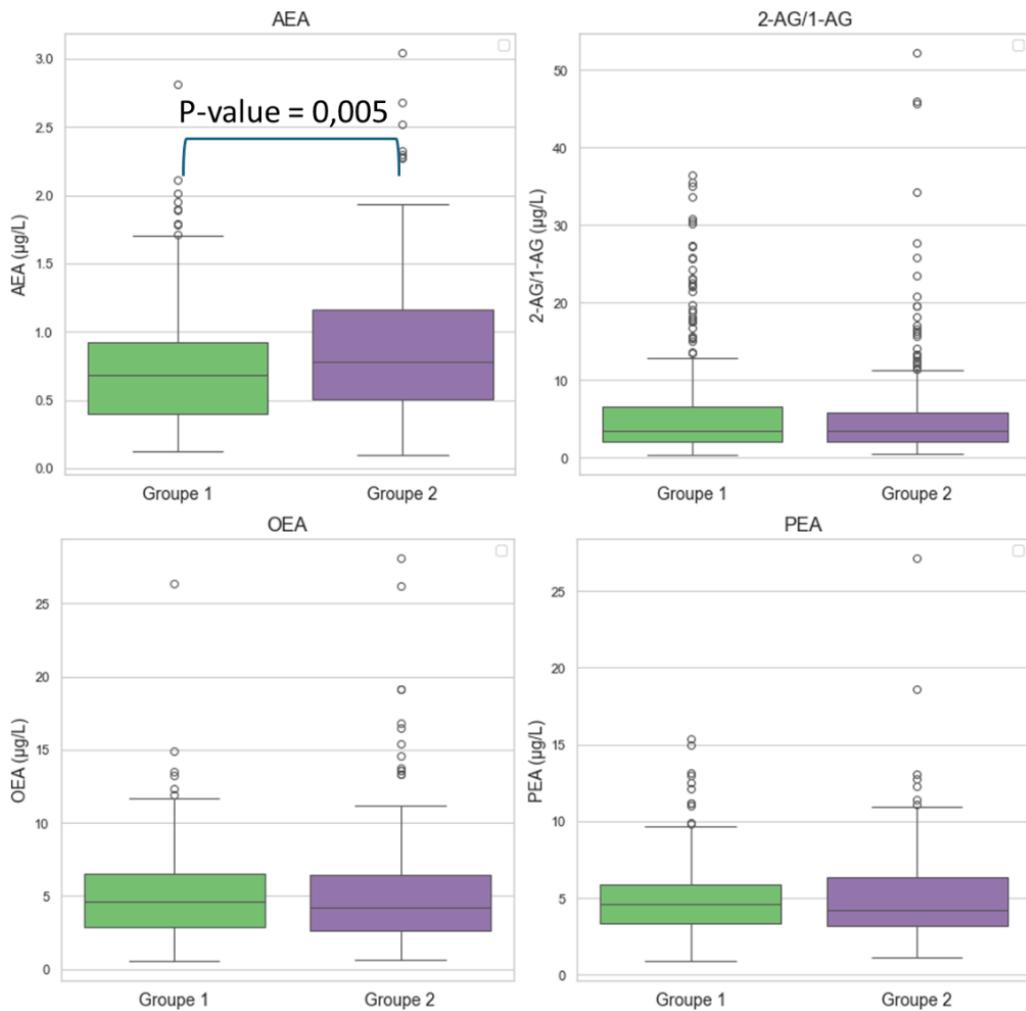


Figure 12: Comparaison des concentrations plasmatiques d'endocannabinoïdes et d'endocannabinoïdes-like avant (groupe 1) et après (groupe 2) guérison de VHC.

IV.1.2.2 Phytocannabinoïdes dans la population co-infectée VIH-VHC

Des phytocannabinoïdes et/ou leurs métabolites ont été détectés dans 145/518 échantillons [$\Delta 9$ -THC et métabolites (n=135), THC-COOH seul (n=6)], correspondant à 69 patients dans le groupe 1 et 76 patients dans le groupe 2. Sur l'ensemble de la population, 60 patients ont eu les 2 prélèvements positifs ($\Delta 9$ -THC et/ou THC-COOH). Six patients ont eu que leur premier prélèvement positif et 14 patients ont eu que leur second prélèvement positif (Tableau 3). Une concentration en THC-COOH supérieure à 50 µg/L a été retrouvée dans 29 des prélèvements positifs.

Tableau 3 : Présence de Δ9-THC et métabolites dans la population étudiée avant (groupe 1) et après (groupe 2) de la guérison de VHC.

	Groupe 1	Groupe 2			Positif 2	Négatif 2	
Présence	69	76		Positive 1	60	6	66
Absence	186	187		Négatif 1	14	168	182
Total	255	263		Total	74	174	248

Les molécules les plus fréquemment retrouvées (autres que les antirétroviraux, la caféine et la nicotine) dans les prélèvements positifs au Δ9-THC sont représentées dans la Figure 13.

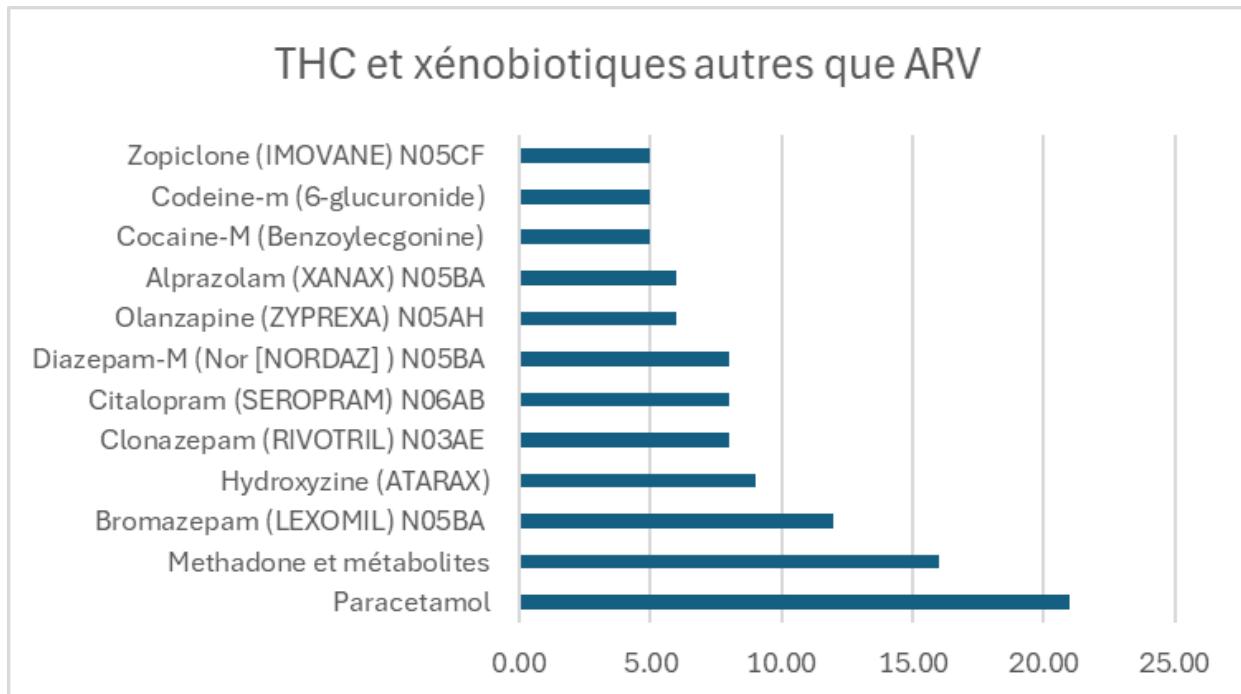


Figure 13 : Molécules les plus fréquemment retrouvées dans les prélèvements positifs au Δ9-THC et/ou ses métabolites.

Il existe donc une co-consommation de nombreuses substances psychoactives, telles que la méthadone, la cocaïne, les anxiolytiques (benzodiazépines ou apparentés, l'hydroxyzine), des antidépresseurs (citalopram), des antipsychotiques (olanzapine) et la codéine.

IV.1.2.3 Consommation de cannabis et endocannabinoïdes

La comparaison des concentrations des ECs chez des patients consommateurs et non consommateurs de cannabis avant et après la guérison n'a pas démontré une différence significative. La comparaison de ces données avec la littérature demeure complexe compte tenu (i) d'un nombre limité d'études qui s'intéresse à l'influence de consommation de cannabis sur les concentrations des ECs dans le sang périphérique, (ii) de résultats souvent contradictoires entre les auteurs. Dans le périmètre des études pré-cliniques, les données de littérature démontrent qu'une exposition chronique aux cannabinoïdes augmente la clairance enzymatique de l'AEA et réduit la teneur en AEA dans les tissus cérébraux chez les rongeurs (87,88). Dans le périmètre clinique, l'exposition des volontaires sains (non consommateurs de cannabis) à une seule dose de Δ9-THC provoque une augmentation transitoire des concentrations en AEA (89), associé à une augmentation de 2-AG, PEA et OEA (90). Les fumeurs réguliers de cannabis présentent une diminution des taux d'AEA en lien avec la diminution d'expression de fatty acid amide hydrolase (FAAH) (91) et une augmentation des taux de 2-AG dans le sang (92) bien qu'une augmentation des taux sériques d'AEA soit observée après au moins 6 mois d'abstinence (93). Toutefois, les travaux de 2 autres auteurs démontrent une augmentation d'AEA dans le sang périphérique des consommateurs réguliers de cannabis (93,94) et les travaux de Morgan et *al.* n'ont pas mis en évidence d'une différence significative des concentrations en AEA, OEA et PEA dans le sang périphérique des consommateurs (92).

IV.1.2.4 Phytocannabinoïdes, endocannabinoïdes et interleukines

Les résultats (Figure 14) obtenus démontrent des concentrations plus faibles en TNF-alpha (IL proinflammatoire) chez des consommateurs modérés (THC-COOH libre < 50 µg/L) du cannabis dans le groupe 1 (avant la guérison du VHC).

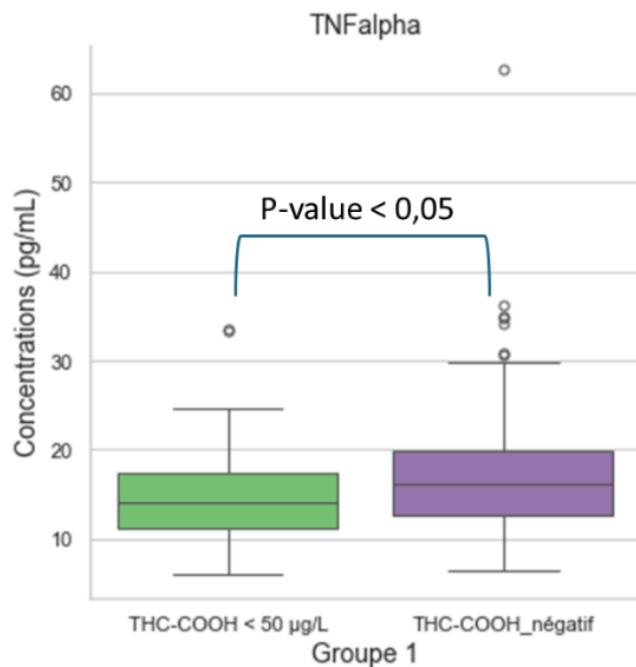


Figure 14: Comparaison des concentrations plasmatiques de TNF-alpha chez les sujets avant la guérison du VHC, entre les échantillons négatifs au THC-COOH et les échantillons positifs en THC-COOH (concentration en THC-COOH libre inférieur à 50 µg/L).

Nous observons également d'un corrélation négative significative ($p\text{-value} < 0,05$) entre les concentrations en THC-COOH et les concentrations en TNF-alpha (Figure 15) chez des consommateurs modérés du cannabis (THC-COOH libre < 50 µg/L). Ces résultats sont en faveur des effets anti-inflammatoires associés à la consommation de cannabis en cohérence avec les données de littérature (95,96).

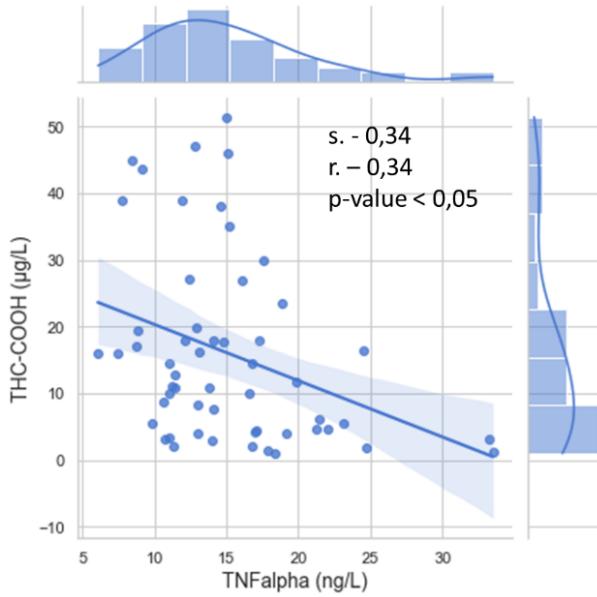


Figure 15: Corrélation entre les concentrations plasmatiques de THC-COOH libre (inférieures à 50 µg/L) et de TNF-alpha dans les échantillons avant la guérison du VHC.

L'analyse de corrélation dans la population des non consommateurs du cannabis avant la guérison démontre une tendance à une corrélation négative entre AEA et IL-10, et une corrélation positive entre 2-AG/1-AG et IL6 et TNFalpha (Figure 16).

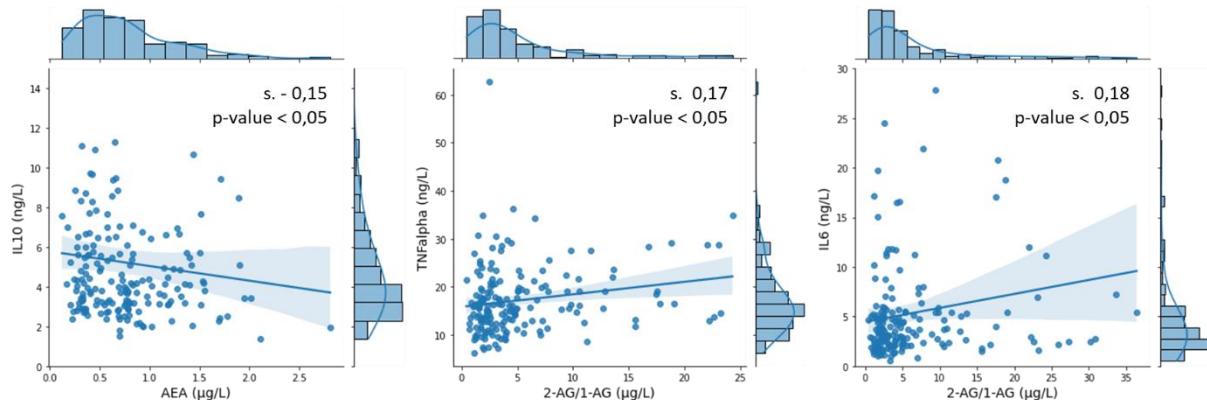


Figure 16: Corrélations entre les endocannabinoïdes (AEA et 2-AG/1-AG) et les cytokines (IL10, TNF-alpha et IL6).

La comparaison des concentrations en interleukines démontre d'une diminution significative des concentrations en IL-10 et TNFalpha après la guérison, comparable avec une diminution de l'inflammation en lien avec la guérison de VHC (Figure 17).

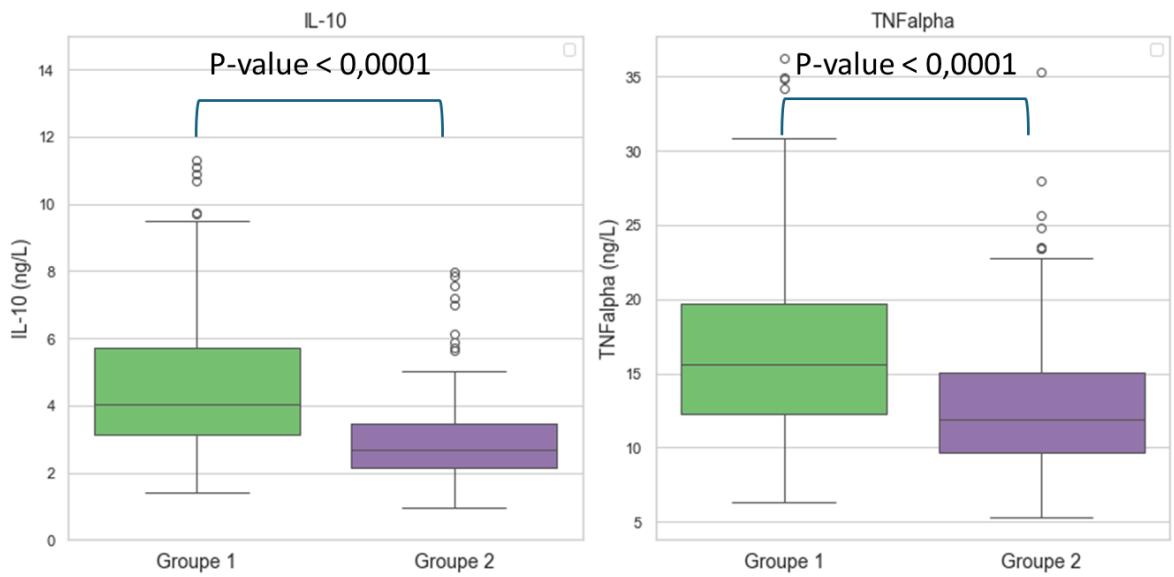


Figure 17: Comparaison des concentrations en IL-10 et TNF-alpha avant (groupe 1) et après (groupe 2) la guérison du VHC.

IV.2 CHASSE-MAREE

Depuis 2011, Mayotte, département d'outre-mer français situé dans le canal du Mozambique, fait face à une substance portant le nom la « chimique » contenant des SCRAs.

La « chimique » a fait son apparition à Mayotte entre 2010 et 2012 *via* un consommateur de cannabis venant de la métropole, employé au Conseil général de Mayotte, qui aurait expérimenté des NPS et notamment des SCRAs. Par la suite, la consommation se diffuse sur le territoire grâce au trafic de rue. Selon les données récoltées entre 2012 et 2019, la consommation de la « chimique » touche principalement la population des jeunes adultes avec 16,9% de mineurs (moins de 17 ans) et l'âge médian à 28 ans (8 ans – 75 ans).

Le projet « Chasse-marée » résulte d'une initiative du Centre Universitaire de Formation et de Recherche de Mayotte (CUFR) en collaboration avec la Prévention et soin des addictions de Mayotte (POPAM), l'Université Paris-Saclay, les Centres Hospitaliers Universitaires de Mayotte, Lille et Bordeaux et l'OFDT. L'objectif de cette étude est de caractériser la composition pharmacologique de la « chimique », d'étudier les potentielles hétérogénéités dans sa composition au fil du temps et d'explorer le métabolisme *in vitro* des SCRAs afin d'identifier les marqueurs pour une application future dans des études épidémiologiques dans les eaux usées.

Pendant 12 mois, des échantillons ont été récoltés sur les différentes communes de l'île grâce à 8 campagnes de prélèvements. Ces campagnes sont mises en place par le POPAM. Chaque échantillon est recueilli auprès des utilisateurs. Différentes formes ont été collectées : de la « chimique » associée à du tabac pour la majorité, sous forme de poudre ou encore sous forme de cigarette. Pour chaque échantillon récolté, un questionnaire est rempli par le consommateur, accompagné par le collecteur. Ce document permet de décrire des informations larges comme les données psychosociales de l'usager (telles que l'âge, le sexe ou le lieu de résidence), son environnement et ses conditions d'hébergement. Il interroge également sur des notions liées à l'usage de drogues comme ses habitudes de consommation et en particulier celle de la « chimique » mais également ses attentes face à leur addiction. A la suite de l'analyse des différents échantillons, les consommateurs sont informés des résultats et découvrent la composition réelle de leurs échantillons.

Huit collectes ont été réalisées entre 2022 et 2023, soit au total 215 échantillons envoyés au laboratoire de toxicologie de Lille pour être analysés.

Les résultats préliminaires et finaux de ces analyses ont fait l'objet de 2 publications (Article 7 et 8) et sont résumés dans le Tableau 4.

[Article 7, page 73](#)

[Article 8, page 74](#)

Tableau 4 : Proportions des échantillons comportant les éléments d'intérêt par campagne (Vert : >50%, Orange : entre 20% et 50% ; Orange clair : entre 10% et 20% ; Jaune : <10%)

		Campagne 1	Campagne 2	Campagne 3	Campagne 4	Campagne 5	Campagne 6	Campagne 7	Campagne 8
Cannabinoïdes de synthèse	5C-APINACA	3 (9,7%)	0	0	0	0	0	0	0
	4F-ABINACA	0	1 (3,4%)	0	0	0	0	0	0
	4F-MDMB-BICA	0	7 (24 %)	0	0	0	0	0	0
	ADB-BUTINACA	5 (16%)	7 (24%)	3 (15 %)	5 (19%)	4 (11%)	1 (5,9%)	2 (7,7%)	0
	ADB-FUBIATA	15 (48%)	5 (17%)	5 (25%)	0	0	0	0	0
	ADB-4en-PINACA	0	0	0	0	0	0	2 (7,7%)	0
	AFUBIATA	0	5 (17%)	6 (30 %)	11 (42%)	11 (31 %)	0	0	0
	CH-PIATA	14 (45%)	0	0	7 (27%)	1 (2,9%)	2 (12%)	0	0
	BZO-HEXOXIZID	2 (6,5%)	0	0	0	0	0	0	0
	MDMB-4en-PINACA	17 (54%)	12 (41%)	6 (30%)	0	14 (40%)	6 (35%)	3 (12%)	29 (94%)
	MDMB-INACA	10 (32%)	3 (10%)	3 (15%)	3 (12%)	14 (40%)	6 (35%)	2 (7,7%)	22 (71%)
	BZO-4en-POXIZID	0	0	0	1 (3,9%)	0	0	0	0
	5F-BZO-POXIZID	0	0	0	1 (3,9%)	13 (37%)	0	0	0
Nicotine		24 (77%)	28 (97%)	16 (80%)	22 (85%)	32 (91%)	13 (76%)	22 (85%)	30 (97%)
Cannabinoïdes	THC	1 (3,2%)	1 (3,5%)	0	5 (19%)	2 (5,7%)	0	0	0
	CBN	1 (3,2%)	1 (3,5%)	0	3 (12%)	0	0	0	0
	CBD	1 (3,2%)	1 (3,5%)	0	3 (12%)	0	0	0	0
Autres	Amantadine	2 (6,5%)	3 (10%)	6 (30%)	7 (27%)	0	0	0	0
	Cyamémazine	0	6 (21%)	0	0	0	0	0	0
	Acétaminophène	3 (9,7%)	0	0	0	1 (2,9%)	1 (5,9%)	0	0
	Bromazolam	4 (13%)	0	0	9 (35%)	1 (2,9%)	1 (5,9%)	2 (7,7%)	1 (3,2%)
	Desalkylgidazepam	0	0	0	0	0	1 (5,9%)	0	0
Nombre d'échantillons		31	29	20	26	35	17	26	31

IV.2.1 Etude *in vitro* et *in silico* du métabolisme des cannabinoïdes de synthèse

Dans le cadre du protocole « Chasse-marée », l'étude de métabolisme de 13 SCRA (MDMB-INACA, 5C-APINACA, 5F-BZO-POXIZID, ADB-BUTINACA, ADB-FUBIATA, AFUBIATA, AKB-48-F, BZO-4en-POXIZID, CH-PIATA, MDMB-4en-PINACA, BZO-HEOXIZID, ADB-4en-PINACA et 4F-MDMB-BICA) a été réalisée selon la méthodologie proposée précédemment (chapitre II.4). Les résultats sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5: Transformations majoritaires retrouvées après l'étude de métabolisme *in silico* et *in vitro*. [% aire d'intensité : pourcentage de rapport des aires des métabolites vs l'aire de la molécule mère respective]

Molécule-mère	Nombre total de métabolites détectés	Métabolites	Biotransformations majoritaires	% aire d'intensité
MDMB-INACA	16	M01	Hydrolyse de fonction ester	86
		M06	Hydroxylation	23
		M10	O-glucuronidation	52
		M15	N-glucuronidation de l'azole	59
MDMB-4en-PINACA	25	M01	Hydrolyse de fonction ester	5
		M10	Hydrolyse de fonction ester et dihydroxylation	18
ADB-BUTINACA	26	M05	Hydroxylation	42
		M06	Hydroxylation	34
		M08	OH-glucuronidation	16
		M12	OH-glucuronidation	25
AFUBIATA	19	M03	Hydrogénéation et déshydrogénéation	39
		M04	OH-glucuronidation	9
		M05	OH-glucuronidation	13
		M08	Dihydrogénéation	20
		M09	Dihydrogénéation	9
CH-PIATA	25	M03	Hydroxylation	48
		M10	OH-glucuronidation	43
		M11	OH-glucuronidation	43
		M12	Dihydroxylation	15
		M19	Dihydroxylation et dehydrogénéation	30
5F-BZO-POXIZID	33	M06	Hydroxylation	6
		M18	OH-glucuronidation	8
		M21	Défluorination	31
		M32	Défluorination et glucuronidation	42
BZO-4en-POXIZID	26	M01	Hydroxylation	20
		M19	OH-glucuronidation	25
		M20	OH-glucuronidation	14
		M26	Hydrolyse de fonction amide	19
		M01	Hydroxylation	26

4F-ABINACA = AKB-48-F	13	M03	Hydroxylation	29
		M08	Triple hydroxylation	5
		M13	Défluorination et déhydroxylation	5
ADB- FUBIATA	26	M03	Hydroxylation	10
		M06	Hydroxylation	4
		M11	Dihydroxylation et double réduction	6
		M18	N-déalkylation	5
ADB-4en- PINACA	26	M03	Hydroxylation	10
		M05	Hydroxylation	13
		M06	Hydroxylation	13
		M13	Double hydroxylation et réduction de double liaison	33
		M17	Hydrolyse de fonction amide	26
5C-APINACA	11	M03	Hydroxylation	6
		M04	Dihydroxylation	5
4F-MDMB- BICA	24	M01	Hydrolyse de fonction ester	38
		M12	Hydrolyse de fonction ester et déhydrogénération	8
		M13	Hydrolyse de fonction ester et glucuronoconjugaison	7
		M18	N-déalkylation	12
		M19	Défluorination oxidative	12
BZO- HEOXIZID = MDA 19	31	M8	Hydroxylation et déshydrogénération d'alcool primaire	4
		M12	Hydroxylation et glucuronoconjugaison	2
		M24	N-déalkylation	7
		M27	Hydroxylation et glucuronoconjugaison	23

Les résultats de l'étude du métabolisme de l'ADB-FUBIATA, du MDMB-4en-PINACA et du CH-PIATA ont fait l'objet de publications dans Environmental Science and Pollution Research (Article 9 – 11).

[Article 9, page 116](#)

[Article 10, page 117](#)

[Article 11, page 118](#)

IV.2.2 Discussion et les limites

Le travail mené a permis de proposer des biomarqueurs (métabolites) d'exposition à 13 SCRAs. Les transformations majoritairement mises en évidence sont des hydroxylations, N-dealkylations, hydrolyses de fonction ester et glucuronoconjugaisons. À l'avenir, ces données pourront être utilisées pour alimenter la base de données de spectrométrie de masse et servir dans des projets épidémiologiques dans les eaux usées ainsi que dans la description de cas d'intoxication en toxicologie biologique et *post-mortem*.

Il est toutefois important de souligner la faiblesse de ces résultats. En effet, l'étude menée ici n'a été réalisée que sur des HLMs et n'a pas été confrontée à des échantillons biologiques des personnes exposés, ni à d'autres modèles *in vitro* (comme les cellules HepaRG, des embryons de poisson-zèbre, etc.).

De même, l'outil *in silico* (chapitre II.4) utilisé pour prédire les métabolites est basé sur le logiciel Biotransformer 3.0 et n'utilise pas d'autres modèles de prédiction, comme GLORYx (97), SyGMA (98) ou MetaTrans (99). L'intégration de plusieurs outils de prédiction des métabolites, de l'intelligence artificielle et de l'apprentissage automatique permettra probablement à l'avenir d'élargir les capacités d'identification des métabolites des SCRAAs (100).

IV.3 Protocole « IN CADAVER »

Ces dernières années, la toxicologie analytique *post-mortem* a connu des avancées techniques significatives (étape d'extraction pré-analytique et instruments analytiques), améliorant ainsi les performances analytiques. Cependant, deux défis demeurent inchangés : (1) les échantillons biologiques, généralement prélevés lors d'autopsies, dont le volume est de l'ordre de quelques millilitres, nécessitent une gestion pré et post-analytique longue et coûteuse, et (2) les difficultés d'interprétation dues aux phénomènes *in cadaver* pendant la période *post-mortem* (dégradation et redistribution *post-mortem*), à l'instabilité *in vitro* et aux imperfections, voire déficiences, des systèmes de référence pour l'interprétation. Afin de proposer des solutions à ces problèmes, le protocole « IN CADAVER » explore la possibilité de réaliser des analyses à partir de 70 µL de sang capillaire prélevé au moment de la levée de corps. Avec l'accord des autorités judiciaires, ce protocole monocentrique a eu les objectifs suivants :

1. Éprouver l'utilisation en conditions réelles (en pratique médico-légale) la réalisation de prélèvement de sang prélevé à l'aide de Néotéryx Mitra® et de microtubes, (facilité, reproductibilité...) ;
2. Analyser les différences entre un prélèvement réalisé en temps précoce (T1) et en temps plus tardif (T2) au moment de l'examen du corps ou de l'autopsie ;
3. Comparer les résultats obtenus dans les prélèvements de ces microprélevements réalisé au moment de l'examen du corps ou de l'autopsie (T2) avec ceux obtenus dans les prélèvements biologiques autopsiques consensuels à T2.

Au total, 82 corps ont été prélevés au cours des deux périodes d'inclusion du protocole : 22 en 2021 et 60 en 2023. Parmi ces cas, 35 ont fait l'objet d'une analyse toxicologique dans le cadre d'une expertise. Les autres échantillons ont été détruits sans être analysés ou conservés en attendant une réquisition pour analyse. Le délai *post-mortem* moyen est de 51 h (médiane à 47 h et écart-type à 31 h), le délai entre T1 et T2 moyen est de 44 h (médiane à 28 h et écart-type à 28 h).

Dans le périmètre de ce protocole, j'ai réalisé le dosage des ECs sur des VAMS dans le cadre de 16 dossiers.

Les résultats de protocole « IN CADAVER » ont fait l'objet d'un article soumis au journal *Forensic Science International* (Article 12).

[Article 12, page 119](#)

IV.3.1 Résultats du dosage des ECs dans le protocole « IN CADAVER »

La comparaison des résultats de dosage des ECs dans le cadre du protocole « IN CADAVER » avec ceux obtenus chez un sujet vivant est présentée dans le Tableau 6. Nous observons une augmentation des concentrations de 2-AG, d'OEA et de PEA.

Tableau 6: Comparaison des concentrations en endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like retrouvées dans l'étude "IN CADAVER" en comparaison avec les résultats de littérature.

Substances	<i>Post mortem</i>	<i>Post mortem</i>	<i>In vivo</i>	Sang total	Plasma (Kratz et al.)	Sérum (Kratz et al.)	Plasma (Angelini et al.)
	<i>T1 DBS (n = 16)</i>	<i>T2 DBS (n = 16)</i>	<i>(Gish et al.) (n = 23)</i>	<i>(Dong et al.) (101)</i>	<i>(42)</i>	<i>(42)</i>	<i>(102)</i>
	Médiane (IQR)	Médiane (IQR)	Médiane (IQR)	Moyenne (ET)	Médiane (IQR)	Médiane (IQR)	Intervalle
AEA ($\mu\text{g/L}$)	0,84 (0,27 – 1,45)	1,07 (0,63 – 2,2)	1,1 (0,86 – 1,4)	8,75 (0,46) ; 21,00 (1,70)	0,45 (0,24 – 0,88)	0,35 (0,24 – 0,61)	0,2 – 5,0
OEA ($\mu\text{g/L}$)	15,3 (12,6 – 28,6)	32,7 (20,4 – 43)	6,74 (3,8 – 10,4)	-	-	-	1,2 – 53
2-AG ($\mu\text{g/L}$)	448 (82,3 – 1000)	208 (64 – 814)	18,8 (15,2 – 25,9)	1,63 (0,08) ; 5,12 (0,67)	1,97 (0,74 – 4,14)	5,81 (1,71 – 11,5)	0,6 – 15*
PEA ($\mu\text{g/L}$)	50,9 (26,4 – 78,1)	84,2 (44,4 – 103)	9,05 (7,59 – 11)	-	2,63 (1,77 – 6,3)	3,78 (2,41 – 5,76)	1,4 - 125

La comparaison des résultats entre T1 et T2 montre une tendance significative à une augmentation des concentrations d'OEA et de PEA (Figure 18). Cependant, nous n'avons pas réussi à démontrer de corrélation significative entre les concentrations d'ECs et le délai *post-mortem* (DPM) ou le délai entre T1 et T2. Nous observons également une tendance (non significative) d'augmentation de l'AEA et une diminution de 2-AG entre le T1 et T2.

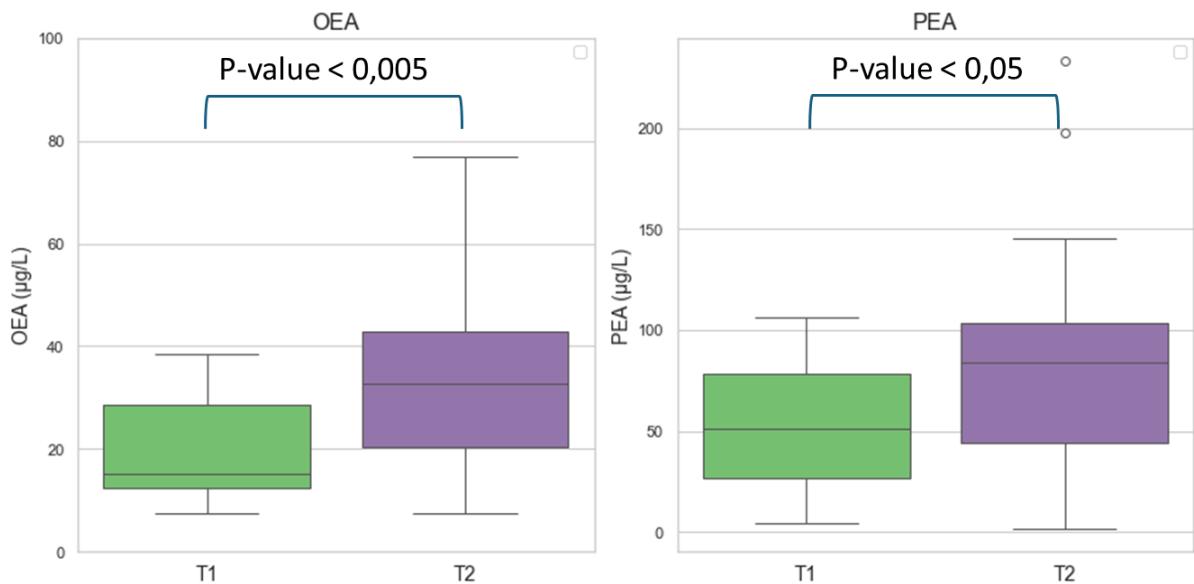


Figure 18 : Comparaison des concentrations d'OEA et de PEA entre T1 et T2.

La littérature sur la variation des concentrations d'ECs en période *post-mortem* est très limitée et ne s'intéresse qu'aux données obtenues dans le cerveau. Palkovits *et al.* démontre une augmentation significative des concentrations en AEA au niveau cérébral en période *post-mortem* courte (103). Un résultat similaire est observé dans le cervelet humain 2 à 24 heures après le décès (104). Cette élévation d'AEA est probablement associée à une dégradation de FAAH en *post-mortem*. Contrairement à l'AEA, Palkovits *et al.* démontrent que les concentrations de 2-AG diminuent au cours de la première heure dans les prélèvements laissés à la température ambiante (103). Ces résultats sont cohérents avec une stabilité chimique faible de 2-AG. Sugiura *et al.* ont précédemment rapporté qu'il existe une augmentation très précoce des niveaux de 2-AG dans le cerveau de rats après la mort, qui survient dans les 30 premières secondes suivant la décapitation (5). Cependant, malgré la stabilité chimique faible du 2-AG, la diminution de 2-AG dans la période *post-mortem* peut être également attribuée à une activité résiduelle de courte durée en période *post-mortem* de la monoacylglycerol lipase (MAGL), responsable de dégradation de 2-AG.

VI – SYNTHESE, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

L'objectif de ma thèse était d'étudier les implications des endocannabinoïdes, et des cannabinoïdes en général, dans les domaines de la toxicologie biologique et médico-légale à travers le développement d'outils analytiques permettant leurs mises en évidence dans différentes matrices biologiques.

Comme indiqué dans mon introduction, l'abord analytique des molécules agissant sur les récepteurs cannabinoïdes présente de nombreux écueils : multitude et variété des cannabinoïdes endogènes (endocannabinoïdes) et exogènes (phytocannabinoïdes, cannabinoïdes de synthèse et d'hémisynthèse), particularités physicochimiques, concentrations circulantes généralement faibles et métabolisme parfois intense. C'était un sujet complexe avec de nombreux défis qui m'ont incité à adopter ce sujet de thèse tout en exerçant mes fonctions d'interne en biologie médicale, puis d'assistant hospitalo-universitaire.

Lors mon travail, trois méthodes analytiques de quantification d'ECs dans trois matrices biologiques différentes (plasma, cheveux et spot de sang séché - DBS) ont été développées. La mise en place de telles méthodes a suscité nombreuses difficultés et contraintes en liens avec la nature physico-chimique de ces substances. Mon travail a permis, au-delà du développements analytiques, d'établir les recommandations sur le traitement préanalytique des échantillons pour le dosage des ECs dans le plasma et sur DBS.

Parallèlement, un outil d'exploration du métabolisme *in silico* des SCRAs a été construit. Les prédictions obtenues avec cet outil ont permis d'identifier de manière plus performante les métabolites des SCRAs à partir des données du métabolisme *in vitro* (HLM).

Ces outils ont été mis en œuvre dans 3 projets de recherche et ont permis

- d'étudier la relation entre cannabinoïdes sériques et insulinorésistance chez des personnes coinfestées VIH-VHC et d'explorer les effets (de la guérison VHC et de la prise de cannabinoïdes) sur les ECs,
- d'explorer l'évolution des ECs dans le sang en période *post-mortem*,
- d'étudier le métabolisme de 13 « nouveaux » SCRAs, non décrits précédemment dans la littérature pour certains, circulant en 2023 sur l'île de Mayotte.

Au-delà de ces projets, deux autres études cliniques sont actuellement en cours, portant sur (i) l'étude de la relation entre ECs, cannabinoïdes sériques et effort physique, (ii) l'étude de la relation entre sevrage alcoolique et ECs.

Les objectifs à venir sont les suivants :

1. maintenir et d'améliorer les outils liés au dosage des ECs ;
 - a) finaliser la validation de la méthode de dosage des ECs dans les cheveux ;
 - b) améliorer la séparation de l'OEA et de son isomère, le VEA ;

- c) ajouter de nouvelles substances d'intérêt aux méthodes développées ;
- 2. élargir le périmètre de l'outil de prédition *in silico* à d'autres xénobiotiques que les SCRAs ;
- 3. cultiver ma participation à des projets de recherche avec ces outils ;

Au total, ce travail réalisé au cours de ma thèse m'a permis d'élaborer des outils analytiques de détection et quantification d'endocannabinoïdes et de cannabinoïdes exogènes dans différentes matrices (et avec des méthodes alternatives de prélèvement sanguin) ; outils complétés de procédures *in silico* de prédition à la fois du métabolisme et des paramètres analytiques de biomarqueurs (métabolites) d'exposition qui pourront être appliquées à un périmètre élargi en toxicologie biologique et médicolégale.

Ce travail mené pendant ces 3 années m'a permis de m'enrichir d'une connaissance générale accrue sur les cannabinoïdes et leurs implications dans des états physiologiques et pathologiques.

Références

1. Di Marzo V, De Petrocellis L. Endocannabinoids as regulators of transient receptor potential (TRP) channels: A further opportunity to develop new endocannabinoid-based therapeutic drugs. *Curr Med Chem.* 2010;17(14):1430-49.
2. Pistis M, Melis M. From surface to nuclear receptors: the endocannabinoid family extends its assets. *Curr Med Chem.* 2010;17(14):1450-67.
3. Maccarrone M, Dainese E, Oddi S. Intracellular trafficking of anandamide: new concepts for signaling. *Trends Biochem Sci.* nov 2010;35(11):601-8.
4. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 18 déc 1992;258(5090):1946-9.
5. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 4 oct 1995;215(1):89-97.
6. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 29 juin 1995;50(1):83-90.
7. Pertwee RG. Endocannabinoids and Their Pharmacological Actions. *Handb Exp Pharmacol.* 2015;231:1-37.
8. Cristino L, Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol.* janv 2020;16(1):9-29.
9. Mechoulam R. *Cannabinoids As Therapeutic Agents.* CRC Press; 2019. 276 p.
10. Schultes RE, Knoll AH, Barghoorn ES, Rury PM, Garay LA, Wilder SE, et al. THE BOTANICAL MUSEUM OF HARVARD UNIVERSITY IN ITS 125th YEAR 1858-1983. *Bot Mus Leafl Harv Univ.* 1984;30(1):1-62.
11. Anderson LC. Leaf Variation Among Cannabis Species from a Controlled Garden. *Bot Mus Leafl Harv Univ.* 1980;28(1):61-9.
12. Brunet B, Mura P. Chapter 6 - Cannabis and Drug-Facilitated Crimes. In: Kintz P, éditeur. *Toxicological Aspects of Drug-Facilitated Crimes [Internet].* Oxford: Academic Press; 2014 [cité 2 sept 2025]. p. 139-57. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124167483000062>
13. Hanuš LO, Meyer SM, Muñoz E, Taglialatela-Scafati O, Appendino G. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Nat Prod Rep.* 23 nov 2016;33(12):1357-92.
14. Gülck T, Møller BL. Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Trends Plant Sci.* 1 oct 2020;25(10):985-1004.
15. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc.* avr 1964;86(8):1646-7.

16. Adams R, Hunt M, Clark JH. Structure of Cannabidiol, a Product Isolated from the Marihuana Extract of Minnesota Wild Hemp. *I. J Am Chem Soc.* janv 1940;62(1):196-200.
17. Arrêté du 22 février 1990 fixant la liste des substances classées comme stupéfiants.
18. Rius C. La réglementation du cannabis à usage médical en France [Internet] [These de doctorat]. Pau; 2023 [cité 14 août 2025]. Disponible sur: <https://theses.fr/2023PAUU2143>
19. Article - Arrêté du 30 décembre 2021 portant application de l'article R. 5132-86 du code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 14 août 2025]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/article_jo/JORFARTI000044793231
20. Arrêté du 22 août 1990 portant application de l'article R. 5181 pour le cannabis - Légifrance [Internet]. [cité 14 août 2025]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/LEGITEXT000006076590>
21. Conseil d'État, 1ère - 4ème chambres réunies, 29/12/2022, 444887, Inédit au recueil Lebon [Internet]. Inédit au recueil Lebon. 2022 [cité 14 août 2025]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/ceta/id/CETATEXT000046850358>
22. Spilka S. Les niveaux d'usage des drogues illicites en France en 2023. 2024;
23. Cannabis (résine, herbe, huile, CBD) - Synthèse des connaissances | OFDT [Internet]. [cité 14 août 2025]. Disponible sur: <https://www.ofdt.fr/cannabis-resine-herbe-huile-cbd-synthese-des-connaissances-1724>
24. Hendrickson RG, McKeown NJ, Kusin SG, Lopez AM. Acute cannabis toxicity in older adults. *Toxicol Commun.* 1 janv 2020;4(1):67-70.
25. KINTZ P. Toxicologie et pharmacologie médico-légales. Amsterdam: Elsevier; 1998. 719 p. (Option Bio).
26. Richards JR, Bing ML, Moulin AK, Elder JW, Rominski RT, Summers PJ, et al. Cannabis use and acute coronary syndrome. *Clin Toxicol Phila Pa.* oct 2019;57(10):831-41.
27. Cohen N, Galvis Blanco L, Davis A, Kahane A, Mathew M, Schuh S, et al. Pediatric cannabis intoxication trends in the pre and post-legalization era. *Clin Toxicol Phila Pa.* janv 2022;60(1):53-8.
28. Whiting PF, Wolff RF, Deshpande S, Di Nisio M, Duffy S, Hernandez AV, et al. Cannabinoids for Medical Use: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA.* 23 juin 2015;313(24):2456-73.
29. Decision - 2005/387 - EN - EUR-Lex [Internet]. [cité 14 août 2025]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dec/2005/387/oj/eng>
30. United Nations : Office on Drugs and Crime [Internet]. [cité 14 août 2025]. World Drug Report 2022. Disponible sur: <http://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/world-drug-report-2022.html>
31. New psychoactive substances – the current situation in Europe (European Drug Report 2025) | [www.euda.europa.eu \[Internet\]. \[cité 14 août 2025\]. Disponible sur: https://www.euda.europa.eu/publications/european-drug-report/2025/new-psychoactive-substances_en](https://www.euda.europa.eu/publications/european-drug-report/2025/new-psychoactive-substances_en)

32. Salle S, Sevestre C, Richeval C, Hakim F, Allorge D, Gaulier J michel. Involuntary 5F-ADB-related intoxication following e-cigarette use. *Int J Legal Med.* 1 juill 2021;135(4):1467-70.
33. Gaulier JM, Richeval C, Phanithavong M, Wiart JF, Martinez M, Detrez V, et al. Résultats d'analyses d'e-liquides dans un laboratoire de toxicologie : ce sont souvent des cannabinoïdes de synthèse. *Toxicol Anal Clin.* 1 mars 2021;33(1):35-6.
34. Lagoutte-Renosi J, Richeval C, Phanithavong M, Wiart JF, Castex E, Vanhoy X, et al. Hair analysis can support the follow-up addiction care after acute New Psychoactive Substances intoxication: Illustration by two cases. *Drug Test Anal.* janv 2021;13(1):227-34.
35. Gish A, Dumestre-Toulet V, Richeval C, Wiart JF, Hakim F, Allorge D, et al. Trends in the Pharmaceutical Design of New Psychoactive Substances Detected in Oral Fluid OF Drivers Around a Music Festival in South-West France: Comparison 2019/2017. *Curr Pharm Des.* 2022;28(15):1245-9.
36. Richardson D, Ortori CA, Chapman V, Kendall DA, Barrett DA. Quantitative profiling of endocannabinoids and related compounds in rat brain using liquid chromatography-tandem electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem.* 15 janv 2007;360(2):216-26.
37. Wood JT, Williams JS, Pandarinathan L, Courville A, Keplinger MR, Janero DR, et al. Comprehensive profiling of the human circulating endocannabinoid metabolome: clinical sampling and sample storage parameters. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46(9):1289-95.
38. Gurke R, Thomas D, Schreiber Y, Schäfer SMG, Fleck SC, Geisslinger G, et al. Determination of endocannabinoids and endocannabinoid-like substances in human K3EDTA plasma - LC-MS/MS method validation and pre-analytical characteristics. *Talanta.* 1 nov 2019;204:386-94.
39. Amir Hamzah K, Turner N, Nichols D, Ney LJ. Advances in targeted liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for endocannabinoid and N-acylethanolamine quantification in biological matrices: A systematic review. *Mass Spectrom Rev.* 2025;44(3):513-38.
40. Zoerner AA, Gutzki FM, Batkai S, May M, Rakers C, Engeli S, et al. Quantification of endocannabinoids in biological systems by chromatography and mass spectrometry: a comprehensive review from an analytical and biological perspective. *Biochim Biophys Acta.* nov 2011;1811(11):706-23.
41. Aydin E, Cebo M, Mielenik J, Richter H, Schüle R, Sievers-Engler A, et al. UHPLC-ESI-MS/MS assay for quantification of endocannabinoids in cerebrospinal fluid using surrogate calibrant and surrogate matrix approaches. *J Pharm Biomed Anal.* 5 janv 2023;222:115090.
42. Kratz D, Sens A, Schäfer SMG, Hahnefeld L, Geisslinger G, Thomas D, et al. Pre-analytical challenges for the quantification of endocannabinoids in human serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1 févr 2022;1190:123102.
43. Miloshevska D, Grabnar I, Vovk T. Dried blood spots for monitoring and individualization of antiepileptic drug treatment. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 30 juill 2015;75:25-39.
44. Hakim F. Développement, validation, mise en œuvre et applications de méthodes de dosage de biomarqueurs de la consommation d'éthanol: phosphatidyléthanol sanguin. 2022;

45. Yu L, Li K, Li X, Guan C, Sun T, Zhang X. Metabolomic profiling of dried blood spots reveals gender-specific discriminant models for the diagnosis of small cell lung cancer. *Aging*. 12 janv 2020;12(1):978-95.
46. Thomas A, Geyer H, Schänzer W, Crone C, Kellmann M, Moehring T, et al. Sensitive determination of prohibited drugs in dried blood spots (DBS) for doping controls by means of a benchtop quadrupole/Orbitrap mass spectrometer. *Anal Bioanal Chem*. mai 2012;403(5):1279-89.
47. Ververi C, Gentile C, Massano M, Salomone A, Vincenti M. Quantitative determination by UHPLC-MS/MS of 18 common drugs of abuse and metabolites, including THC and OH-THC, in volumetric dried blood spots: a sustainable method with minimally invasive sampling. *J Chromatogr B*. 15 oct 2024;1247:124337.
48. Kintz P, Baudry M, Gheddar L. Testing for trazodone, an antidepressant, in hair collected from horses. *J Anal Toxicol*. 15 mars 2025;bkaf025.
49. Gao W, Stalder T, Foley P, Rauh M, Deng H, Kirschbaum C. Quantitative analysis of steroid hormones in human hair using a column-switching LC-APCI-MS/MS assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1 juin 2013;928:1-8.
50. Croissant M, Glaesmer H, Klucken T, Kirschbaum C, Gao W, Stalder T, et al. Endocannabinoid concentrations in hair and mental health of unaccompanied refugee minors. *Psychoneuroendocrinology*. juin 2020;116:104683.
51. Ottria R, Ravelli A, Gigli F, Ciuffreda P. Simultaneous ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry quantification of endogenous anandamide and related N-acylethanolamides in bio-matrices. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1 mai 2014;958:83-9.
52. Richeval C. nouvelles substances psychoactives (NPS) : approches in vivo, in silico, in vitro.
53. Gish A, Baes D, Richeval C, Wiart JF, Hakim F, Grenier C, et al. 2-MeOPP positive hair result in case of urapidil treatment. *Drug Test Anal*. sept 2023;15(9):994-7.
54. Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Bryant SH. PUG-SOAP and PUG-REST: web services for programmatic access to chemical information in PubChem. *Nucleic Acids Res*. 1 juill 2015;43(W1):W605-611.
55. Wishart DS, Tian S, Allen D, Oler E, Peters H, Lui VW, et al. BioTransformer 3.0-a web server for accurately predicting metabolic transformation products. *Nucleic Acids Res*. 5 juill 2022;50(W1):W115-23.
56. Wang F, Liigand J, Tian S, Arndt D, Greiner R, Wishart DS. CFM-ID 4.0: More Accurate ESI-MS/MS Spectral Prediction and Compound Identification. *Anal Chem*. 31 août 2021;93(34):11692-700.
57. Osipenko S, Nikolaev E, Kostyukovich Y. Retention Time Prediction with Message-Passing Neural Networks. *Separations*. oct 2022;9(10):291.
58. Tsugawa H, Cajka T, Kind T, Ma Y, Higgins B, Ikeda K, et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat Methods*. juin 2015;12(6):523-6.

59. Olivon F, Elie N, Grelier G, Roussi F, Litaudon M, Touboul D. MetGem Software for the Generation of Molecular Networks Based on the t-SNE Algorithm. *Anal Chem.* 4 déc 2018;90(23):13900-8.
60. Bedimo R, Abodunde O. Metabolic and Cardiovascular Complications in HIV/HCV-Co-infected Patients. *Curr HIV/AIDS Rep.* déc 2016;13(6):328-39.
61. Blanco F, Barreiro P, Ryan P, Vispo E, Martín-Carbonero L, Tuma P, et al. Risk factors for advanced liver fibrosis in HIV-infected individuals: role of antiretroviral drugs and insulin resistance. *J Viral Hepat.* janv 2011;18(1):11-6.
62. Gutiérrez-Groble Y, Ponciano-Rodríguez G, Méndez-Sánchez N. Viral hepatitis infection and insulin resistance: a review of the pathophysiological mechanisms. *Salud Publica Mex.* 2011;53 Suppl 1:S46-51.
63. Patel S, Jinjuvadia R, Patel R, Liangpunsakul S. Insulin Resistance is Associated With Significant Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C Patients: A Systemic Review and Meta-Analysis. *J Clin Gastroenterol.* janv 2016;50(1):80-4.
64. Carrieri MP, Protopopescu C, Marcellin F, Wittkop L, Lacombe K, Esterle L, et al. The impact of coffee consumption on fibrosis and steatosis in HIV-HCV co-infected patients. *J Hepatol.* avr 2018;68(4):845-7.
65. Marcellin F, Costa M, Wittkop L, Protopopescu C, Esterle L, Salmon-Ceron D, et al. Wine Consumption and Lower Risk of Advanced Liver Fibrosis: A True Effect or Unmeasured Confounding? A Longitudinal Analysis (ANRS CO13 HEPAVIH Cohort). *Am J Gastroenterol.* nov 2018;113(11):1729-32.
66. Marcellin F, Roux P, Loko MA, Lions C, Caumont-Prim A, Dabis F, et al. High levels of alcohol consumption increase the risk of advanced hepatic fibrosis in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients: a sex-based analysis using transient elastography at enrollment in the HEPAVIH ANRS CO13 cohort. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 oct 2014;59(8):1190-2.
67. Nordmann S, Vilotitch A, Roux P, Esterle L, Spire B, Marcellin F, et al. Daily cannabis and reduced risk of steatosis in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus-co-infected patients (ANRS CO13-HEPAVIH). *J Viral Hepat.* févr 2018;25(2):171-9.
68. Pattullo V, Heathcote J. Hepatitis C and diabetes: one treatment for two diseases? *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* mars 2010;30(3):356-64.
69. Desbois AC, Cacoub P. Diabetes mellitus, insulin resistance and hepatitis C virus infection: A contemporary review. *World J Gastroenterol.* 7 mars 2017;23(9):1697-711.
70. Ratziu V, Heurtier A, Bonyhay L, Poinard T, Giral P. Review article: an unexpected virus-host interaction--the hepatitis C virus-diabetes link. *Aliment Pharmacol Ther.* nov 2005;22 Suppl 2:56-60.
71. Sanyal AJ. Review article: non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C--risk factors and clinical implications. *Aliment Pharmacol Ther.* nov 2005;22 Suppl 2:48-51.
72. Schwarzinger M, Baillot S, Yazdanpanah Y, Rehm J, Mallet V. Contribution of alcohol use disorders on the burden of chronic hepatitis C in France, 2008-2013: A nationwide retrospective cohort study. *J Hepatol.* sept 2017;67(3):454-61.

73. Fuster D, Tsui JI, Cheng DM, Quinn EK, Bridden C, Nunes D, et al. Impact of lifetime alcohol use on liver fibrosis in a population of HIV-infected patients with and without hepatitis C coinfection. *Alcohol Clin Exp Res.* sept 2013;37(9):1527-35.
74. Santos ME, Protopopescu C, Sogni P, Yaya I, Piroth L, Bailly F, et al. HCV-Related Mortality Among HIV/HCV Co-infected Patients: The Importance of Behaviors in the HCV Cure Era (ANRS CO13 HEPAVIH Cohort). *AIDS Behav.* avr 2020;24(4):1069-84.
75. Carrieri MP, Serfaty L, Vilotitch A, Winnock M, Poizot-Martin I, Loko MA, et al. Cannabis Use and Reduced Risk of Insulin Resistance in HIV-HCV Infected Patients: A Longitudinal Analysis (ANRS CO13 HEPAVIH). *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 juill 2015;61(1):40-8.
76. Adejumo AC, Adegbala OM, Adejumo KL, Bukong TN. Reduced Incidence and Better Liver Disease Outcomes among Chronic HCV Infected Patients Who Consume Cannabis. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2018;2018:9430953.
77. Penner EA, Buettner H, Mittleman MA. The impact of marijuana use on glucose, insulin, and insulin resistance among US adults. *Am J Med.* juill 2013;126(7):583-9.
78. Adejumo AC, Alliu S, Ajayi TO, Adejumo KL, Adegbala OM, Onyeakusi NE, et al. Cannabis use is associated with reduced prevalence of non-alcoholic fatty liver disease: A cross-sectional study. *PloS One.* 2017;12(4):e0176416.
79. McPartland JM, Guy GW, Di Marzo V. Care and feeding of the endocannabinoid system: a systematic review of potential clinical interventions that upregulate the endocannabinoid system. *PloS One.* 2014;9(3):e89566.
80. Di Marzo V. New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system. *Nat Rev Drug Discov.* sept 2018;17(9):623-39.
81. Di Marzo V, Piscitelli F, Mechoulam R. Cannabinoids and endocannabinoids in metabolic disorders with focus on diabetes. *Handb Exp Pharmacol.* 2011;(203):75-104.
82. Iannotti FA, Di Marzo V, Petrosino S. Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Prog Lipid Res.* avr 2016;62:107-28.
83. Eslam M, Kawaguchi T, Del Campo JA, Sata M, Khattab MAE, Romero-Gomez M. Use of HOMA-IR in hepatitis C. *J Viral Hepat.* oct 2011;18(10):675-84.
84. Petta S, Cammà C, Di Marco V, Macaluso FS, Maida M, Pizzolanti G, et al. Hepatic steatosis and insulin resistance are associated with severe fibrosis in patients with chronic hepatitis caused by HBV or HCV infection. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* avr 2011;31(4):507-15.
85. Patsenker E, Sachse P, Chicca A, Gachet MS, Schneider V, Mattsson J, et al. Elevated levels of endocannabinoids in chronic hepatitis C may modulate cellular immune response and hepatic stellate cell activation. *Int J Mol Sci.* 27 mars 2015;16(4):7057-76.
86. Beyoğlu D, Schwalm S, Semmo N, Huwiler A, Idle JR. Hepatitis C Virus Infection Upregulates Plasma Phosphosphingolipids and Endocannabinoids and Downregulates Lysophosphoinositols. *Int J Mol Sci.* 11 janv 2023;24(2):1407.

87. Di Marzo V, Berrendero F, Bisogno T, González S, Cavalieri P, Romero J, et al. Enhancement of Anandamide Formation in the Limbic Forebrain and Reduction of Endocannabinoid Contents in the Striatum of Δ9-Tetrahydrocannabinol-Tolerant Rats. *J Neurochem*. 2000;74(4):1627-35.
88. Schlosburg JE, Carlson BLA, Ramesh D, Abdullah RA, Long JZ, Cravatt BF, et al. Inhibitors of endocannabinoid-metabolizing enzymes reduce precipitated withdrawal responses in THC-dependent mice. *AAPS J*. juin 2009;11(2):342-52.
89. Thieme U, Schelling G, Hauer D, Greif R, Dame T, Laubender RP, et al. Quantification of anandamide and 2-arachidonoylglycerol plasma levels to examine potential influences of tetrahydrocannabinol application on the endocannabinoid system in humans. *Drug Test Anal*. 2014;6(1-2):17-23.
90. Walter C, Ferreira N, Bishay P, Geisslinger G, Tegeder I, Lötsch J. Exogenous delta⁹-tetrahydrocannabinol influences circulating endogenous cannabinoids in humans. *J Clin Psychopharmacol*. oct 2013;33(5):699-705.
91. Leweke FM, Giuffrida A, Koethe D, Schreiber D, Nolden BM, Kranaster L, et al. Anandamide levels in cerebrospinal fluid of first-episode schizophrenic patients: Impact of cannabis use. *Schizophr Res*. 1 août 2007;94(1):29-36.
92. Morgan CJA, Page E, Schaefer C, Chatten K, Manocha A, Gulati S, et al. Cerebrospinal fluid anandamide levels, cannabis use and psychotic-like symptoms. *Br J Psychiatry J Ment Sci*. mai 2013;202(5):381-2.
93. Muhl D, Kathmann M, Hoyer C, Kranaster L, Hellmich M, Gerth CW, et al. Increased CB2 mRNA and anandamide in human blood after cessation of cannabis abuse. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. juill 2014;387(7):691-5.
94. Boachie N, Gaudette E, Bazinet RP, Lin L, Tyndale RF, Mansouri E, et al. Circulating Endocannabinoids and N-Acylethanolamines in Individuals with Cannabis Use Disorder-Preliminary Findings. *Brain Sci*. 27 sept 2023;13(10):1375.
95. Mustafa W, Elgendi N, Salama S, Jawad M, Eltoukhy K. The Effect of Cannabis on the Clinical and Cytokine Profiles in Patients with Multiple Sclerosis. *Mult Scler Int*. 2021;2021(1):6611897.
96. Anil SM, Peeri H, Koltai H. Medical Cannabis Activity Against Inflammation: Active Compounds and Modes of Action. *Front Pharmacol*. 9 mai 2022;13:908198.
97. de BruynKops C, Šícho M, Mazzolari A, Kirchmair J. GLORYx: Prediction of the Metabolites Resulting from Phase 1 and Phase 2 Biotransformations of Xenobiotics. *Chem Res Toxicol*. 15 févr 2021;34(2):286-99.
98. Ridder L, Wagener M. SyGMA: Combining Expert Knowledge and Empirical Scoring in the Prediction of Metabolites. *ChemMedChem*. 2008;3(5):821-32.
99. Litsa EE, Das P, Kavraki LE. Prediction of drug metabolites using neural machine translation. *Chem Sci*. 16 déc 2020;11(47):12777-88.
100. Pelletier R, Nahle D, Sarr M, Bourdais A, Morel I, Le Daré B, et al. Identifying metabolites of new psychoactive substances using in silico prediction tools. *Arch Toxicol*. 1 juill 2025;99(7):2953-73.

101. Dong X, Li L, Ye Y, Zhang D, Zheng L, Jiang Y, et al. Surrogate analyte-based quantification of main endocannabinoids in whole blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* BMC. mars 2019;33(3):e4439.
102. Angelini R, Argueta DA, Piomelli D, DiPatrizio NV. Identification of a Widespread Palmitoylethanolamide Contamination in Standard Laboratory Glassware. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2017;2(1):123-32.
103. Palkovits M, Harvey-White J, Liu J, Kovacs ZS, Bobest M, Lovas G, et al. Regional distribution and effects of postmortal delay on endocannabinoid content of the human brain. *Neuroscience*. 9 avr 2008;152(4):1032-9.
104. Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, et al. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett.* 16 sept 1996;393(2-3):231-5.

Publications

Article 1

Gish A, Wiart J.F, Turpin E, Allorge D, Gaulier J.-M.

État de l'art et intérêt des dosages plasmatiques des substances endocannabinoïdes et endocannabinoïdes-like,

Tox Anal Clin. 2021 ; ISSN 2352-0078, [doi: 10.1016/j.toxac.2021.07.004](https://doi.org/10.1016/j.toxac.2021.07.004). - (Not currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2024: 1,7)

Article 2

Gish A, Hakim F, Richeval C, Gaulier JM.

Nouveau Produits de Synthèse.

In *EMC Biologie Médicale*, Elsevier, Paris, 2024;19(1):1-6. [doi : 10.1016/S2211-9698\(23\)69423-3](https://doi.org/10.1016/S2211-9698(23)69423-3).

Article 3

André C, Baudriller A, Bellouard M, Boudin C, Carles M, **Gish A**, Kernalleguen A, Kolmayer M, Le Carpentier E, Lenski M, Rahali MA, Bendjilali-Sabiani JJ, Ameline A.

Les cannabinoïdes semi-synthétiques : revue de la littérature et mise à jour,

Tox Anal Clin. 2021; 37(2) :204-222. [doi :10.1016/j.toxac.2025.01.101](https://doi.org/10.1016/j.toxac.2025.01.101). - (Not currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2024: 1,7)

Article 4

Gish A, Radwan E, Richeval C, Protopopescu C, Wiart JF, Hakim F, Allorge D, Carrieri P, Barré T, Gaulier JM.

An LC-MS/MS method for simultaneous quantification of four endocannabinoids and endocannabinoid-like substances in plasma: application to a HIV-HCV co-infected population.

Ther Drug Monit. 2025; 10.1097/FTD.0000000000001397. [doi:10.1097/FTD.0000000000001397](https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000001397) -
(Currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2023: 2,8)

Article 5

Gish A, Wiart JF, Richeval C, Allorge D, Gaulier JM.

Simultaneous analysis of four endocannabinoids and endocannabinoid congeners together with delta-9 tetrahydrocannabinol and related metabolites in dried blood spots.

J Pharm Biomed Anal. 2025;265:116991. [doi: 10.1016/j.jpba.2025.1169914](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2025.1169914). - (Currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2023: 3,1)

Article 6

Gish A, Peyré A, Richeval C, Pleignet E, Cottreau V, Cherki S, Daveluy A, Gaulier JM, Devault DA.

Presence of a synthetic cannabinoid, MDMB-INACA, in “Chimique” in Mayotte: preliminary data on metabolism with a view to a future epidemiological study based on wastewater.

Environ Sci Pollut Res Int. doi: 10.1007/s11356-025-36789-3 - (Currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2022: 5,8)

Article 7

Richeval C, **Gish A**, Cottreau V, Peyre A, Pleignet E, Cherki S, Allorge D, Gaulier JM, Devault DA.

A current overview of the pharmacological composition of "La Chimique" consumed in Mayotte:
Preliminary results of the CHASSE-MAREE protocol.

Drug Test Anal. 2024;16(6):558-569. [doi:10.1002/dta.3585](https://doi.org/10.1002/dta.3585). - (Currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2023: 2,6)

Article 8

Devault DA, Fabien L, **Gish A**, Richeval C, Gaulier JM, Nefau T.

Synthetic cannabinoids in Mayotte over a year in time and space: an example of highfrequency evolution of market.

Environ Sci Pollut Res Int. (soumis) - (*Currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2022: 5,8*)

Environmental Science and Pollution Research

Synthetic cannabinoids in Mayotte over a year in time and space: an example of high-frequency evolution of market

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	ESPR-D-25-03785
Full Title:	Synthetic cannabinoids in Mayotte over a year in time and space: an example of high-frequency evolution of market
Article Type:	Research Article
Keywords:	Indian Ocean; forensic; New Psychoactive Substances; Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists
Corresponding Author:	Damien Alain Devault, Ph.D Université de Mayotte Dembeni, France FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Université de Mayotte
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Damien Alain Devault, Ph.D
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Damien Alain Devault, Ph.D Loïc Fabien Alexandr Gish Camille Richeval Jean-Michel Gaulier Thomas Nefau
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	<p>When illicit drug trafficking appears each day more than yesterday like an epidemic, the importance of volume evaluation of drug abuse is strengthened as an issue for sanitary and security purposes. However, on one hand, questionnaire administration to consumers is long and highly inconclusive and, on the other hand, seizures and clinical data evaluate more the service performance in response to the illicit drug flux than the flux itself. Wastewater-based epidemiology nowadays took us into a new era but its use trends to provide freeze frames -and to favor the bias of considering back-calculated consumption to be stable between images.</p> <p>Over a year, 8 sampling campaigns of "chimique" were performed, all over Mayotte, during a week each, in order to estimate the evolution of the market as best as possible: in location, in nature of drug of abuse, and in concentration, among Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists (SCRAs) which is the most profuse illicit drug family in the "chimique". Assuming a "worst case situation", i.e. insularity and the highly specificity of SCRA drug abusing in Mayotte, authors aimed to explore the evolution of SCRA nature and concentration, and their location. In Mayotte, SCRA reached the unusual status of emblematic hard drug in a disarrayed policy,</p> <p>Illicit drugs were identified in each campaign, totaling 195 samples (187 cigarettes, 8 powders).</p> <p>13 SCRA were observed in association with vegetal matrix (tobacco prevailed, mixed or not with cannabis). Co-formulants were cannabinoids, pharmaceuticals/precursors, and/or other New Psychoactive Substances.</p> <p>Authors demonstrated that the market, month after month, turned homogeneous, as</p>

	because of the offer proposed by pharma SCRAAs producers, as because of the growing hegemony of a trafficking gang. The molecule profile moved rapidly even being unrecognizable from one campaign to another.
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
§Are you submitting to a Special Issue?	Yes
(If "yes") Please select a Special Issue from the following list: as follow-up to "§Are you submitting to a Special Issue?" "	SI: NPS2025

Synthetic cannabinoids in Mayotte over a year in time and space: an example of high-frequency evolution of market

Damien Alain Devault^{1,2*}, Loïc Fabien³, Alexandr Gish^{4,5}, Camille Richeval^{4,5}, Jean-Michel Gaulier^{4,5}, Thomas Nefau⁶

¹ Université de Mayotte, 8 rue de l'Université, Iloni BP 53, 97660 Dembeni, Mayotte, France

² UMR CNRS 5805 EPOC – OASU, Équipe LPTC, Université de Bordeaux, 351 Cours de la libération, 33405 Talence Cedex, France

³ Service Central de Renseignement Criminel de la Gendarmerie Nationale, 5 Boulevard de l'Hautil, 95010 Pontoise, France

⁴ CHU Lille, Unité Fonctionnelle de Toxicologie, Lille, France

⁵ Univ. Lille, URL 4483 – IMPECS – IMPact de l’Environnement Chimique sur la Santé humaine, Lille, France

⁷ European Union Drugs Agency (EUDA) Praça Europa 1, Cais do Sodré 1249-289 Lisbon, Portugal

*Corresponding author: damien.devault@univ-mayotte.fr

Abstract

When illicit drug trafficking appears each day more than yesterday like an epidemic, the importance of volume evaluation of drug abuse is strengthened as an issue for sanitary and security purposes. However, on one hand, questionnaire administration to consumers is long and highly inconclusive and, on the other hand, seizures and clinical data evaluate more the service performance in response to the illicit drug flux than the flux itself. Wastewater-based epidemiology nowadays took us into a new era but its use trends to provide freeze frames -and to favor the bias of considering back-calculated consumption to be stable between images.

Over a year, 8 sampling campaigns of “chimique” were performed, all over Mayotte, during a week each, in order to estimate the evolution of the market as best as possible: in location, in nature of drug of abuse, and in concentration, among Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists (SCRAs) which is the most profuse illicit drug family in the “chimique”. Assuming a “worst case situation”, *i.e.* insularity and the highly specificity of SCRAs drug abusing in Mayotte, authors aimed to explore the evolution of SCRAs nature and concentration, and their location. In Mayotte, SCRAs reached the unusual status of emblematic hard drug in a disarrayed policy,

Illicit drugs were identified in each campaign, totalizing 195 samples (187 cigarettes, 8 powders).

13 SCRAs were observed in association with vegetal matrix (tobacco prevailed, mixed or not with cannabis). Co-formulants were cannabinoids, pharmaceuticals/precursors, and/or other New Psychoactive Substances.

Authors demonstrated that the market, month after month, turned homogeneous, as because of the offer proposed by pharma SCRAs producers, as because of the growing hegemony of a trafficking gang. The molecule profile moved rapidly even being unrecognizable from one campaign to another.

Keywords: Indian Ocean, forensic, New Psychoactive Substances, Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists

1. Introduction

Drug abuse is a worldwide concern, and synthetic drugs appear as the most emerging issue. Composition evolution of each type of product is hard to estimate because of the ductile, border-slandering and clandestine nature of this market. This market is expected to be volatile but data are scarce to illustrate it. Moreover, in a context of consumption monitoring of illicit drug consumption by wastewater-based epidemiology, synchronized worldwide campaigns since Thomas *et al.* (2012) can suggest slow market evolution. But, among synthetic drugs of abuse, *i.e.* molecules synthesized in lab and named because of their effects and not their chemical structure, active molecules abound: synthetic cannabinoids (also called Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists -SCRAs) are nowadays about 250 and are expected to reach 500 in a decade (details below). Except the evolution due to concurrence between classical drugs (cannabis, cocaine, heroin, amphetamines...), synthetic ones propose also the challenge of the profusion of molecules into the same family, providing consumers having a vestigial knowledge of the molecule they consume -and a matching interest to it.

In the present article, 8 campaigns of SCRAs collecting and analysis are presented. They aim to highlight how the illicit drug location and chemical diversity vary and is challenging the conventional monitoring based on healthcare and police-justice indicators.

1.1. SCRAs presentation

The discovery of the endocannabinoid system (ECS) in the 1960s, the identification of cannabinoid receptors in the late 1980s, and the discovery of the first endocannabinoids, anandamide and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), in the 1990s, laid the foundation for extensive research into the effects of the ECS on health and disease.

The first synthetic cannabinoid, HU-210, was developed in 1988 by Raphael Mechoulam of the Hebrew University (HU) in Jerusalem for research purposes. The objective was to mimic the effects of delta-9-THC and to facilitate a more profound understanding of cannabinoid receptors and the endocannabinoid system (ECS). Subsequent to this, other compounds, including CP 55,940 (Pfizer) and WIN 55,212-2 (Sterling-Winthrop), were rapidly developed. These compounds provided valuable tools for mapping the ECS and testing therapeutic applications. In the 1990s, John William Huffman, a professor of organic chemistry at Clemson University, and his team developed more than 400 synthetic cannabinoids, agonists of the CB1 and CB2 receptors, such as JWH-018.

Synthetic cannabinoid receptor agonists (SCRAs) first emerged on the illicit drug market in Europe in the late 2000s, following the discovery of JWH-018 in products marketed under the name 'Spice' in 2008. These substances subsequently played an instrumental role in the emergence of the 'legal highs' market, an umbrella term used to describe non-regulated (new) psychoactive substances that are usually intended to mimic the effects of controlled drugs and are sold on the open market. Since that time, there has been a steady increase in their presence, and they now represent the largest group of new psychoactive substances monitored by the European Early Warning System (EU-EWS) of the EUDA (EUDA, 2017). In 2022, 24 new SCRAs were reported for the first time, accounting for more than half of the new substances identified that year (EUDA, 2023a), while in 2023, the EU Early Warning System received reports of 9 new cannabinoids, bringing the total number being monitored to 254 (EUDA, 2024a).

The chemical diversity of SCRAs is extensive, encompassing 14 recognized chemical families, which complicates their identification and regulation. Nevertheless, a definition of SCRAs can be established by four key components: the linker, the core, the tail, and the linked group. The linker, which is typically a carboxamide-type moiety, is the most structurally conserved component, bridging the core and the linked group. The core, which is usually composed of bi- or tricyclic aromatic systems, functions as a central backbone and is linked to both the linker and the tail. Tail groups covalently linked to the core exhibit the highest degree of structural diversification in recent SCRAs analogues, with notable variation in *N*-alkyl and cyclic scaffolds. Historical inconsistencies in tail group nomenclature highlight the need for systematic classification. The linked group, which binds exclusively to the linker, represents the

most structurally heterogeneous class of building blocks, with the benzyl-type subgroup undergoing extensive substitution-driven modification (Pulver *et al.*, 2023).

Concerning the manufacturing process, these substances are frequently produced in China and subsequently imported into Europe as bulk powders. These substances can then be mixed with or sprayed on plant material, typically on an industrial scale, using solvents such as acetone or methanol to dissolve the powders, to produce smoking mixes or other materials that resemble cannabis resin. Furthermore, these substances have been detected in liquid form intended for vaping, as well as in edibles that are sold online, both on the internet and on the darknet. The potency of the substances, which results in a low dose and produces a significant effect, facilitates their smuggling and distribution, primarily by mail. In 2022, 24 countries reported the seizure of approximately 281 kilograms of synthetic cannabinoids in the form of herbal material, reflecting a decrease from the 385 seized kilograms reported in 2021. Notably, low-THC herbal cannabis products constituted an estimated 30% of these seizures, corresponding to 76 kilograms, down from 242 kilograms in the previous year, as reported by 10 countries (EUDA 2024a).

The European Union (EU) drug market continues to demonstrate a significant reliance on SCRAs produced as bulk powders in China, which are then processed into consumer products within Europe. Between 2017 and 2021, five facilities involved in the processing and packaging of SCRAs were dismantled in Germany, Spain, the Netherlands, and Romania. Further reports have indicated similar operations in Hungary and Cyprus, thereby underscoring the region's role in the conversion of imported materials into market-ready products. However, following China's implementation of broad generic controls in July 2021, emerging signs suggest a potential decentralization of SCRAs production within Europe itself, as evidenced by the dismantlement of two facilities in Greece and Spain, where evidence suggested on-site synthesis of SCRAs. In Greece, law enforcement has seized a warehouse and makeshift laboratory involved in the transnational distribution of SCRAs and other substances via encrypted platforms and cryptocurrency payments. The substances seized included 41.5 kilograms of SCRAs powders and 3.5 liters of liquid, along with synthetic cathinones, cannabis derivatives, and benzodiazepines. In a separate operation in Spain, a laboratory producing SCRAs (*e.g.*, ADB-BUTINACA, JWH-210), cathinones, and opioids was dismantled. The laboratory was found to be equipped with production and packaging infrastructure, including a tabletting machine (EUDA 2024b).

Data on the prevalence of SCRAs use remain limited, but are gradually improving as more and more countries include relevant questions in their national surveys. Nevertheless, European general population studies have repeatedly demonstrated low utilisation rates (prevalence levels below 1%), and the procurement of substantial data concerning the prevalence of use can often be challenging. In the United States, the prevalence of SCRA use increased from 0.17% in 2021 to 0.26% in 2023, representing a 50.0% increase ($p = 0.042$). When considering the period from 2021 to 2023, the overall prevalence was 0.25% (Palamar *et al.*, 2025). Specific surveys among young people or targeting drug users, such as the European Web Survey on Drugs (EWSD) coordinated by the EUDA, are more likely to show results on the use of SCRAs. The latest wave of the EWSD, conducted in 2024 in 24 European Member States and Norway, shows that only 3.0% of respondents reported having used SCRAs in the previous 12 months (EUDA, 2024c), and a very low proportion are only using SCRAs (0.3% in 2022 following López-Pelayo, *et al.*, 2024). According to data from the European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs (ESPAD), an average of 3.1% of students across 20 out of 35 participating countries reported lifetime use of SCRAs, with national prevalence rates ranging from 1.1% in Slovakia to 5.2% in France.

A comparatively high prevalence of SCRA use has been observed among specific subpopulations of cannabis users, notably among marginalized groups such as individuals experiencing homelessness, incarcerated populations, and people who inject drugs (Campbell & Poole, 2020; Ralphs *et al.*, 2021). Furthermore, SCRAs are also commonly used by individuals subject to routine drug testing, including those in drug treatment programs, prison settings, drivers, or under legal supervision (Campbell & Poole, 2020). This is due to the fact that many conventional drug screening methods may not detect newer or less common synthetic cannabinoid compounds. For instance, in the UK in 2014-15, 64% of male prisoners reported issues with SCRAs (HM Inspectorate of prisons, 2015). A further UK study ($n = 57$)

revealed that 46.7% of participants reported using SCRAs during incarceration. This subgroup exhibited significantly higher levels of psychological distress compared to non-users. The majority of users reported administration via paper-based preparations (77.4%) and e-cigarettes (75.9%) (Craft *et al.*, 2023). In prison, these substances are often found impregnated on clothing or documents with the intention of evading security inspections.

The high potency of SCRAs, when combined with the frequent occurrence of unintentional overdosing, has been implicated in multiple mass poisoning events associated with these substances. These incidents have varied in scale, affecting groups ranging from a few individuals to several hundred, and in some cases resulting in fatalities (Riederer *et al.*, 2016; Yoganathan *et al.*, 2022). While the majority of documented outbreaks have occurred in the United States and UK, similar events have also been reported in several European countries (EUDA, 2023b). A worrying trend is the unintentional exposure of cannabis or CBD users to these substances. Specific cases in both the USA and Israel of outbreaks of SCRAs adulterated with brodifacoum - a potent anticoagulant used in rodenticide products - have led to severe coagulopathies and deaths. These incidents highlight the dangers of unregulated drug markets, where users unknowingly ingest toxic substances with life-threatening consequences (HAN, 2018; Lurie *et al.*, 2023). Furthermore, several cases of low-THC products containing synthetic cannabinoids have been reported (EUDA, 2020). Since 2021, several European countries, including Germany and Sweden, have reported cases of adulterated cannabis containing synthetic cannabinoids. These products, which look similar to natural cannabis, can cause severe intoxication due to the high potency of these synthetic substances.

In addition, the emergence of new semi-synthetic cannabinoids, such as hexahydrocannabinol (HHC), identified in May 2022 and reported by 23 EU Member States and Norway at the end of 2024, raises new concerns. These substances, often derived from cannabidiol (CBD) extracted from low-THC cannabis, are marketed as 'legal' alternatives to cannabis in various forms, such as vaping products or edibles. Their effects on human health remain poorly understood, although there is some evidence that they may have similar effects to cannabis, and acute non-fatal poisonings associated with semi-synthetic cannabinoids have been reported.

1.2. SCRAs in Mayotte

Mayotte island is a French overseas territory in the Mozambique Channel. In this island, synthetic cannabinoids became emblematic since 2012, in absence of other active illicit drugs, improperly named "hard drug", and in concurrence with "bangue", a local low-THC cannabis. Synthetic cannabinoids are smoked in cigarettes and named "chimique". As an island, *i.e.* a confined area with limited border-effect, and as a location where synthetic cannabinoids prevails, Mayotte appeared as a good location to follow the evolution in time and space. Mayotte is a small island (374 km²) but its population is highly heterogeneous: 5 local patois, 2 from Madagascar, 3 from Swahili area, but many immigrants from Africa combine themselves in peer groups -but all sharing precarity, lack of prospects, idleness and violence mundane. Thus, studying this area is expected to be in favor of a better interpretation of clandestine trafficking.

Because of its insularity, the drug market in Mayotte and especially the prices of these drugs are different from those charged in mainland France. For example, the gram of cocaine is sold around 60€ in France and can reach 150€ in Mayotte, limiting use to wealthier communities. This difference is also explained by the distance from producing countries and traditional distribution routes (*e.g.* the Balkan Route). "Bangue" (*i.e.* local cannabis) and "chimique" (*i.e.* SCRAs) are the only narcotic that can be produced locally thanks to, on one hand the good weather conditions for cannabis and on the other hand the importation of precursors and pre-precursors from China or India (Bird *et al.*, 2021).

Indeed, the arrival of SCRAs in 2011 changed the drug market by making it accessible to disadvantaged populations. In fact these products can be 200 times more potent than cannabis, for a price per gram two times cheaper. This will lead to several hospitalizations until 2016, attributed to a phase of discovery of a new product by drug users and at the same time an increase of law enforcement agencies (LEAs) actions this year (OFDT, 2018).

The SCRAs or the precursors and pre-precursors used in the manufacture of SCRAs are bought on the Clear Web. This is made possible by the continuous adaptation of these websites, changing their offer in order to adapt to national and international control systems. Over the last ten years, sales of drugs over the Dark Web also increased thanks to anonymity and the possibility to rate vendors to estimate their level of trust (UNODC, 2021). Then small quantities of SCRAs are delivered by parcel post, by mules or kwassa-kwassa (*i.e.* makeshift boats used by African migrants to reach the island of Mayotte) (OFDT, 2020).

2. The lack of vision on SCRAs

The rapid evolution of these molecules makes it difficult to implement long-term monitoring or disruptive measures. The law enforcement agencies (LEAs) encounter difficulties detecting these substances, which come in many forms (*e.g.* powder, liquid, sprayed on a substrate such as tobacco or cannabis) and do not produce any odor. Moreover, presumptive tests and saliva screening tests have difficulty adapting to the very dynamic nature of the market for New Psychoactive Substances (NPS) making it difficult to detect these substances in postal parcels or when arresting a drug user. This approach could help overcome the diverse forms and the absence of presumptive tests by detecting these substances on the basis of relevant patterns linked to the use or SCRAs trafficking.

A doctrine developed since the 2000s called “Intelligence-led Policing” (ILP) could help LEAs become proactive on the issue of NPS (Ratcliffe, 2003). For example, it is important to be aware of the biases associated with our data source such as the fact that police seizures are more representative of LEAs activities than of the drug market.

Based on institutional statistics (SSMSI, 2025), which group together the offenses recorded by the French police and gendarmerie, we can see that drug use offenses drastically increased between 2022 and 2023 in Mayotte (**Figure 1**). These uses mainly represent cannabis use. Paradoxically the rate of drug trafficking offenses remained stable for the last 8 years, illustrating the difficulty for LEAs to detect all types of offenses equally. Investigations for drug trafficking are often lengthy and require some international cooperation, unlike drug use offenses that are much more visible and easier to report through fines.

Differences appear when comparing mainland France with French overseas territories in the Caribbean (*e.g.* Guadeloupe, Martinique and Guyana) and in the Indian Ocean (*e.g.* Mayotte, La Réunion) (**Figure 2**). These differences can be explained by geographical factors, the Caribbean islands being closer to cocaine productive countries. This also explains the high rate of drug trafficking offenses in Guyana, a territory impacted by the transit of cocaine bound for Europe. The underrepresentation of Mayotte compared to other overseas and mainland France can be explained by multiple hypotheses. 1) The least amount of drug present on the territory due to its insularity, 2) the trafficking and the use of substances less likely to be seized by LEAs like NPS, 3) different priorities than drug trafficking for LEAs (*e.g.* burglaries, public order disturbances, *etc.*). Other complementary data sources are needed to discriminate between hypotheses.

Good intelligence analysis is vital and a comprehensive analysis is only possible by combining public health and safety indicators (*e.g.* hospital admission data, French early warning system, addiction structure, drug checking, wastewater epidemiology, customs seizures, open source investigation, *etc.*). This could lead to mapping SCRAs sales and usage hotspots, targeting offenders or suspicious sending countries, identify the best practice implemented by LEAs and public health actors and above all implementing preventive measures through local partnership.

2. Material and methods

2.1. Sample collection

As previously reported (Richeval *et al.*, 2023), samples of “la chimique” were collected from users by one-to-one solicitation: following the National Detection System of Drugs and Toxic Substances protocol SINTES of the French Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction (OFDT, 2022), social workers of the local platform for addiction prevention and treatment, “Plate-forme Oppelia de Prévention et de soin des Addictions à Mayotte” (POPAM) met users in the street, free of coercion context. A structured interview about living standards, sources of the molecule, consumption, co-addictions, health and social side effects, led to propose to the consumers to offer a part of “Chimique” dose in order to analyse it and inform him of its content. The samples were stored at dark and transported at the biologic and toxicologic laboratory of the university hospital of Lille (mainland France).

The map of sampling had to modified regarding the collect efficiency; more or less, authors tried to follow the prescribed sampling (Figure 1).

2.2 Sample analysis

Comprehensive toxicological screenings for drugs and toxic compounds [with a library of around 1750 substances including over 700 New Psychoactive Substances (NPS)] were performed in each collected sample of “Chimique” using liquid chromatography with high resolution mass spectrometry detection (LC-HRMS), as previously published (Richeval *et al.*, 2017a and 2023). Briefly, after homogenization, 10 mg of each sample was dissolved in 1 mL methanol, then ultrasonicated for 10 minutes. After 1/1000 dilution in methanol, 50 µL were diluted with 100 µL of 5 mM ammonium formate buffer, pH 3, and 50 µL of internal standards (methyl-clonazepam and β-OH-ethyltheophylline) in methanol. Analysis was performed by LC-HRMS using an AcquityTM UPLC chromatograph coupled to Xevo G2 QTOF (Waters) detector. Chromatographic separation was performed using an AcquityTM HSS C18 1.7 µm, 150 mm × 2.1 mm column. The data obtained (positive MSE mode) were reprocessed using a spectral library (i) “in-house” of over 1,750 substances including 750 NPS and metabolites, and (ii) online, HighResNPS (Mardal *et al.*, 2019)

Initially, several detected SCRAs were not present in the spectra library. So, while awaiting reference substances (subsequently ordered from the supplier) and in order to verify the identification of the SCRAs detected, an *in-silico* prediction of retention times and fragmentation spectra was carried out. Retention time prediction was achieved using Message-Passing Neural Networks pre-trained with the METLIN SMRT dataset (Osipenko *et al.*, 2022), data transfer was performed using an in-house data set via a two-stage program and the maximum acceptable difference in retention time (observed/predicted) was 1.5 minutes. Fragmentation spectra were predicted using the CFM-ID 4.0 docker image in ESI-MS/MS spectra at low/10V, medium/20V and high/40V energy (Wang *et al.*, 2021) and data processing was carried out using Unify (Waters, Manchester, UK) and MS-DIAL (Tsugawa *et al.*, 2015). Following LC-HRMS analysis, this calibration curve enabled retrospective determinations of sample concentration in the range 1-100 µg/mg. The following SCRAs were detected (LOD: 0.01 µg/mg) and retrospectively quantified (LLOQ: 0.1 µg/mg; ULOQ: 100 µg/mg) in the collected samples: 5C-APINACA, 4F-ABINACA, 4F-MDMB-BICA, ADB-BUTINACA, ADB-FUBIATA, ADB-4en-PINACA, AFUBIATA, CH-PIATA, MDA 19, MDMB-4en-PINACA, MDMB-INACA, BZO-4en-POXIZID and 5F-BZO-POXIZID.

Detected SCRAs as a pure substance were secondarily obtained (Cayman Chemical, LGC, Molsheim, France). SCRA samples were then quantified as follows to establish a calibration curve based on the sample preparation model. Starting with a 1000 µg/L methanolic solution of each SCRA, successive dilutions were made to obtain the following solutions: 500, 250, 100, 50, 25 and 10 µg/L. As with the samples, 50 µL of each SCRA solution was diluted with 100 µL of 5 mM ammonium formate buffer, pH 3, and 50 µL of internal standards (methyl-clonazepam and β-OH-ethyltheophylline) in methanol. Following LC-HRMS analysis, this calibration curve enabled retrospective determinations of sample concentration in the range 1-100 µg/mg.

3. Results

Illicit drugs were identified in each campaign, totalizing 195 samples (187 cigarettes, 8 powders).

The 13 SCRAs observed were (1 occurrence each) 4F-ABINACA, BZO-4en-POXIZID, (2 occurrences each) ADB-4en-BICA, MDA 19, (2 occurrences) 5C-APINACA, 4F-MDMD-BICA (7 occurrences), 5F-BZO-POXIZID (14 occurrences), CH-PIATA (17 occurrences), ADB-FUBIATA (21 occurrences), ADB-BUTINACA (24 occurrences), AFUBIATA (30 occurrences), MDMB-INACA (70 occurrences) MDMB-4en-PINACA (85).

Vegetal matrix was tobacco, mixed or not with cannabis: 186 cigarettes including tobacco (nicotine as proxy) and 9 containing cannabis (THC as proxy). One cigarette included only cannabis. 5 contained also CBD and 5 contained CBN.

Co-formulants were also observed: medicaments (amantadine 18 occurrences, but amantadine can also be a AFUBIATA precursor, cyamemazine 6 occurrences, and paracetamol/acetaminophen 5 occurrences) and other NPS (bromazolam 18 occurrences, and desalkylgidazepam 1 occurrence).

However, nature and number of samples by campaign strongly differed.

3.1. Samples number

Initially, sampling expected was of 100 samples by campaign. As optimistic as it can appear, previous studies (Cadet-Taïrou & Gandilhon, 2018) estimated the number of consumers close to 800. The Chasse-marée study had to be able to accept samples from one of each of this cohort, even if reaching this goal was highly improbable. Moreover, Chasse-marée team obtained from local prosecutorial authorities that all the seizures stored and made during the period was shared in order to maximize the number of samples to analyse. All the brigades were stressed by authors in order to optimize the seizures.

In practice, no “chimique” samples were sealed, stored in the Registry and no seizure occurred during the year, despite exceptional policy deployment performed. Indeed, between April and June 23, an operation of law taking back control of the ground named Wuambushu occurred. This huge event does not modify the seizure inefficiency, illustrating that only basing on seizure to estimate illicit drug flux is shaky. In the present case, the security forces in Mayotte suffer of intense turnover, the service continuity and memory being the unofficial role of native gendarmes and policemen, who do not ensure it: even if they were pretended know “chimique” existence even presence, they do not know the nature of it nor explained the threat to their non-native colleagues.

To optimize the sample number, authors accepted from the street extra samples, but respected the consign of unique collect by consumer all along the project. Finally, 192 samples were collected.

3.2. Molecules involved

Molecules and concentrations are summarized in **Table 1**.

The two first campaigns presented 7 different SCRAs in the samples. The campaigns 3 to 7 highlighted a stable presence of SCRAs, including AFUBIATA and ADB-FUBIATA, in addition to the ADB-BUTINACA, MDMB-4en-PINACA and MDMB-INACA, which were present each in 7 of the 8 campaigns. Those two last ones were the lone molecules present in the samples in the “chimique” samples of the campaign 8 (40 samples).

A Principal Component Analysis was performed (**Figure 1**) and its low representativeness is striking: with 26.91% of biplot, *i.e.* the sum of the variance explained by F1 and F2, illustrates that the dataset cannot be analyzed with statistical tools (data too heterogeneous, too patchy and not enough samples). However, it outlines the relationship between MDMB-4en-PINACA and MDMB-INACA, in one hand, and BZO-4en-POXIZID and 5F-BZO-POXIZID in the other.

MDMB-4en-PINACA and MDMB-INACA were not strictly associated in the very first campaign. MDMB-4en-PINACA, with a concentration about 0.5-5 µg/g dw, was present partly associated with MDMB-INACA (same order) and partly in association with CH-PIATA and ADB-FUBIATA (one even two orders below those SCRAs), this last mix more present in the South of Mayotte -4 powders were obtained from a “cook”: the three SCRAs were not always associated and never at commercial ratios. MDA 19 was also observed twice in the MDMB-INACA+MDMB-4en-PINACA samples in the chief town. During the second campaign, for which sampling was MDMB-4en-PINACA was mixed ADB-FUBIATA (still two orders below) or with ADB-BUTINACA (same orders). During the campaign 3, MDMB-4en-PINACA can be mixed with MDMB-INACA and ADB-BUTINACA (same order, *i.e.* 0.1-5 µg/mg). After the absence of MDMB-INACA and MDMB-4en-PINACA both during campaign 4, the two were present (alone or only mixed with the other) in the samples of the four last campaigns at prevailing occurrences.

Surprisingly, **Figure 9** outlines BZO-4en-POXIZID and 5F-BZO-POXIZID. Those laters were observed only at campaigns 4 and 5. Due to the absence of MDMB-4en-PINACA and MDMB-INACA in the campaign 4 and the strict distinction between the 11 samples of the mix between AFUBIATA+5F-BZO-POXIZID, very located in a patch of about 3km-radius area, while the “chimique” composition of the rest of Mayotte was trusted by MDMB-4en-PINACA and MDMB-INACA, except 4 samples containing exclusively ADB-BUTINACA at very parent concentrations.

Pivotal place of MDMB-4en-PINACA is the general conclusion of this article, concerning molecule presence, but its ecliptic presence and the versatility of mix in which it is identify illustrate the high volatility of this market.

3.3. Concentrations

Authors assume that there is no information about the SCRAs doses available and expect that the present article will provide a first data.

Concentrations are difficult to summarize. Even excluding powders, “chimique” can be produced in instance of dilution by the consumer or the intermediary; concentrations observed had also to be considered with caution because of (1) the possible traces of highly-concentrated remnants of previous mix able to pollute de current “chimique” mix stored in the same puch tobacco, (2) the cocktail effect of mix and (3) the SCRAs concentration heterogeneity into the cigarettes even if they involve the same SCRAs mix.

Notwithstanding, 4F-MDMB-BICA (jail context), 5F-BZO-POXIZID, ADB-FUBIATA and AFUBIATA are often observed at >100mg/g in “chimique” samples, when 4F-ABINACA (in jail context), ADB-BUTINACA, ADB-4en-PINACA, BZO-4en-POXIZID and MDA 19 never exceeded 10mg/g. MDMB-4en-PINACA and MDMB-INACA concentration ranges are intermediate.

The present article does not aim to interpret molecule per molecule the fine relationships. For details concerning the concentrations and bilateral co-formation patterns, please refer for MDMB-4en-PINACA to Devault *et al.* (2025a), for CH-PIATA to Devault *et al.* (2025b), for 4F-ABINACA Gish *et al.* (2025a), to MDMB-INACA to Gish *et al.* (2025b), to ADB-FUBIATA to Gish *et al.* (2025c). For the other SCRAs, results did not allow to interpret the results due to a too scarce occurrence. The present article aims to observe the divergence in the time and space to confront illicit drug monitoring with field results.

Mayotte being a small island whom towns are organized in the shore, and in order focus on the data and not on a localization which can endanger the volunteers who accepted to offer “chimique” samples, authors anonymized the toponyms, affecting an immediate upper number to adjacent location without providing the precision of rotation direction nor departure point of the rotation. Over the 33 locations, it is possible to rely on the similarities in the “chimique” composition.

Results are provided in **Tables 2 to 9**.

For the campaign 1 (**Table 2**), grouping the compositions is not easy: ADB-FUBIATA and MDMB-4en-PINACA prevail but not as a mix. SCRAs repartition looks confused as in concentrations as in locations (10 molecules for 24 samples).

For the campaign 2 (**Table 3**), amongst the number of SCRAs (6 different molecules for 12 samples), MDMB-4en-PINACA prevails: this SCRA is in all the samples except in one. This campaign result allows to isolate an area (sites 7 and 8) ADB-FUBIATA is in co-formulation with MDMB-4en-PINACA and nowhere else, then sites 8-and 9 where ADB-BUTINACA was found in the cigarettes. AFUBIATA is observed in geographic sectors 9 to 11. MDMB-INACA is only observed in 4 and 15 sectors. 4F-MDMB-BICA is observed in a unique sample obtained in a long-stored sample (pre-COVID).

During the campaign 3 (**Table 4**), 5 SCRAs are observed amongst 15 samples. MDMB-4en-PINACA is observed 6 times focused between 8 to 11 sectors AFUBIATA is only observed in sector 11 where MDMB-4en-PINACA was not. ADB-FUBIATA is observed in 3 and 8-9 sectors but alone in the cigarette in 3 but associated with MDMB-4en-PINACA in 2 of the 3 cigarettes of sector 10. All the 3 cigarettes of sector 10 have MDMB-4en-PINACA but also MDMB-INACA. ADB-FUBIATA is observed only in the 8-9 sectors. Indeed, 5 sectors can be found dealing with 7 types of content: sector 3 only with ADB-FUBIATA, sector 6 only with AFUBIATA, sector 8-9 where ADB-FUBIATA can be (or not) associated to MDMB-4en PINACA, the sector 10 where MDMB-4en-PINACA is always associated with MDMB-INACA and can be associated to ADB-BUTINACA, the sector 11 where AFUBIATA shares the market with a mix of ADB-BUTINACA and MDMB-4en-PINACA.

During the campaign 4 (**Table 5**), 6 SCRAs are found in 18 cigarettes but BZO-4en-POXIZID and 5F-BZO-POXIZID are only observed in the same unique cigarette. The samples allow to segregate 5 areas: sector 5 with the mix AFUBIATA and CH-PIATA (eventually with BZO-4en-POXIZID and 5F-BZO-POXIZID), area between 6 to 8 sectors with only MDMB-INACA, area 10-11 sectors only with ADB-BUTINACA, area sector 13 only with AFUBIATA, area sector 13 with a mix of CH-PIATA and ADB-BUTINACA. From the distant sector 17 a sample was collected with only CH-PIATA but it is disputable to know if this sample is related to sector 13 mix.

During the campaign 5 (**Table 6**), 6 SCRAs are observed amongst 31 samples. 3 main areas can be isolated: the area between 3 to 6 sectors, where MDMB-4en-PINACA is in tandem with MDMB-INACA except in 3 exceptions where ADB-BUTINACA (same sector 4 and exactly the same concentration) are observed amongst 14 cigarettes, an area which covers the sector 11 to 13 where 5F-BZO-POXIZID is always present, with AFUBIATA except in 2 occurrences over 13 samples, then an area which covers the 15 to 20 sectors with a high similarities in the concentrations of MDMB-INACA and BZO-4en-POXIZID. A unique ADB-BUTINACA occurrence is reported in sector 28.

During the campaign 6 (**Table 7**), 4 SCRAs were observed in 7 samples but 2 in a unique sample each, and one of of those 2 at very low concentration but in association with the MDMB-4en-PINACA and MDMB-INACA tandem which is observed in all the samples excepted the one indicated which contained only CH-PIATA.

During the campaign 7 (**Table 8**), 4 SCRAs were observed but ADB-4en-PINACA (2 occurrences) at unquantifiable concentration both in sector 4 in samples containing MDMB-4en PINACA and MDMB-INACA tandem. The unique cigarette collected sector 19 contained ADB-BUTINACA. MDMB-4en-PINACA without MDMB-INACA was observed in the cigarette of sector 31. In cigarettes from sectors 19 and 27, ADB-BUTINACA was observed.

During the campaign 8 (**Table 9**), only 2 SCRAs were observed over 29 samples: the tandem MDMB-4en-PINACA and MDMB-INACA except in 5 occurrences where MDMB-INACA was lacking.

4. Discussion

4.1. Field results over space and time

All over the studied year, from a confuse SCRA situation where no pattern was visible, all the samples from Mayotte contained only the MDMB-4en-PINACA and MDMB-INACA tandem. Between the campaign 2 to 6, a similar situation was observed, despite marginal modifications: 5-6 areas segregated by the SCRA used. Authors cannot support that such areas can be the marketing areas of 5-6 different smugglers gangs without police information: the simplification of the market might be also due to international trafficking driven by the price of the SCRA in the producing countries. However, geographical repartition of SCRA based on street control of smugglers gangs appears as plausible.

Authors were unable to collect in another area, covering the quart of Mayotte superficies. Consumers indicated to the gathering team that smugglers imposed on their clients to refuse answering our questionnaire and giving cigarettes. It indirectly identified at least one other gang. This silent area was between sector 33 and 1.

The SCRA diversity and the progressive reduction of the molecule number is summarized in **Table 10**. This Table illustrates the volatility of the “chimique” market in Mayotte. Except during the interruption period, *i.e.* between campaigns 3 and 4 (6 Christmas weeks) on one hand and 7 and 8 (3.5 months, due to rioting situation in Mayotte then holidays) on the other hand, each monthly campaign during a week was separated by 3 weeks. The differences between each campaign can be severe: between the first and the second campaign, 4 SCRA disappeared from the samples. However, sampling cannot revindicate to the exhaustivity and the efficiency of each differed: whatever the efforts of the 5 teams concomitantly in the field, campaign 7 only gathered 5 samples when, with the same effort, campaign 8 gathered 29 samples (collecting workers did not collect more than one time the same consumer).

4.2. Benchmarking of the evaluation methods for a volatile market

Before wastewater-based epidemiology emergence, the only tools used to assess the scale of drug addiction were (1) health and social sources, *i.e.* emergency room admissions even the number of hospitalizations, questionnaires sent to consumers by social workers, addictological support provided by clinicians and supervisors, (2) judicial and police sources, *i.e.* the number and tonnage of seizures, even incarcerations, intelligence and court reports.

Wastewater-based epidemiology emerged with Zuccato *et al.* (2008) which assumed that, reacting to Lavoisier’s principle, “nothing is lost, nothing is created, everything is transformed” -including illicit drugs. Thus, illicit drugs and their metabolites are dropped in the sewage due to their consumers’ excretions. Knowing the (urinary) excretion rate, the metabolization percentage per metabolite, their concentration in wastewater over a day and the daily volume of wastewater flux, it is possible to back-calculate the consumption for each drug -even segregating amongst the administration routes, like the cocaine and crack distinction. Normalization with Biochemical Oxygen Demand after 5 days, caffeine or pepper mild mottle virus flux allow to determine the contributive population. Since 2008, wastewater epidemiology changed the game: applied to illicit drugs, pesticides, mycotoxins, plasticizers, isoprostaglandine, coprostanol, diseases like COVID... Wastewater-based epidemiology offered a complementary data for illicit drug monitoring overcoming the structural limits of the previous methods: slowness, expansivity and uncertainty of person to person work (in sanitary, social or police-justice contexts). An evaluation based on sanitary, social, police and justice need at least an homogeneous performance of public services, and at exemplary levels.

As an example, in Mayotte, hospital registration for “chimique” addiction collapsed between 2019 and 2023: programs dedicated to “chimique” survey fell because of case absence at emergency and psychiatric services. The addiction prevalence was estimated to 30 the number of addicted people for the whole Mayotte when the present study found at least 140 different consumers by samples and even more by questionnaires (circa 170): Just after the present study, three waves of “chimique” consumers

occurred and overflooded the emergency admissions: unnoticed consuming population puffs in the sanitary services instead of being controlled. Moreover, hospital staff are severely overbusied and overturning: thorough work is unexpectable in such conditions. In the same time, police reported a null “chimique” consumption and the basic knowledge about this severe addiction in Mayotte was lost: staff turn-over operated on professionals exposed to “chimique” use climax (circa 2016). In 2022-2023, even the name of “chimique” was ignored by the crushing majority of policemen, including officers. The native policemen, not affected by turn-over, did not assure their role of “corporate memory”. Authors hypothesize that addicted patients learned to manage their consumption because public overdose cases ceased circa 2018. Consumers buying their doses few minutes before smoking them, the time on the street, i.e. the interpellation period, is too short. Moreover, the rioting situation in Mayotte overbusies police forces, unable to assure community policies and low police. To summarize, investigation effort is pivotal for the performance of methods based on human contacts, and case registration of drug abusing by the public authorities is at least as the evaluation of the public services performance as the evaluation of addiction prevalence.

If Mayotte is a paradigmatic situation, limits of human contact methods are oberated by structural bias: public services efficiency certainly, but also the knowledge of the drug itself: in the present study, only 20% of the consumers know grossly the drug kind they consume since years. For many, only the effect counts. Finally, to minimize or to grandstand, consumers can lie.

If humans can lie, a molecule cannot. Precisely because a molecule cannot speak. However, wastewater-based epidemiology is confronted by the administration diversity for the same drug abuse: maintaining the dialogue with consumers is a crucial point to correctly back-calculate the community consumption (Peyre *et al.*, 2025). Devault *et al.* (2018) previously detailed the limits of wastewater-based epidemiology. Briefly, administration route, effects of human diversity on metabolism, the lack of connection to sewage and the sewage maintenance jeopardize the wastewater-based epidemiology. Moreover, wastewater-based epidemiology did not consider yet the Pareto distribution between consumed quantity per patient. And, concerning SCRAs, metabolism studies to determine the Drug Target Residue e is money- and time-cost. Attributing an excretion rate is the worst because of the ethical frame for such a toxicokinetic experiment.

Limits and perspectives of wastewater-based epidemiology have been extensively discussed in the literature since the emergence of this approach: Pal *et al.* (2012), Choi *et al.* (2018), Lorenzo & Pico (2019), but can be compared in Table 11 to the other exposition and/or market indicators. The drug market is a complex and constantly evolving phenomenon that cannot be captured through a single measure. Each available indicator present in Table 11 offers a partial perspective, shaped by its own methodological, operational, or population-based biases. Institutional indicators, such as seizures, overdose mortality, or treatment entries, are often influenced by public policies, law enforcement priorities, or healthcare accessibility, limiting their neutrality. In contrast, research- and harm reduction-oriented indicators, such as used syringe analysis or drug checking data, provide more targeted or qualitative insights but may lack representativeness. Certain sources, such as wastewater-based analysis or used syringes analysis, offer quantitative, sometimes near real-time monitoring, but fall short in capturing user profiles or consumption patterns.

In this context, **combining multiple indicators** emerges as an essential strategy to overcome the inherent limitations of individual data sources. By integrating quantitative and qualitative, institutional, and community-based data, it becomes possible to:

- Triangulate information to enhance analytical reliability;
- Detect emerging trends (e.g., novel substances, new consumption practices);
- Contextualize local dynamics or those specific to certain populations (e.g., youth, people who inject drugs, recreational users);
- Inform evidence-based public health, prevention, and law enforcement strategies.

In summary, a **multi-source, interdisciplinary approach** is essential to build an accurate, dynamic, and nuanced picture of the drug market. However, this exigence is expensive and the frequency needed

to have a reliable shape of the molecules in the street is questionable: the present work illustrates how a monthly sampling enhances the interpretation quality. As Coynel *et al.* (2005) highlighted for the micropollutant evaluation in surface water, a low-frequency sampling minors the flux; for drug abusing at population scale, the only data available in few hours with high resolute quality is wastewater-based analysis, assuming that the analytical force can be automatized. As challenging is the frequency enhancing of wastewater-based analysis, it is possible: but it is impossible for all the others. It needs systematic toxicokinetic studies and to inform about the biomarker fate of molecule in wastewater, as many studies support since Van Nuijs *et al.* (2012)

The main obstacles for an efficient illicit drug monitoring in wastewater is the detection level. For synthetic drugs in general and SCRAs in particular, the higher activity of the syndrugs compared to imitated illicit drugs involves reduced doses and accrued dilution effects in wastewater where matrix effect can be severe. However, promising studies like Fan *et al.* (2022) and Bade *et al.* (2023) propose pg/L concentration of MDMB-4en-INACA; such quantification level, currently exceptional, might be routine in the future: continuous increasing of analytical efficiency pleads in favour of wastewater-based epidemiology when the other methods cannot be bettered.

5. Conclusion

In addition to being unsurpassable for the quantitative evaluation of drug abuse, wastewater-based epidemiology is the only method able to follow the fluctuations of the illicit drug market. Increasing the sampling frequencies is less expensive than increasing social, sanitary, police and justice staff because this approach can be fully automated. The advantages of wastewater-based epidemiology is often reported: more rapid, precise, reliable and cheap, this community approach is less expensive than concurrence. It is also more flexible. One of the problems of wastewater-based epidemiology is that the human (patient and/or abuser) does not exist as an individual in this approach. Prevalence studies by human contact methods, *i.e.* sanitary, social, police and justice registration, can appropriately complement wastewater-based epidemiology, acting like satellites around it, otherwise they will turn into dead planets.

6. References

- Bade R, Eaglesham G, Shimko KM, Mueller J (2023). Quantification of new psychoactive substances in Australian wastewater utilising direct injection liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, 251:123767.
- Balcaen M, Ventura M, Gil C, Luf A, Martins D, Cunha M, Tögel-Lins K, Wolf D, Blanckaert D, Deconinck D (2023) Challenges in Drug Surveillance: Strengthening the Analysis of New Psychoactive Substances by Harmonizing Drug Checking Services in Proficiency Testing. *Intern J Environ Res Pub Health* 20(5):4628–4638.
- Baz-Lomba JA, Harman C, Reid M, Thomas KV (2017) Passive sampling of wastewater as a tool for the long-term monitoring of community exposure: Illicit and prescription drug trends as a proof of concept. *Water Res* 121:221–230.
- Beckerleg W, Hudgins J (2022) Substance Use-related Emergency Department Visits and Resource Utilization. *West J Emerg Med* 23(2):166–173.
- Bird L, Stanyard J, Moonien V, Randrianarisoa RR (2021) Changing tides-The evolving illicit drug trade in the western Indian Ocean. Global Initiative Against Transnational Organized Crime. 77pp.
- Broséus J, Huhtala S, Esseiva P (2015) First systematic chemical profiling of cocaine police seizures in Finland in the framework of an intelligence-led approach. *Foren Sci Intern* 251:87–94.

- Cadet-Taïrou A, Gandilhon M. 2018. L'offre, l'usage et l'impact des consommations de « chimique » à Mayotte : une étude qualitative. OFDT eds. 80pp. **In French**.
- Campbell S, Poole R (2020) Editorial: Disorderly street users of novel psychoactive substances: What might help? *Crim Behav Ment Health.* 30(2-3):53-58. doi: 10.1002/cbm.2146.
- Caudewilla F, Ventura M, Fornís I, Barratt MJ, Vidal C, Lladanosa CG, Quintana P, Muñoz A, Calzada N (2016) Results of an international drug testing service for cryptomarket users. *Intern J Drug Pol* 35:38–41.
- Choi PM, Tscharke BJ, Donner E, O'Brien JW, Grant SC, Kaserzon SL, Mackie R, O'Malley E, Crosbie ND, Thomas KV, Mueller JF (2018) Wastewater-based epidemiology biomarkers: Past, present and future. *TrAC* 105, 453-469, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.004>.
- Craft S, Austin A, Tooth T, Glover C, Garrett T, Blagbrough IS, Sunderland P, Pudney CR, Freeman TP (2023) Synthetic cannabinoid use in an adult male prison in the UK, *Intern J Drug Policy*, 122, 104219. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2023.104219>.
- Daly ER, Dufault K, Swenson DJ, Lakevicius P, Metcalf E, Chan BP (2017) Use of Emergency Department Data to Monitor and Respond to an Increase in Opioid Overdoses in New Hampshire, 2011-2015. *Public Health Reports®* 132(1_suppl): 73S-79S.
- Dams R, Benijts T, Lambert WE, Massart DL, De Leenheer AP (2001) Heroin impurity profiling: trends throughout a decade of experimenting. *Foren Sci Intern:* 8.
- Devault DA, Maguet H, Penne-Annette A, Merle S, Karolak S, Levi Y (2018) Wastewater-based epidemiology in low Human Development Index states: bias in consumption monitoring of illicit drugs. *Env Sci Pol R* 25(6) 27819–27838.
- Devault DA, Peyré A, Gish A, Richeval C, Pleignet E, Gaulier J-M (2025a) From the curb to the curve: population exposure to the synthetic cannabinoid receptor agonist MDMB-4en-PINACA in Mayotte. *Env Sci Pol Res Accepted*
- Devault DA, Peyré A, Gish A, Richeval C, Pleignet E, Cottreau V, Gaulier J-M (2025b) Data for the epidemiological study of CH-PIATA in wastewater from the study of its presence over 12 months in “la chimique” in Mayotte. *Env Sci Pol Res Accepted*.
- Dittus M, Wright J, Graham M (2018) Platform Criminalism: The ‘Last-Mile’ Geography of the Darknet Market Supply Chain. In: Proceedings of the 2018 World Wide Web Conference on World Wide Web - WWW '18, 2018, pp. 277–286. Available at: <http://arxiv.org/abs/1712.10068> (accessed 31 May 2025).
- Dolejška D, Koutenský M, Veselý V, Pluskal J (2023) Busting up Monopoly: Methods for modern darknet marketplace forensics. *Foren Sci Intern: Digit Invest* 46:301604.
- Durand L, Arensman E, Corcoran P, Daly C, Bennett K, Lyons S, Keenan E, Cousins G (2025) Harms associated with prescription drug misuse in Ireland: A national observational study of trends in treatment demand, non-fatal intentional drug overdoses and drug related deaths 2010–2020. *Drug Alc Dep* 272:112669. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2025.112669>
- EMCDDA (2021) An analysis of drugs in used syringes from sentinel European cities: Results from the ESCAPE project, 2018 and 2019, Technical report
- Esseiva P, Dujourdy L, Anglada F, Taroni F, Margot P (2003) A methodology for illicit heroin seizures comparison in a drug intelligence perspective using large databases. *Foren Sci Intern* 132:139–152. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(03\)00010-0](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(03)00010-0)
- Estrada Y, Sauer J, Dominguez L, Zaidi I, Trinidad AJ, Helmy H, Harocopos A (2025) The prevalence of fentanyl in New York City's unregulated drug supply as measured through drug checking offered at syringe service programs. *Drug Alc Dep* 268:112578. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2025.112578>

- EUDA (2017) European Union Drugs Agency, Synthetic cannabinoids in Europe (Perspectives on drugs) (2017), EUDA, https://www.euda.europa.eu/publications/pods/synthetic-cannabinoids_en.
- EUDA (2020) Low-THC cannabis products in Europe https://www.euda.europa.eu/publications/ad-hoc-publication/low-thc-cannabis-products-europe_en
- EUDA (2021) Synthetic cannabinoids in Europe – a review, https://www.euda.europa.eu/publications/rapid-communications/synthetic-cannabinoids-europe-review_en. 126 pp.
- EUDA (2023) European Union Drugs Agency (2023), European Drug Report 2023: Trends and Developments, https://www.emcdda.europa.eu/publications/european-drug-report/2023_en.
- EUDA (2024a) European Union Drugs Agency (2024), European Drug Report 2024: Trends and Developments, https://www.euda.europa.eu/publications/european-drug-report/2024_en.
- EUDA (2024b) European Union Drugs Agency (2024), EU Drug Market: New psychoactive substances — Distribution and supply in Europe: Synthetic cannabinoids, https://www.euda.europa.eu/publications/eu-drug-markets/new-psychoactive-substances/distribution-and-supply/synthetic-cannabinoids_en.
- EUDA (2024c) European Union Drugs Agency (2024), European Web Survey on Drugs 2024: top-level findings, 24 EU countries and Norway, https://www.euda.europa.eu/publications/data-factsheet/european-web-survey-drugs-2024-top-level-findings_en.
- Fan X, Zhang J, Fu X, Zhou B, Xu Z, Huang H, Han S, Li X (2022) Analysis of synthetic cannabinoids in wastewater of major cities in China. *Sci Tot Env* 827:15426. ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154267>.
- Ford JA, Ortiz K, Schepis TS, McCabe SE (2022) Types of criminal legal system exposure and polysubstance use: Prevalence and correlates among U.S. adults in the National Survey on Drug Use and Health, 2015–2019. *Drug Alc Dep* 237:109511. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2022.109511>
- Fursman H, Finch E, Xiao L, Lefrançois E, Gupta A, Bartlett M, Latimer J, Chadwick S, Roux C, Morelato M (2024) A snapshot of injecting drug consumption from the analysis of used syringes within the Medically Supervised Injecting Centre in Sydney, Australia. *Drug Alc Rev* 43:787–798. <https://doi.org/10.1111/dar.13803>
- Gish A, Richeval C, Gaulier J-M, Devault DA (2025a) Synthetic cannabinoids monitoring by wastewater-based epidemiology: case study of the AKB-48F (4F-ABINACA or 4F-ABUTINACA). *Env Sci Pol Res*. *Accepted*.
- Gish A, Peyré A, Richeval C, Pleynet E, Cottereau V, Gaulier, J-M, Devault DA (2025b) Presence of a synthetic cannabinoid, MDMB-INACA, in “Chimique” in Mayotte: preliminary data on metabolism with a view to a future epidemiological study based on wastewater. *Env Sci Pol Res*. *Accepted*.
- Gish A, Peyré A, Richeval C, Pleynet E, Cottereau V, GaulierJ-M, Devault DA (2025c) Elucidation of human metabolism of ADB-FUBIATA for population exposure assessment. *Env Sci Pol Res*. *Accepted*.
- Giulini F, Keenan E, Killeen N, Ivers J-H (2023) A Systematized Review of Drug-checking and Related Considerations for Implementation as A Harm Reduction Intervention. *J Psych Drugs* 55:85–93. <https://doi.org/10.1080/02791072.2022.2028203>
- Hachem M, Mizouni R, Alawadhi IM, Altamimi MJ (2023) Digital forensic intelligence for illicit drug analysis in forensic investigations. *Science* 26:108023. <https://doi.org/10.1101/2023.10.05.550000>
- HM Inspectorate of prisons (2015) Changing patterns of substance misuse in adult prisons and service responses, HM Inspectorate of prisons <https://webarchive.nationalarchives.gov.uk/ukgwa/20240415095405/https://www.justiceinspectorates.gov.uk/hmiprisons/inspections/changing-patterns-of-substance-misuse-in-adult-prisons-and-service-responses/>.

- Hungerbuehler I, Buecheli A, Schaub M (2011) Drug Checking: A prevention measure for a heterogeneous group with high consumption frequency and polydrug use - evaluation of Zurich's drug checking services. *Harm Red J* 8(1):16.
- Lociciro S, Esseiva P, Hayoz P, Dujourdy L, Besacier F, Margot P (2008) Cocaine profiling for strategic intelligence, a cross-border project between France and Switzerland. *Foren Sci Intern* 177:199–206. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.12.008>
- López-Pelayo H, Madero S, Gremeaux L Rönkä S, Matias J (2024) Synthetic Cannabinoids and Cannabis: How the Patterns of Use Differ: Results from the European Web Survey on Drugs. *Int J Ment Health Addiction* 22:1128–1144. <https://doi.org/10.1007/s11469-022-00919-6>.
- Lorenzo M, Picó Y (2019) Wastewater-based epidemiology: current status and future prospects. *Cur Op Environ Sci Health*, 9:77-84.
- Lurie Y, Nadir Y, Hoffman R, Miller A, Efrati E, Ring G, Sonenfeld D, Bar N, Zaidani H, Strizevsky A, Asali M, Lavon O, Kurnik D (2023) An outbreak of severe coagulopathy in northern Israel among users of illicit synthetic cannabinoids adulterated with brodifacoum. *Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)*. 61(6):429-435. DOI: 10.1080/15563650.2023.2215402
- Mardal M, Andreasen MF, Mollerup CB, Stockham P, Telving R, Thomaidis NS, Diamanti KS, Linnet K, Dalsgaard PW. HighResNPS.com: An Online Crowd-Sourced HR-MS Database for Suspect and Non-targeted Screening of New Psychoactive Substances. *J Anal Toxicol*. 2019 Aug 23;43(7):520-527. doi: 10.1093/jat/bkz030. Erratum in: *J Anal Toxicol*. 2019 Jul 24;43(6):e7-e8. doi: 10.1093/jat/bkz049. PMID: 31095696.
- Maghsoudi N, Tanguay J, Scarfone K, Rammohan I, Ziegler C, Werb D, Scheim AI (2022) Drug checking services for people who use drugs: a systematic review. *Addiction* 117:532–544. <https://doi.org/10.1111/add.15734>
- Martin EM, Schneider KE, Sisco E, Appley MG, Rybak M, Elkasabany R, Burnett GM, Sherman SG (2025) Wound-associated agents in the unregulated drug supply: Evidence from a statewide drug checking program. *Intern J Drug Policy* 135:104677. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2024.104677>
- Maybir J, Chapman B (2021) Web scraping of ecstasy user reports as a novel tool for detecting drug market trends. *Foren Sci Interna: Dig Invest* 37: 301172.
- Mgebrishvili T, Kirtadze I, Potter GR, Otiashvili D (2025) Patterns of cannabis cultivation, cannabis and other drug use and market participation among Georgian small-scale cannabis growers: Results of online cross-sectional survey. *Intern J Drug Policy* 104842. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2025.104842>
- Michelot H, Chadwick S, Morelato M, Tahtouh M, Roux C (2020) The screening of identity documents at borders for forensic drug intelligence purpose. *Foren Chem* 18:100228. <https://doi.org/10.1016/j.forc.2020.100228>
- Moe J, Koh J, Ma JA, Pei LX, MacLean E, Keech J, Maguire K, Ronsley C, Doyle-Waters MM, Brubacher JR (2024) Screening for harmful substance use in emergency departments: a systematic review. *Int J Emerg Med* 17:52. <https://doi.org/10.1186/s12245-024-00616-2>
- Moon KJ, Whitehead HD, Trinh A, Hasenstab KA, Hayes KL, Stanley D, Carter B, Barclay R, Lieberman M, Nawaz S (2024) Enhancing drug checking services for supply monitoring: perspectives on implementation in syringe service programs in the USA. *Harm Reduct J* 21:11. <https://doi.org/10.1186/s12954-023-00924-5>
- Morelato M, Beavis A, Tahtouh M, Ribaux O, Kirkbride P, Roux C (2013) The use of forensic case data in intelligence-led policing: The example of drug profiling. *Foren Sci Intern* 226:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.01.003>

Moslah B, Smaoui O, Néfau T, Boukassoula H, Chaouali N, Laaribi M, Nouiou MA, Amira D, Hedhili A (2024) Detected substance abuse among injecting drug users through analysis of used syringes in Tunisia. *Foren Sci Intern* 365:112299. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2024.112299>

OFDT (2020) Drogues et addictions dans les outre-mer. 84pp. ISBN979-10-92728-40-8 **In French**

OFDT (2025) Drogues et addictions, chiffres clés. OFDT. 10 pp. Available at: <https://www.ofdt.fr/publication/2025/drogues-et-addictions-chiffres-cles-2025-2474>. **In French**

Osipenko S, Nikolaev E, Kostyukevich Y (2022) Retention time prediction with message-passing neural networks. *Separations* 9:291.

Palamar JJ, Abukahok N, Le A (2025) Synthetic cannabinoid use among noninstitutionalized individuals in the United States, 2021–2023, Drug and Alcohol Dependence. 270, 2025:112603. <https://doi.org/10.1016/j.drugdep.2025.112603>.

Park JN, Serafinski R, Ujeneza M, McKenzie M, Tardif J, Krotulski AJ, Badea A, Grossman ER, Green TC (2024) Xylazine awareness, desire, use and exposure: Preliminary findings from the Rhode Island community-based drug checking cohort study. *Drug Alc Dep Reports* 11:100247. <https://doi.org/10.1016/j.dadr.2024.100247>

Pulver B, Fischmann S, Gallegos A, Christie R. EMCDDA framework and practical guidance for naming synthetic cannabinoids. *Drug Test Anal*. 2023; 15(3): 255-276. doi:10.1002/dta.3403.

Quireyns M, Van Wichelen N, Boogaerts T, Surmont T, Cunningham A, Matias J, Gys C, Covaci A, Van Nuijs ALN (2025) Evaluating the potential of wastewater-based epidemiology to estimate the retail illicit drug market size in Europe: A case study. *Intern J Drug Policy* 139:104771. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2025.104771>

Ralphs R, Gray P, Sutcliffe OB (2021) The impact of the 2016 Psychoactive Substances Act on synthetic cannabinoid use within the homeless population: Markets, content and user harms. *Int J Drug Policy*. 97:103305. doi: 10.1016/j.drugpo.2021.103305.

Ratcliffe J (2003) Intelligence-led policing. Trends & issues in crime and criminal justice no. 248. Canberra: Australian Instit Criminol. <https://www.aic.gov.au/publications/tandi/tandi248> 6pp.

Ribaux O, Baylon A, Roux C, Delémont O, Lock E, Zingg C, Margot P (2010) Intelligence-led crime scene processing. Part I: Forensic intelligence. *Foren Sci Intern* 195:10–16. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.10.027>

Richeval C, Gicquel T, Hugbart C, Le Dare B, Allorge D, Morel I, Gaulier J-M (2017). 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. *Cur Pharmaceut Biotechnol*, 18(10) :806-814.

Richeval C, Humbert L, Dupilet M, Saint-Omer A, Cottreau V, Peyre A, Gaulier J-M, Devault DA (2023). Un panorama actuel de la nature de «La Chimique» consommée à Mayotte: résultats préliminaires de CHASSE-MARÉE. *Toxicol Anal Clin*, 35(2):S32.

Riederer AM, Campelman SL, Carlson RG, Boyer EW, Manini AF, Wax PM, Brent JA (2016). Acute Poisonings from Synthetic Cannabinoids — 50 U.S. Toxicology Investigators Consortium Registry Sites, 2010–2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* ;65:692–695. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6527a2>

Russell E, Sisco E, Thomson A, Lopes J, Rybak M, Burnett M, Heilman D, Appley MG, Gladden RM (2023) Rapid Analysis of Drugs: A Pilot Surveillance System To Detect Changes in the Illicit Drug Supply To Guide Timely Harm Reduction Responses — Eight Syringe Services Programs, Maryland, November 2021–August 2022. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 72:458–462. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7217a2>

- Sacco DL, Probst MA, Mannes ZL, Comer SD, Martins SS, Chang BP (2025) Frequency of Fentanyl Exposure in Emergency Department Patients With Illicit Drug Use. *An Emerg Med* 85:199–204. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2024.10.016>
- Shufflebarger EF, Reynolds LM, McNellage L, Booth JS, Brown J, Edwards AR, Li L, Robinett DA, Walter LA (2024) Fentanyl-positive urine drug screens in the emergency department: Association with intentional opioid misuse and racial disparities. *Drug Alc Dep Rep* 12:100269. <https://doi.org/10.1016/j.dadr.2024.100269>.
- Steenbeek R, Emke E, Vughs D, Matias J, Boogaerts T, Castiglioni S, Campos-Mañas M, Covaci A, De Voogt P, Ter Laak T, Hernández F, Salgueiro-González N, Meijer WG, Dias MJ, Simões S, Van Nuijs ALN, Bijlsma L, Béen F (2022) Spatial and temporal assessment of crack cocaine use in 13 European cities through wastewater-based epidemiology. *Sci Tot Env* 847:157222. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157222>
- SSMSI (2025) Service statistique ministériel de la sécurité intérieure <https://www.data.gouv.fr/fr/datasets/bases-statistiques-communale-departementale-et-regionale-de-la-delinquance-enregistree-par-la-police-et-la-gendarmerie-nationales/#/resources> Accessed May 31.
- Szigeti Á, Frank R, Kiss T (2023) Trust Factors in the Social Figuration of Online Drug Trafficking: A Qualitative Content Analysis on a Darknet Market. *J Contemp Crim J* 39(2):167–184.
- Thomas KV, Bijlsma L, Castiglioni S, Covaci A, Emke E, Grbic R, Hernández F, Karolak S, Kasprzyk-Hordern B, Lindberg RH, Lopez de Alda M, Meierjohann A, Ort C, Pico Y, Quintana JB, Reid M, Rieckermann J, Terzic S, van Nuijs ALN, de Voogt P (2012) Comparing illicit drug use in 19 European cities through sewage analysis. *Sci Tot Env*, 432:432-439 ISSN 0048-9697 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.069>.
- Tsugawa H, Cajka T, Kind T, Ma Y, Higgins B, Ikeda K, Kanazawa M, Van der Gheynst J, Fiehn O, Arita M (2015) MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat Methods*. 12(6):523-6. doi: 10.1038/nmeth.3393. Epub 2015 May 4. PMID: 25938372; PMCID: PMC4449330.
- Van Buskirk J, Naicker S, Roxburgh A, Bruno R, Burns L (2016a) Who sells what? Country specific differences in substance availability on the Agora cryptomarket. *Intern J Drug Policy* 35:16–23. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2016.07.004>
- Van Buskirk J, Roxburgh A, Bruno R, Naicker S, Lenton S, Sutherland R, Whittaker E, Sindich N, Matthews A, Butler K, Burns L (2016b) Characterising dark net marketplace purchasers in a sample of regular psychostimulant users. *Intern J Drug Policy* 35:32–37. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2016.01.010>
- Van Buskirk J, Griffiths P, Farrell M, Degenhardt L (2017) Trends in new psychoactive substances from surface and “dark” net monitoring. *The Lancet Psy* 4:16–18. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)30405-9](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)30405-9)
- Van Nuijs ALN, Mougel J-F, Tarcomnicu I, Bervoets L, Blust R, Jorens PG, Neels H, Covaci A (2011) Sewage epidemiology — A real-time approach to estimate the consumption of illicit drugs in Brussels, Belgium. *Env Intern* 37:612–621. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.12.006>
- van Nuijs ALN, Abdellati K, Bervoets L, Blust R, Jorens PG, Neels H, Covaci A. 2012. The stability of illicit drugs and metabolites in wastewater, an important issue for sewage epidemiology? *J Hazard Mat*, 239–240, 19-23, ISSN 0304-3894, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.030>.
- Yoganathan P, Claridge H, Chester L, Englund A, Kalk NJ, Copeland CS (2022) Synthetic Cannabinoid-Related Deaths in England, 2012-2019. *Cannabis Cannabinoid Res.* 7(4):516-525. doi:10.1089/can.2020.0161.
- Zuccato E, Gracia-Lor E, Rousis NI, Parabiaghi A, Senta I, Riva F, Castiglioni S (2017) Illicit drug consumption in school populations measured by wastewater analysis. *Drug Alc Dep* 178:285–290. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2017.05.030>

7. Statements & Declarations

7.1. Acknowledgments

Authors thank the volunteers for samplings, French Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction and the Health Agency of Mayotte for their support.

7.2. Funding

Excepting the salary mass, the present study was fully granted by the Regional Health Authority (Mayotte).

7.3. Author Contributions

DD engineered, project structured and fund-raised the project, critical samples was ensured by DD, samples were analyzed by AG, CR and JMG. DD, NF, JMG and LF interpreted the results.

7.4. Ethical Approval

Concerning the chemical work, no ethical issue has been dealt with.

Concerning the collecting work, ethical issue was subordinate to SINTES accreditation.

7.5. Consent to Participate

Following the SINTES accreditation, the consumers freely offered their “chimique” samples.

7.6. Consent to Publish

All the authors consent to participate to this article.

7.7. Competing Interests

The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

7.8. Data Availability Statement

The authors declare that the data supporting the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

7.9. Clinical trial number

Not applicable.

7.10 Human Ethics and Consent to Participate

Not applicable

7.11 Clinical trial number

Not applicable.

Figure captions

Figure 1: Rate of drug use and drug trafficking offenses per 1000 inhabitant in Mayotte

Figure 2: Rate of drug use and drug trafficking offenses per 1000 inhabitant in French overseas and mainland France in 2023

Figure 3: Principal Component Analysis performed from the samples of all the locations and campaigns

Tables

Table 1: Summary of the concentrations ($\mu\text{g}/\text{mg}$) from samples collected in the 8 campaigns of CHASSE-MAREE program. Under bracket: samples from prison. *Ital.*: powder samples.

Table 2: Concentration of “chimique” samples collected during the campaign 1 ($\mu\text{g}/\text{mg}$). *Ital.*: powder samples.

Table 3: Concentration of “chimique” samples collected during the campaign 2 ($\mu\text{g}/\text{mg}$). *Ital.*: powder samples.

Table 4: Concentration of “chimique” samples collected during the campaign 3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$). *Ital.*: powder samples.

Table 5: Concentration of “chimique” samples collected during the campaign 4 ($\mu\text{g}/\text{mg}$). *Ital.*: powder samples.

Table 6: Concentration of “chimique” samples collected during the campaign 5 ($\mu\text{g}/\text{mg}$). *Ital.*: powder samples.

Table 7: Concentration of “chimique” samples collected during the campaign 6 ($\mu\text{g}/\text{mg}$). *Ital.*: powder samples.

Table 8: Concentration of “chimique” samples collected during the campaign 7 ($\mu\text{g}/\text{mg}$). *Ital.*: powder samples.

Table 9: Concentration of “chimique” samples collected during the campaign 8 ($\mu\text{g}/\text{mg}$). *Ital.*: powder samples.

Table 10: Sample number collected by campaign, SCRAs number in each, new SCRAs in the samples of the considered campaign not observed in the immediate previous, and absent SCRAs in the considered campaign but observed in the immediate previous.

Table 11: Comparison of drug market indicators with the strengths and biases of each

Table 1

	Campaign	Average	Standard deviation	Median	Min-max	N
4F-ABINACA	2	[1.2]				1
4F-MDMB-BICA	2	54.44	82.15	2.1	2.1 [0.3-216]	7
5C-APINACA	1	3.20	3.11	3.2	T-5.4	3
5F-BZO-POXIZID	4	122.00				1
	5	42.33	19.58	37.5	27-101	13
	1	1.90	1.27	no	0.21-1	2
	2	1.09	0.42	1.1	0.7-1.8	7
	3	1.28	1.75	0.32	0.21-3.3	3
ADB-BUTINACA	4	3.70	1.90	2.6	2.2-6.4	5
	5	7.63	0.75	8	6.5-8	4
	6	0.30				1
	7	6.50	2.55		4.7-8.3	2
ADB-4en-PINACA	7	3.55	0.5	3.55		2
	1	53.87	39.55	50	T-126 (795)	11
ADB-FUBIATA	2	272.40	277.02	142	[7] 521-617 [142]	5
	3	0.78	0.33	0.8	0.3-1.2	5
	2	96.12	197.94	14	14-450	5
AFUBIATA	3	54.13	8.57	51.9		6
	4	72.53	117.04	25.5	23-360	8
	5	13.64	6.49	11.4	10.2-32.8	11
BZO-4en-POXIZID	4	2.40				1
	1	29.83	43.39	11	0.74-130 (540)	9
CH PIATA	4	4.31	5.29	2.6	T-13.6	6
	6	18.00				1
MDA 19	1	1.50	1.27	no	0.6-2.4	2
	1	1.52	1.63	0.8	0.15-5.5 (41)	15
	2	2.85	2.62	1.1	0.5-7.1	11
	3	0.27	0.11	0.3	0.1-0.38	6
MDMB-4en-PINACA	5	8.75	1.68	8.7	5.4-12.3	13
	6	9.70	1.47	9	8.0-12.0	7
	7	3.23	4.56	0.63	0.56-8.5	3
	8	22.33	29.57	12.4	0.06-108	29
	1	1.81	3.39	0.52	0.03-11	10
	2	11.33	6.73	13.1	[3.9] 13.1-17	3
	3	0.27	0.21	0.17	0.14-0.51	3
MDMB-INACA	4	7.63	2.66	7.4	5.1-10.4	3
	5	23.64	7.98	21.8	11.8-42.2	13
	6	19.79	5.03	21.5	11.6-26.6	7
	7	0.20	0.01		0.19-0.2	2
	8	6.34	16.57	1.19	0.1-17.7	23

Table 2

Location	5C-APINACA	4F-ABINACA	4F-MDMB-BICA	ADB-BUTINACA	ADB-FUBIATA	ADB-4en-PINACA	AFUBIATA	CH-PIATA	MDA 19	MDMB-4en-PINACA	MDMB-INACA	BZO-4en-poxizm	5F-BZO-poxizm
5				107		20		0.60					
8				66		5.60		0.4					
8				81		5.10		0.5					
10								0.60	0.4	0.80			
10			1.0					2.4	0.8	0.80			
11	1			126									
16									0.56	1.5			
17				1.3		72				0.03			
19				2.3		130				0.08			
20		2.70			T			0.26					
21				27		11		1.2					
23				31		5		0.15					
22								0.25					
24				50				3.6					
25				54		19		1.5					
26		2.8						1.5	0.19				
28			T					4.3	11				
29				795.00									
29				0.9	8.9		7.4		41	0.24			
29	T					540							
29						5.7							
30								1.5	3.4				
31					47		0.74		5.5				
32	5.40		0.210	1.900				10		0.05			

Table 3

Location	5C-APINACA	4F-ABINACA	4F-MDMB-BICA	ADB-BUTINACA	ADB-FUBIATA	ADB-4en-PINACA	AFUBIATA	CH-PIATA	MDA 19	MDMB-4en-PINACA	MDMB-INACA	BZO-4en-POXIZID	5F-BZO-POXIZID
3									5				
4									7.1	17			
7					617				4.4				
8					521				3				
8				1.4					0.9				
8				11					0.7				
8				1.8					0.9				
9						14			11				
9					0.7				0.5				
10						450							
11			2.1			14.8			0.7				
15									7.1	13.1			

Table 4

Location	5C-APINACA	4F-ABINACA	4F-MDMB-BICA	ADB-BUTINACA	ADB-FUBIATA	ADB-4en-PINACA	AFUBIATA	CH-PIATA	MDA 19	MDMB-4en-PINACA	MDMB-INACA	BZO-4en-POXIZID	5F-BZO-POXIZID
3				0.3									
6						56							
6						70							
8					0.8								
8						1.2				0.3			
9						0.9				0.3			
9						0.7							
10										0.1	0.14		
10				0.32						0.15	0.17		
10				0.21						0.38	0.51		
11						52.8							
11				3.3						0.36			
11						51							
11						45							
11						50							

Table 5

Location	5C-API ^N ACA	4F-ABINACA	4F-MDMB-BICA	ADB-BUTINACA	ADB-FUBIATA	ADB-4en-PINACA	AFUBIATA	CH-PIATA	MDA 19	MDMB-4en-PINACA	MDMB-INACA	BZO-4en-POXIZID	5F-BZO-POXIZID
5								65.9					
5								26.7	0.25				
5								360	13.6				
5								32.3	2.3			2.4	122
6												5.1	
8												10.4	
8												7.4	
10				5									
11					2.6								
11						6.4							
13							24						
13							23						
13							24						
13							24.3						
13				2.3				T					
13					2.2				2.6				
17									2.8				

Table 6

Location	5C-APINACA	4F-ABINACA	4F-MDMB-BICA	ADB-BUTINACA	ADB-FUBIATA	ADB-4en-PINACA	AFUBIATA	CH-PIATA	MDA 19	MDMB-4en-PINACA	MDMB-INACA	BZO-4en-POXIZID	5F-BZO-POXIZID
3										5.4	11.8		
3										11.2	36		
4										12.3	42.2		
4				8									
4											8.7	21.1	
4					8								
4						8							
4										9.4	24		
4										8.3	21.8		
4										8.0	21		
4										7.9	18.6		
5										9.3	27.6		
6										7.6	17.6		
6										8.8	24.7		
11							10.5					27.00	
11							10.8					33.20	
12												101	
13							11.4					37.5	
13												34.6	
13							13.8					46	
13							11	T				37.8	
13									10.2			29.2	
13									32.8			42.4	
13									11.8			29.2	
13									14.2			28.7	
13									12.7			55.3	
13									10.8			48.1	
15										8.1	18		
16										8.5	22.10		
20										8.7	22.70		
28				6.5									

Table 7

Location							
5C-APINACA							
4F-ABINACA							
4F-MDMB-BICA							
ADB-BUTINACA							
ADB-FUBIATA							
ADB-4en-PINACA							
AFUBIATA							
CH-PIATA							
MDA 19							
MDMB-4en-PINACA							
MDMB-INACA							
BZO-4en-POXIZID							
5F-BZO-POXIZID							
1				9	17.6		
4				11.1	23.1		
6				10.3	21.5		
6				9	16		
6				12	26.6		
22			18				
28	0.3			8	11.6		

Table 8

Table 9

Location	5C-APIACA	4F-ABINACA	4F-MDMB-BICA	ADB-BUTINACA	ADB-FUBIATA	ADB-4en-PINACA	AFUBIATA	CH-PIATA	MDA 19	MDMB-4en-PINACA	MDMB-INACA	BZO-4en-POXIZID	5F-BZO-POXIZID
1									14.10	1.23			
1									35	11.2			
1									0.93	0.47			
1									13.4	0.62			
2													
3									61.1	1.02			
4									8.65	1.46			
4									12.6	1.47			
5									8.21	0.8			
5									4.64	1.15			
5									67	1.72			
8									108	77			
10									7.43	1.9			
10									94.1	0.78			
10									52.5	1.75			
11									14.8	2.45			
14									12.5				
15									53	17.7			
15									0.45	0.12			
15									0.3				
16									0.53	0.18			
16									6.04				
18									0.74				
22									0.06				
28									14.3				
29									0.31	0.22			
30									43.5	15.9			
32									12.4	0.1			
33									0.47	0.19			

Table 10

Sample number	SCRAs number	New SCRAs	Absent SCRAs
24	10	NA	NA
12	6	1	4
15	5	0	1
17	6	2	1
31	7	1	0
7	4	0	3
5	4	1	1
29	2	0	2

Table 11

Drug market indicators	Strengths	Main associated biases	References
Police arrests, seizures, and forensic analysis	Allow the study of drugs routes and smuggling methods	Strongly associated with police actions and priorities. Often used on a case-by-case basis rather than in a global context	Dams <i>et al.</i> (2001) ; Esseiva <i>et al.</i> (2003) ; Lociciro <i>et al.</i> (2008) ; Ribaux <i>et al.</i> (2010) ; Morelato <i>et al.</i> (2013) ; Broséus <i>et al.</i> (2015) ; Michelot <i>et al.</i> (2020) ; Hachem <i>et al.</i> (2023).
Opensource and Dark web monitoring	Provide qualitative information on drug market (<i>e.g.</i> usual doses, routes of administration, prices) and can capture emerging trends	Limited representativeness	Caudevilla <i>et al.</i> , (2016) ; Van Buskirk <i>et al.</i> (2016ab, 2017) ; Dittus <i>et al.</i> (2018), Maybir & Chapman, (2021), Zambiasi (2022), Dolejška <i>et al.</i> (2023), Szigeti <i>et al.</i> (2023)
Prevalence surveys	Provide qualitative information on drug use like usual doses or routes of administration	May exhibit non-response or under-reporting bias	Van Buskirk <i>et al.</i> (2016), Ford <i>et al.</i> , (2022), Mgebrishvili <i>et al.</i> (2025), OFDT (2025)
Medical emergencies data and treatment entry	Provide information on most harmful and potent drugs and allow the detection of new substances. Reflects problematic usage trends	Analytical research only of overdoses and few statistics data. Depends on access to medical care and legal framework	Daly <i>et al.</i> (2017), Beckerleg & Hudgin (2022), Moe <i>et al.</i> , (2024), Shufflebarger <i>et al.</i> (2024), Durand <i>et al.</i> (2025), Sacco <i>et al.</i> (2025)
Drugs checking data	Provide real-time information on drug (<i>e.g.</i> composition, purity, adulterants) and allow the detection of new substances	May not be representative of all users depending on harm reduction policies or access to these facilities	Hungerbuehler <i>et al.</i> , (2011), Maghsoudi <i>et al.</i> (2022), Balcaen <i>et al.</i> (2023), Giulini <i>et al.</i> (2023), Moon <i>et al.</i> , (2024), Park <i>et al.</i> , (2024), Estrada <i>et al.</i> , (2025), Martin <i>et al.</i> , (2025)

Used Syringes analysis	Detects injected substances and can reflect change in use trend among people who inject drugs	Limited to injection drugs and specific population	EMCDDA (2021), Russell <i>et al.</i> (2023), Fursman <i>et al.</i> (2024), Moslah <i>et al.</i> (2024)
Wastewater analysis	Quantitative, near real-time data on drug consumption over time	Cannot distinguish between occasional and regular users	Van Nuijs <i>et al.</i> (2011), Baz-Lomba <i>et al.</i> (2017), Zuccato <i>et al.</i> (2017), Steenbeek <i>et al.</i> (2022), Quireyns <i>et al.</i> (2025)

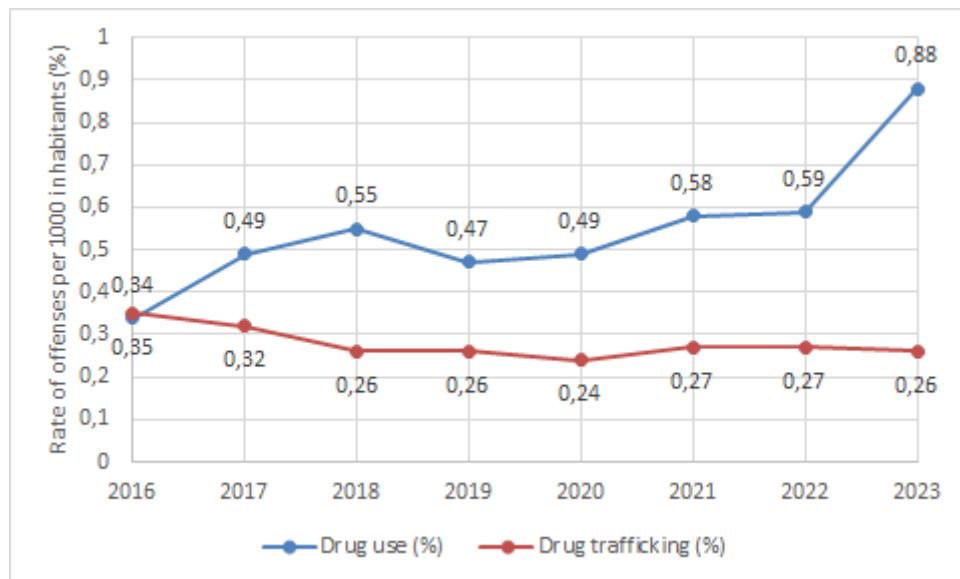


Figure 1

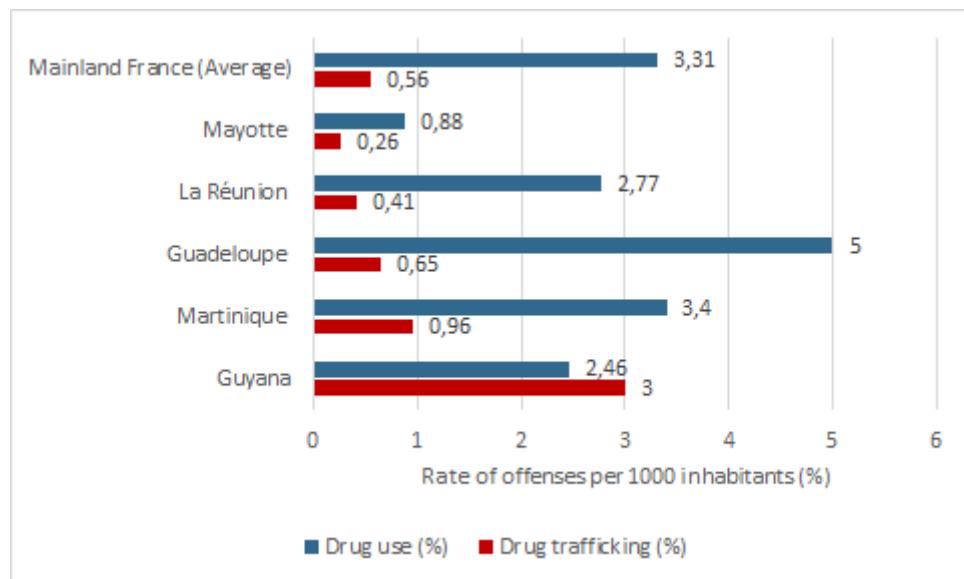


Figure 2

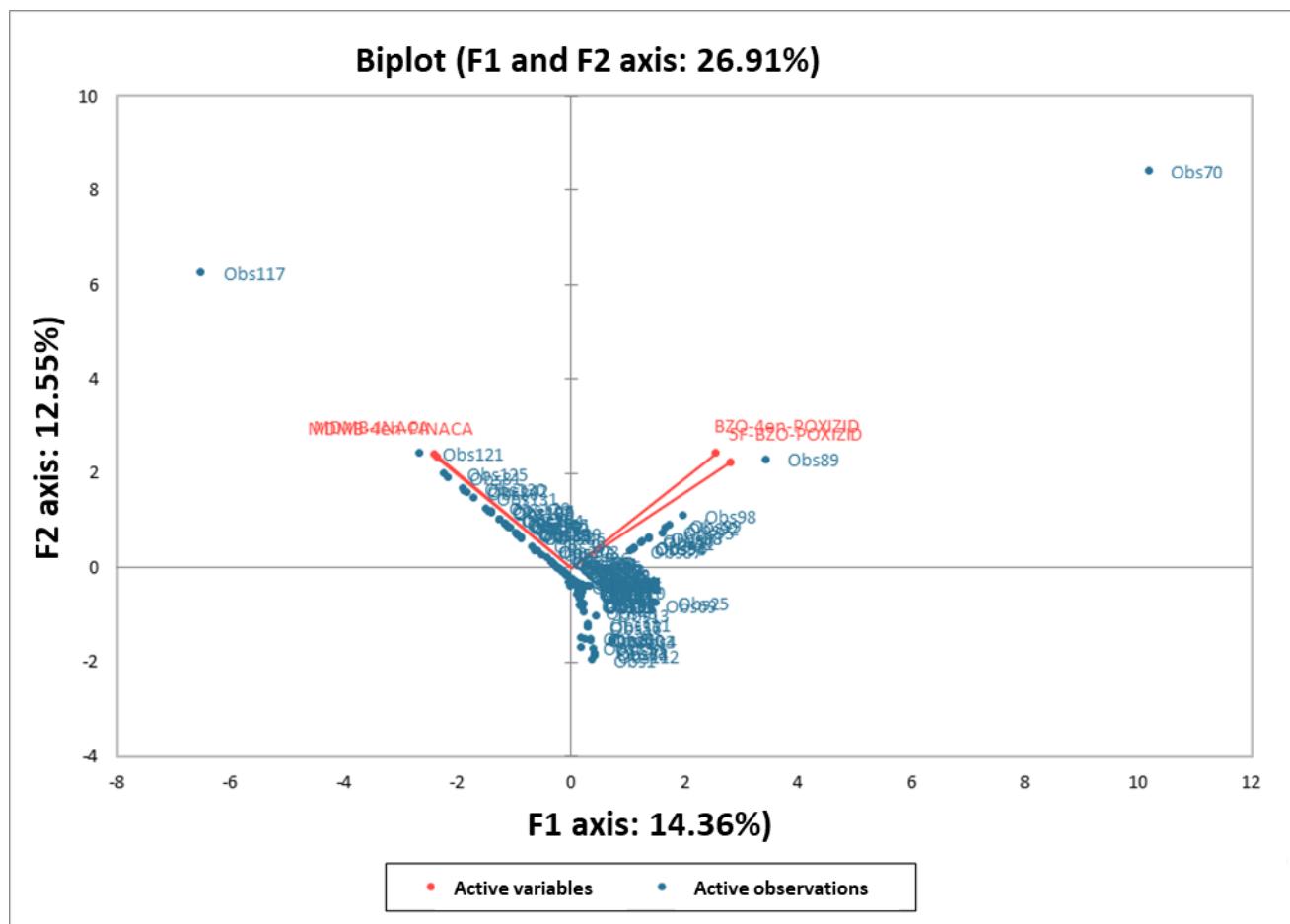


Figure 3

Article 9

Gish A, Peyré A, Richeval C, Pleignet E, Cottreau V, Gaulier JM, Devault DA.

Elucidation of human metabolism of ADB-FUBIATA for population exposure assessment.

***Environ Sci Pollut Res Int.* 2025. doi : 10.1007/s11356-025-36571-5. - (Currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2022: 5,8)**

Article 10

Devault DA, Peyré A, **Gish A**, Richeval C, Pleignet E, Cottreau V, Gaulier JM.

Data for the epidemiological study of CH-PIATA in wastewater from the study of its presence over 12 months in “la chimique” in Mayotte.

Environ Sci Pollut Res Int. doi: 10.1007/s11356-025-36689-6. - (Currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2022: 5,8)

Article 11

Devault DA, Peyré A, **Gish A**, Richeval C, Pleignet E, Cottreau V, Gaulier JM.

From the curb to the curve : population exposure to the synthetic cannabinoid receptor agonist synthetic cannabinoid MDMB-4en-PINACA in Mayotte.

Environ Sci Pollut Res Int. doi: [10.1007/s11356-025-36744-2](https://doi.org/10.1007/s11356-025-36744-2). - (Currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2022: 5,8)

Article 12

Bertrand-NDoye M, Girard H, **Gish A**, Hakim F, Ghoul C, Hedouin V, Delannoy Y, Scavnion Q, Gaulier JM.

Use of blood micro-samples in forensic thanatology.

Forensic Sci Int (soumis) - (*Currently indexed for MEDLINE - Clarivate Analytics IF 2024: 2,5*)

Forensic Science International
Use of blood micro-samples in forensic thanatology
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Original Research Article
Keywords:	Forensic medicine; toxicology; VAMS; DBS; blood sampling; storage
Corresponding Author:	Myriam Bertrand-Ndoye CHU Lille Lille, FRANCE
First Author:	Myriam Bertrand-Ndoye, MD, DES in Forensic Medecine (in progress)
Order of Authors:	Myriam Bertrand-Ndoye, MD, DES in Forensic Medecine (in progress) Hugo Girard, MD, Clinical Instructor Alexandr GISH, MD, Hospital Assistant in Toxicology Florian Hakim, PharmD, Toxicologist Caroline GHOUL, MD, Forensic Medicine Specialist Valéry HEDOUIN, PhD, Head of Department of Forensic Medecine Yann DELANNOY, MD, Forensic Medicine Specialist Quentin SCANVION, MD, Forensic Medicine Specialist Jean-Michel GAULIER, PharmD, Toxicologist
Abstract:	In forensic thanatology, toxicological blood samples are usually collected from tubes and can be stored for long periods. These pre analysis constraints lead to variations in the blood concentrations of the detected substances. The aim of our prospective study in a forensic institute is to test the use of blood collection supports using absorbent matrices on which the blood is dried (Dried Blood Spot – DBS). This study compares the concentrations found in these volumetric micro-samples (VAMS) with those found in conventional samples. A total of 72 bodies were sampled, 35 of which were subjected to toxicological analysis. Using LC-MS/MS or LC-HRMS methods, six categories of substances were measured, representing a total of 26 molecules. Heroin, most benzodiazepines and cocaine have excellent stability in DBS, when they seem to decrease or disappear in tubes. Using only a usual blood sample, no poisoning or even cause of death would have been established for these substances. As for the other molecules, most of the differences in concentrations found between DBS and usual blood tubes did not imply any change in the medico-legal accountability of the death to the detected drug substances. Equivalent concentrations were found for morphine, codeine and tramadol. The extraction difficulties in detecting THC and its metabolites on DBS were confirmed. The practical use of micro-sampling has been tried and tested on a routine basis and has resulted in a simple, reproducible protocol for everyday thanatological practice. Micro-sampling offers a major advantage for all substances that are unstable in vitro.
Opposed Reviewers:	

Abstract

In forensic thanatology, toxicological blood samples are usually collected from tubes and can be stored for long periods. These pre analysis constraints lead to variations in the blood concentrations of the detected substances. The aim of our prospective study in a forensic institute is to test the use of blood collection supports using absorbent matrices on which the blood is dried (Dried Blood Spot – DBS).

This study compares the concentrations found in these volumetric micro-samples (VAMS) with those found in conventional samples. A total of 72 bodies were sampled, 35 of which were subjected to toxicological analysis. Using LC-MS/MS or LC-HRMS methods, six categories of substances were measured, representing a total of 26 molecules.

Heroin, most benzodiazepines and cocaine have excellent stability in DBS, when they seem to decrease or disappear in tubes. Using only a usual blood sample, no poisoning or even cause of death would have been established for these substances. As for the other molecules, most of the differences in concentrations found between DBS and usual blood tubes did not imply any change in the medico-legal accountability of the death to the detected drug substances. Equivalent concentrations were found for morphine, codeine and tramadol. The extraction difficulties in detecting THC and its metabolites on DBS were confirmed.

The practical use of micro-sampling has been tried and tested on a routine basis and has resulted in a simple, reproducible protocol for everyday thanatological practice. Micro-sampling offers a major advantage for all substances that are unstable *in vitro*.

Key words

Forensic medicine, toxicology, VAMS, DBS, blood sampling, storage

Highlights

- Pre-analytical prolonged storage of *post-mortem* blood following autopsies is a source of *in vitro* variations in the blood concentration of toxicological substances.
- Micro-samples such as *Volumetric Absortive MicroSampling* collect blood which is then dried (DBS) reducing *post-mortem* degradation reactions.
- Molecules that are unstable *in vitro* degrade or even disappear on fluorinated tubes, but remain stable on DBS.
- For some subjects in our study, the presence of a micro-sample makes it possible to diagnose intoxication with heroin, benzodiazepines and cocaine.

Introduction

The forensic pathologist's responsibility during forensic investigations includes the search for a toxic substance that is the direct cause of death or was involved in determining the cause of death. To do this, they must take the appropriate samples.

In France, good practice for these samples has been defined by the decree of November 2nd 1994 relating to the proper performance of medical biology analyses and by the forensic toxicology commission of the Société Française de Toxicologie Analytique (SFTA) (1). Their recommendations are in line with those approved by the European Council of Forensic Medicine in 2020 (2). They establish the need for cold or frozen storage, and for samples to be taken in duplicate to guarantee the possibility of a second opinion. The volume of blood mentioned is 5 to 10 mL of peripheral blood and 30 mL of cardiac blood, stored in a plastic container with a screw cap.

This practice was partly due to the multitude of factors that influence the concentrations of exogenous substances found during toxicological analysis. Variations in the concentration of toxicological substances within the cadaver (*in cadaver*), due to variables such as the *post-mortem* period (PMD) and the body part from which the blood sample was taken, have been widely described in the literature (3–6.6–10). In addition, there are *in vitro* variations in concentration, depending on the properties of the molecule, delay and storage conditions.

There are no regulations governing how long these samples are to be kept; in theory, they could be kept until the case is closed or a verdict has been rendered. Samples taken during the autopsy are not analyzed or destroyed until an expert report is received. The delay taken between the autopsy and the toxicology report varies considerably, generally taking several weeks but sometimes months or even years (1). In addition, transporting and storing tubes can be costly in terms of space and energy, and can lead to loss, breakage and deterioration of the samples. In our forensic institute for 620 autopsies and 455 external examinations in 2024, around 700 blood samples are kept in the CHU toxicology laboratory. They are kept for an estimated 15 days before being examined and are kept for an average of 12 months after analysis, before being re-examined or destroyed.

The development of analytical methods has led to a reduction in the volume of blood required and the emergence of alternative micro-sampling systems, now defined as a system that collects a maximum volume of 50 µL (3,4). These micro-sampling systems collect blood that dries on alternative matrices such as blotting paper for *Dried Blood Spot (DBS)* (5).

Volumetric Absorptive MicroSampling (VAMS) is a descendant of DBS and offers all the advantages of DBS ensuring greater precision in sampling volume and therefore in the quantitative results obtained (16). They are particularly suitable for sampling whole blood, but more recent models can also be used for other biological fluids, such as urine, plasma or saliva. The detection efficiency of molecules on VAMS compared to the fluoride tube was studied in 2023. A detection efficiency of 98% for the tested substances was reported (4).

The use of DBS and VAMS has been already tried and tested in living forensic toxicology in the field of screening for drugs such as cocaine and its metabolites, opiates, natural and synthetic cannabinoids, and alcohol biomarkers such as phosphatidyl ethanol in living subjects (3). However, it has been established that the patterns of degradation or formation of molecules *in vitro* differ depending on whether the blood is *ante* or *post-mortem* (6). Studies have been carried out on *post-mortem* blood for some molecules, while long-term stability studies have been carried out for others. There is few literature studying these two parameters simultaneously, and the use of micro-samples in current thanatology practice has not been tested yet. The first aim of this study is therefore to compare the concentrations found in micro-samples taken during autopsy with those found in conventional samples taken from a fluoride

tube. The second objective is to test how easy they are to use routinely on subjects who have died.

Materials and methods

All samples were taken from forensic institute bodies during the inclusion periods of February 2021 to May 2021 and April 2023 to December 2023. Recruitment is carried out when a body is admitted to the forensic institute.

1. Recruitment

Inclusion criteria

Body kept at the forensic institute and for which an autopsy or external examination with toxicological sampling is required; Body of a deceased adult; *post mortem* delay (PMD) estimated to be less than 96 hours.

Exclusion criteria

Putrefied body; PMD of the body estimated to be greater than 96 hours or unknown; autopsy or external examination without required toxicological sampling.

2 . Equipment used for post-mortem sampling

In 2021, micro-samples were taken from capillary blood in the fingers of the hands using a single-use auto-sampler, a DBS Hémaxis® or a VAMS Mitra ® Neoteryx™.

The absorbent part of VAMS, like VAMS Mitra ® Neoteryx™, is a polymer whose exact nature is patented and remains unknown. They can be used to accurately sample 10, 20 or 30 µL of biological fluid.

The micro-samples taken in 2023 were all performed using a Mitra ® Neoteryx™VAMS on blood taken from a vein in the foot or ankle by a skin prick using a hypodermic needle (20 gauge) or by puncturing femoral blood using a trocar needle (14 gauge) mounted on a 20 mL syringe.

For both inclusion periods, *Microcollection Tubes FE* microtubes were used for the determination of ethanolemia by micro-sampling. These were 0.5 mL fluoride tubes from BD Microtainer ® fitted with a receiving spout.

The standard samples collected during the autopsy were taken from three tubes of femoral blood: one EDTA tube, one fluoride tube and one heparin tube.

3. Sampling protocol

For micro-sampling, they sought a superficial vein on the back of the feet or in the perimalleolar region around the ankles. The sample was taken from clean skin, which had been wiped with a compress in the event of soiling. They pricked the skin with a needle to obtain blood. If the procedure was unsuccessful, it was repeated on a different place on the feet and ankles. When a drop of blood was obtained, two VAMS were placed in contact with the drops until the sponge was full. A micro-tube was then applied to the skin using the receiving nozzle to collect the blood. If this was unsuccessful, a femoral puncture was performed using a needle and syringe.

Conventional autopsy samples were taken by femoral puncture for 4 ml peripheral blood tubes. All the completed samples were placed in the sealed bag with the rest of the toxicological samples.

4. Data collection

The following data were collected: sex and age of the deceased; date and time of death recorded on the death certificate or the date of discovery recorded on the official report; date and time the samples were taken; areas where samples were taken (foot/ankle, femoral or other site); commemorative elements surrounding the entry of the body to the forensic institute, including any history of drug addiction, medical history, known treatment, the possible presence of alcohol, medication or other exogenous substances in the vicinity of the body and any other circumstance in the discovery of the body of potential interest; autopsy conclusions relating to the cause of death, standardized by an autopsy data collection form.

5. Toxicological analysis

The samples were stored at 4°C at the forensic institute. They were sent to the toxicology laboratory once a day, every weekday from Monday to Friday. The DBS (VAMS) were separated from the blood tubes and stored at room temperature. The micro-tubes and blood tubes are stored at 4°C.

Ethanol was measured in 100 µL of blood from the usual liquid blood sample taken at autopsy by gas chromatography with a flame ionization detection (HS-GC-FID).

Comprehensive toxicological screenings for drugs and toxic compounds (with a library of around 1700 substances including over 700 NPS) were performed in each blood samples using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry detection (LC-MS/MS) or with high resolution mass spectrometry detection (LC-HRMS), as previously published (7,8). More selective assays for numerous classes of therapeutic drugs, drugs of abuse, and other various toxicants were also performed in the blood samples using various methods: headspace gas chromatography with flame ionization detection (HS-GC-FID), and LC-MS/MS.

Prior to these analyses, the two types of blood samples were extracted as follows:

- Usual liquid blood sample :100 µL of blood was mixed with 400 µL of sulphosalicylic acid and 100 µL of the internal standard. After vortexing for 3 min, the mixtures were centrifuged for 10 min at 15,000 rpm and 75 µL of the supernatant was injected into the UPLC (Ultrahigh Performance Liquid Chromatography) chromatographic system coupled to hybrid quadrupole/time-of-flight (QTOF) mass spectrometry (VION - IMS QTOF (Waters))
- DBS (VAMS): Blotters containing 10 µL of dried blood are placed in an Eppendorf into which 100 µL of extraction solution is added. The extraction solution was made up of 9 parts methanol to 1 part water and 0.1% formic acid and also contains the internal standards. The mixture was vortexed for 3 minutes and then placed in an ultrasonic tank for 10 minutes to mix and extract the substances present on the blotting paper with the extraction solution. The whole mixture was then centrifuged at 15,000 rpm for 14 minutes. The resulting extract obtained was diluted by half with a 5 mM ammonium formate buffer solution at pH3. Ten µL of the obtained extracts were injected into the UPLC/MS-MS (Xevo® TQ-S (Waters) and UPLC/QTOF (Xevo® G2-XS (Waters) systems.

6. Analysis

The numbers of molecules found during the study were identified and counted. The mean, median and standard deviation were calculated for all PMD. The percentage difference between the concentration obtained from micro-samples and that obtained from tubes was calculated for each molecule, for each of the collected samples. The mean, median and standard deviation were calculated for all cases of the same compound. Subjects were studied on a case-by-case basis, considering multiple poisoning and autopsy findings.

Results

A total of 82 bodies were sampled over the two inclusion periods: 22 in 2021 and 60 in 2023. Of these cases, 35 were subjected to toxicological analysis as part of an expert assessment. The rest of the samples were either destroyed without being analyzed or retained pending an assignment. Toxicological analysis found at least one exogenous substance in 33 of the studied cases.

The average PMD is 51 h 00 (median: 47 h 00; standard deviation: 31 h 00).

The following molecules were particularly searched for :

1. Ethanol ;
2. Cocaine and its metabolites: ecgonine methyl ester (EME), benzoylecgonine (BZE) and cocaethylene;
3. Opiates, the metabolite of heroin, 6-acetylmorphine (6-MAM), morphine and codeine;
4. Methadone and its metabolite 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EPPD);
5. Tramadol and its metabolites O-desmethyl tramadol and N-desmethyl tramadol ;
6. THC, and its metabolites THC-OH and THC-COOH;
7. Molecules belonging to the benzodiazepine family: alprazolam, bromazepam, clonazepam and 7-clonazepam, diazepam, lorazepam, nordazepam, oxazepam, temazepam, zopiclone.

Table 1 summarizes the exogenous substances found in the 33 cases according to the type of sampling used. The percentage difference in concentration between micro-sampling and tube sampling, for cases detected by both types of sampling, is expressed as the mean, median and standard deviation for each molecule.

Two cases of ethanol were not detected on the micro-tube. Three cases had a higher concentration on the micro-tube, five cases had a lower concentration and three had the same concentration (**Figure 1**).

Three cases were positive for 6MAM in the micro-samples and only one in the tubes. The latter showed a concentration difference of -93.61% between the fluorescent tube and the micro-sample (**Figure 2**).

For morphine, one case was undetected in the conventional tube. Two of the cases had a higher concentration in the micro-tube and two had a lower concentration.

For codeine, one case was undetectable on the conventional tube, the same as morphine. One case had a lower concentration on the micro-sample, and the last two cases had identical concentrations on both types of samples.

For methadone, concentrations were generally higher in samples taken from tubes, with an average difference of -50.4% between micro-samples and tubes (table 1 and figure 3). Only one of the eight cases had a higher concentration in the micro-sample, of 40.4%. This is a special case in our study, with a storage time of 2 years. EDDP concentrations were also higher on the

tubes average, with more heterogeneous directions of variation: 3 cases had a higher concentration on the micro-tube and 5 cases had a lower concentration.

Eight of the nine cocaine samples showed a collapsed concentration on the conventional tube compared with the micro-sample. One of the cases, which had been stored for 2 years, had an undetectable cocaine concentration on the tube. Two other cases have extreme concentration variations (915 µg/l and 952 µg/l on the micro-samples for respectively 1.4 µg/l and 2 µg/l on the tubes). Only one case had a higher concentration on the tube with a difference of +4757.1%, *i.e.* a concentration of 68 µg/L compared with 1.4 µg/L on the micro-sample. Excluding this case, cocaine concentrations in the tube were -78.9% lower on average than those in the micro-sample. This case explains the large standard deviation (**Table 1**), while the rest of the variations in concentration are very uniform (**Figure 4**).

For EME, two cases had a higher concentration in the micro-tube and six cases had a lower concentration. For BZE, one case was not detected in the tube, one case had identical concentrations in both samples, three cases had a higher concentration in the micro-tube and four cases had a lower concentration.

As for cocaethylene, in 2 cases there was a higher concentration in the micro-sample, in a third the concentration was higher in the tube and in the last case it was present in trace amounts in both types of sample.

Two cases of tramadol were detected in our study. The first showed a higher concentration of 12.61% on micro-samples (2410 µg/L compared with 2140 µg/L) and the second a lower concentration of 44.29% (210 µg/L compared with 377 µg/L). In both cases, the variations in concentrations were similar in direction and proportion for the tramadol metabolites. For N-desmethyltramadol, the first showed a 23.6% higher concentration in micro-samples, the second a -36.9% lower concentration. For O-desmethyltramadol, the first showed a higher concentration of 70.39% on micro-samples, the second a lower concentration of -18.3%. A third case of O-desmethyltramadol was detected with an identical concentration on the two samples with a variation of -0.53%.

The 2 “THC and THC-OH” samples and the 3 “THC-COOH” samples all showed lower concentrations in the micro-sample than in the conventional sample (**Table 1**).

For eight of the ten benzodiazepines detected, there was a systematic decrease in tube levels compared with micro-sampling. These were alprazolam, bromazepam, clonazepam and its metabolite 7-clonazepam, lorazepam, oxazepam, temazepam and zopiclone (**Figure 5**).

Several cases of benzodiazepine use were negative on their tube samples. Two out of three cases of alprazolam, three out of four cases of lorazepam, four out of eleven cases of oxazepam, one out of two cases of temazepam were not detected on the tube and the second was detected at trace levels. Two of the four cases of zopiclone were not detected, and the third was detected at trace levels in both types of samples. The single case of clonazepam and its metabolite were also undetectable on the tube. Bromazepam appears to be less affected, with both cases remaining detected on the tubes.

For diazepam, two cases were not detected in the conventional tube, but were detected in trace amounts in the micro-sample. One case had a higher concentration in the micro-tube, three cases had a lower concentration, and one case had the same concentration. Finally, for nordazepam, two cases were not detected, five cases had a slightly higher concentration in the micro-tube and 1 case had a lower concentration (**Figure 6**).

To illustrate the impact of these multiple intoxications on forensic thinking, **Tables 2, 3 and 4** present three cases from our study comparing the intoxications found according to the type of sample taken.

In case 4, heroin, cocaine and oxazepam use were not identified on the tube, only the presence of methadone, THC and nordazepam. This is a special case in our study, with a period of two years before the toxicology expert mission was received and analyzed.

In case 11, only morphine and codeine concentrations were detected, and 6MAM was only detected in the micro-sample.

In case 20, the tube did not detect intoxication by codeine, morphine or benzodiazepines.

Discussion

1. Use of micro-samples in the routine operation of the forensic institute

During the first inclusion phase of our study in 2021, DBS samples were taken from the fingertips using a finger pricker.

In the 1970s, Forney *et al.* claimed that capillary concentrations were closer to those in the brain than with blood taken by humeral venipuncture (9). In 2020, given the lack of legal specification in the UK as to the source of blood samples for alcohol testing, the use of capillary blood was again examined as an alternative to venous blood. A significant difference was found between venous and capillary samples, and the difference was consistent with previous studies. Taking into account an underestimation of the alcohol content compared with venous sampling, capillary blood was thus established as a viable matrix (10).

At the time of the initial results of our study, an aberrant difference in the concentration of cocaine and its metabolites was noted in one of the cases of capillary sampling (case #5), which was much higher than conventional sampling. This aberrant result was attributed to contamination of the deceased's fingers due to the manipulation of drug prior to consumption and was excluded from the results. Cleaning with water or physiological saline solution could overcome this problem. However, this solution is not ideal considering the forensic recommendation to preserve the condition of a body's hands prior to autopsy, to collect sample for genetic purposes or to swab for gunpowder in the event of a firearm shot to name a few. It was therefore decided, when considering the 2023 protocol, that samples would be taken from the lower limbs, which are less exposed to contamination, and whose location is less likely to constitute an anthropological artefact that could be misinterpreted during the autopsy.

The initial 2023 protocol advocated sampling from the pulp of a toe to preserve the idea of an easily performed and minimally invasive capillary sample, as in the living subject. However, the toes and dorsal veins of the feet become bloodless because of passive blood migration after death. Attempts to sample a toe have all proved unsuccessful. Sampling the superficial veins of the foot has yielded inconsistent results. The best sampling site found in the trials was the lateral retro-malleolar vein. However, it is necessary to learn the technique of our sampling protocol and, once acquired, it remains tedious, random and time-consuming. As a result, it has not been adopted by all sampling agents, who prefer femoral blood puncture. However, it could be more easily carried out when the body is removed, before the blood migrates and the body is refrigerated.

The use of micro-sampling of capillary blood with non-invasive sampling, as in living subjects, is therefore not appropriate for *post-mortem* sampling, despite the small volume of blood that is required.

2. Variations in concentrations observed per molecule as a function of the sampling medium.

2. 1 Ethanol

As ethanol is a volatile compound, DBS devices are not suitable for sampling. A paediatric micro-tube was used in our study for its determination. The absence of detection on two of the micro-tubes in our study was due to blood clotting, making the samples unusable. These hazards must be taken into consideration when applying the use of micro-tubes to our practice. The use of a vortex in the autopsy room reduced this risk in our subsequent practice.

Mandrioli *et al.* (11) have already tested the feasibility of reducing the volume of blood collected in tubes for forensic alcohol testing. This could be of economic and logistical benefit, with a reduction in storage costs in both volume and weight.

2.2 Opiates and opioids

Although each opiate has its own metabolites, morphine is a metabolite common to most opiates. This makes it difficult to identify the opiate that was initially consumed. Morphine itself is transformed into morphine-6-glucuronide (M6G) and morphine-3-glucuronide (M3G) (12).

2.2.1 Heroin and 6-MAM

Heroin is never identified as a molecule, but its specific metabolite, 6-MAM, is its only marker of consumption in toxicology; without its presence, heroin consumption cannot be established (13). The difficulty of attributing a death to heroin use is frequently encountered in forensic practice, as 6-MAM is very rapidly metabolized into morphine in living subjects, making it impossible to identify heroin use when death occurs more than two hours after a dose has been taken (14).

The degradation of 6-MAM *in cadaver* and *in vitro* is a known phenomenon. The persistence of enzymatic activity and *post-mortem* bacterial degradation lead to its deacetylation into morphine, requiring the addition of sodium fluoride as a preservative to slow its degradation *in vitro*. Nevertheless, degradation persists in liquid blood stored at +4°C (13,15).

This explains its considerable reduction, or even disappearance, after the standard tube has been preserved, and the absence of detection of 6-MAM in two of the three liquid blood samples in our study, whereas it is in fact detected in samples of dried blood.

Its degradation at -20°C was also studied by Gudrun Høiseth on *ante-* and *post-mortem* blood samples, over long storage periods of 9 years. All live samples were negative on reanalysis. For *post-mortem* samples, 4 out of 17 cases were still positive for 6-MAM, with a median variation in concentrations of -81% (16).

With regard to micro-samples, 6-MAM has been the subject of studies enabling detection limits to be established as a function of linear calibrations of 6-MAM concentrations artificially deposited on DBS, with evidence of a good detection limit (17,18). However, its long-term stability on dried blood has not been described.

The results of our study show good stability of 6-MAM on DBS and VAMS for *post-mortem* blood. One of these cases had a storage period of two years (case# 4). The contribution of this medium is therefore major, both in the initial analysis of samples and in their re-analysis months or years later. In fact, it would not have been possible to establish heroin use if only conventional sampling had been carried out on the two cases described.

2.2.2 Morphine

In *ante-mortem* blood, once collected, morphine is relatively stable in fluoride tube samples stored at 4°C, although decreases of around 30% over 20 days have been reported (6). As with most molecules, its stability is better in samples frozen at -20°C (38). Gudrun Høiseth's study reports a median variation in concentration of -3.7% over 9 years of storage .(16)

It should be noted that its degradation pattern differs in *post-mortem* blood. In *cadaver*, bacterial enzymatic hydrolysis of the conjugated morphine metabolites (M6G and M3G) can increase the free morphine concentration relative to the *ante mortem* concentration to high levels at room temperature (6).

The study by Gudrun Høiseth demonstrated a median variation in morphine concentration of -12% in *post-mortem* blood samples stored for 9 years at -20°C. Storage for 16 to 18 years was tested by Karinen *et al.* in *post-mortem* blood in tubes. Morphine-containing samples showed changes with an increase of around 30% for 27 of the 35 morphine samples. An increase of more than 50 to 257% was noted for three others and a decrease of 59 to 100% was noted for the last five (19).

It therefore appears that despite the relative overall stability of morphine, some samples vary more unpredictably when *post-mortem* blood is involved. Individual cases may see their concentrations decrease or increase outside the average proportion, which is consistent with the results of our study.

With regard to long-term stability on DBS and VAMS, the studies carried out showed that most of the molecules sampled on VAMS or DBS were stable without significant variation over a period of one week at room temperature and over several months at -20°C (4). However, variations have been observed over shorter storage times. For Mestad *et al.* a higher concentration of morphine was observed in VAMS samples extracted after 2 weeks compared to samples analyzed after 24 hours of storage at room temperature in 2021. This result is similar to the result published by Simões in 2017, over a period of eight months frozen at -10°C (20). In our study, the storage times were not standardized, and the analyses were carried out in the actual operating situation of the toxicology department. We benefited from one case with a consistent storage time of 2 years, which showed equivalent concentrations between the DBS and the conventional fluoride tube. Another case showed an undetectable morphine concentration in the blood tube for a shorter storage time. The final concentrations found in our study after a variable storage time should therefore not be considered as the result of a single, linear increase or decrease.

2.2.3 Codeine

In the studies by Gudrun Høiseth *et al.* and Karinen *et al.* cited above, the stability of codeine was relatively similar to that of morphine. For *ante mortem* blood samples, the median variation in concentration was -5.3% over a period of 9 years. For *post-mortem* samples, it was -11% (16). Of the 22 samples analyzed for codeine after storage for 16 to 18 years, 17 showed variations in concentration of less than ± 30%. The concentration decreased in three samples by between 34% and 84% and increased by more than 400% in two samples (19).

With regard to its study on DBS, the recovery rate of codeine studied by Mestad *et al.* in 2021 was 53% (20). Its stability over an eight-month period at -10°C was established by Simões *et al.* (21). These results are difficult to compare with the parameters of our study, *i.e.* storage at 4°C for a storage time of a few days to weeks.

2.2.4 Methadone

Jamey *et al.* studied the stability of methadone on drops of blood dried on glass slides to assess the value of toxicological screening on drops of blood collected from crime scenes. The tests were carried out on *ante-mortem* whole blood to which methadone had been artificially added (5). The blood was stored for one month at various temperatures (-20°C, +4°C, room temperature, +35°C and fluctuating outside temperature, as well as in light or dark place). Methadone concentrations were relatively stable, with a maximum decrease of 40% at +35°C.

With regard to its long-term storage in *post-mortem* blood tubes, five samples were analyzed after 16 to 18 years of storage by Karinen *et al* and variations in concentrations were within \pm 30% of the initial concentration (19).

Saracino *et al.* analyzed methadone in dried blood samples taken from patients undergoing substitution treatment. They found extraction yields, sensitivity, selectivity and precision to be satisfactory. The study of stability over eight months was also satisfactory (22).

In our study, there was an overall trend towards higher concentrations of methadone and its metabolites in fluoride tube samples than in micro-samples. This may be linked to the physico-chemical properties of the molecule. Mestad *et al.* described the extraction problems that can be encountered when analyzing hydrophobic compounds such as methadone or THC (20).

Our study will be one of the first to assess the stability of DBS and VAMS on *post-mortem* blood.

2.2.5 Tramadol

The good detection of tramadol on DBS has been established and its use in practice has already been proven in the living forensic field for the detection of doping (23,24). During the validation process on *ante mortem* blood from these forensic cases, an extraction efficiency of 62% for the determination of tramadol and *O*-desmethyltramadol on DBS was reported. Comparing the methods in the liquid blood of these same cases with 26 samples showed good agreement ($90 \pm 19\%$ for tramadol and $94 \pm 14\%$ for *O*-desmethyltramadol) for anti-doping screening.

Its detection on DBS of *post-mortem* blood was recently established by Dubois-Chabert *et al.* in 2025 (25). Detection limits ranged from $<10.0 \mu\text{g/L}$ to $20.0 \mu\text{g/L}$ and, the compounds remained stable for 15 days at all test temperatures overall. Our study evaluated stability on DBS and VAMS, *on post-mortem blood*, over a period that could exceed this storage time. However, only two cases of tramadol were detected, so the interpretation of the differences in concentration found and their impact on forensic considerations will be limited.

2.3 Cocaine

A continuous decrease in cocaine stored in tubes at 4°C over a period of two weeks has been reported, with the appearance of its metabolites from the first day of storage. Degradation by spontaneous and enzymatic hydrolysis of cocaine occurs over time, even at -20°C and despite the addition of a preservative. The proportions of degradation between metabolites depend, among other things, on the preservative used and the pH. Cocaine may be more stable in *post-mortem* blood due to the more acidic pH (26–28).

Initial studies on the stability of cocaine and its metabolites on DBS and VAMS in living subjects were promising in terms of sensitivity and specificity for a storage period of two months (11).

With regard to DBS, the study by Ellefsen *et al.* demonstrated qualitatively similar results for 392 DBS matched with 92 venous blood samples, all stored at -20°C for short periods. However, the authors recommended taking into account the differences between capillary and venous blood, as well as the greater variability in concentrations obtained from DBS (29).

Stability on DBS at 4°C and -20°C was tested over six-month periods by Afazil (30). At -20°C , a 17% loss was observed after 2 months' storage, which the author does not consider a significant loss. After one year, approximately 60% of the cocaine was recovered on DBS.

At 4°C , the cocaine remained stable for a fortnight. After one month, there was a 15% loss compared with the initial concentration. Around 36% of the original cocaine could still be detected after one year. At room temperature, the cocaine was stable for four days, before a

significant decrease of 18% was observed after one week. After a year's storage at room temperature, around 14% of the original concentration was recovered. At all temperatures, drug degradation on DBS is inferior than liquid blood samples with similar temperatures and storage times.

Our study compares DBS and VAMS stored at room temperature with blood tubes stored at +4°C *on post-mortem* blood. Although this is the least optimal temperature, the concentrations found on the micro-samples remain higher than those found on the tubes.

Micro-sampling thus makes it possible to approach the *ante-mortem* concentration and avoid its disappearance after storage. These results support the literature on a major focus forensic toxicology analysis, this time in the field of thanatology.

2.5 Cannabis

Mercolini *et al.* demonstrated the applicability of VAMS for the measurement of natural and synthetic cannabinoids in 2016 (31).

Joye *et al.* demonstrated in 2019 that it is possible to detect only the THC-COOH of a DBS after a double extraction process. The percentage of detection differs according to the brand of DBS, depending on the materials used in its manufacture (32). Subsequent studies carried out in 2021 and 2023 failed to detect cannabinoids (4)18).

Compared with the literature, the results of our study explain the low concentrations found on VAMS by extraction difficulties. The results to be considered for the *ante mortem* concentration approach are therefore those carried out on the classic sampling tube.

2.6 Benzodiazepines

Hydrolysis is the most important degradation reaction affecting benzodiazepines. The disparities in stability between the different molecules are attributed to their molecular structure. The stability of alprazolam, lorazepam and oxazepam on tubes of blood enriched with "low concentrations", reflecting therapeutic concentrations, and "high concentrations", reflecting overdose concentrations, for several months at +4°C and -20°C was carried out by Afazil (30). It demonstrates their stability over periods of several months. Degradation occurs earlier at +4°C and for "high concentrations".

Jamey *et al.* studied aprazolam, bromazepam, clonazepam and diazepam at +4 and -20°C and at room temperature on drops of blood dried on glass slides with repeated assays at 24, 48, 72 hours, one week and one month. All analytes were detected at the end of the storage time under all storage conditions, except for clonazepam at -20 °C. The authors describe periods of greater concentration variations than others such as in the first 24 hours for clonazepam, in the first seven days for alprazolam and in the first twenty-eight days for bromazepam (5).

Studies prior to that of Jamey et al assessing the stability of benzodiazepine concentrations in *ante mortem* and *post mortem* blood on DBS reported different results with a decrease of 10 to 40% for diazepam, 15 to 90% for clonazepam, 25 to 40% for bromazepam and 5 to 95% for alprazolam. The concentrations of benzodiazepines artificially added to samples before storage ranged from 200 µg/L to 10,000 µg/L, *i.e.* 20 to 1,000 times more concentrated than that studied by Jamey et al.(22,33–35) (41).

It therefore appears that the kinetics of concentration variations during *in vitro* storage depend not only on the type of blood, the duration and conditions of storage, but also on the initial concentration of the sample.

In the case of *post-mortem* blood, it appears that the rate of benzodiazepine degradation is not regular and is more random, with increases and decreases that vary through storage, with more or less identifiable periods of acceleration and slowing (36) (41).

In our study, the initial benzodiazepine concentrations are of course not standardized. However, it has been shown that the use of DBS and VAMS improves the stability of these molecules by dehydrating the blood and minimizing hydrolysis. Our results are therefore in line with this finding in the literature. Furthermore, the disparities in stability between the different molecules are attributed to their molecular structure.

3. Forensic interpretation

For alcohol, the average difference in concentration between the micro-tube and the conventional sampling tube was 0.36 g/l. These values imply little change in clinical terms and, in a case-by-case interpretation of the subjects in our study, there was no change in the medico-legal interpretation in terms of direct or indirect accountability to death of the alcohol levels found.

Regarding opiates, three of the four cases of morphine and codeine are the result of heroin use; these are the same as the three cases of 6MAM. Two of the three cases of heroin use would not have been detected without the use of micro-sampling: cases #4 and #11 (tables 2 and 3). Taking only the molecules detected on the tubes, case #4 showed polyintoxication, with alcohol, methadone, cannabis, nordazepam, as well as morphine and codeine resulting from the degradation of 6MAM. Taken in isolation, none of the concentrations of the molecules found were lethal. Their combination and the circumstances of death led to the diagnosis of death of toxic origin by elimination, in the absence of organic or traumatic lesions discovered at autopsy. In case #11, only morphine and codeine were found in the blood tube, in therapeutic concentrations. These concentrations could have been the result of codeine treatment and did not make it possible to establish a cause of death.

Furthermore, concentrations of 6MAM do not reflect the toxicological impregnation of heroin. Only its presence or absence is therefore of interest in forensic analysis. Morphine is the active ingredient. The morphine concentrations found in our study are all in the therapeutic range. For codeine, they are of the order of sub-therapeutic concentrations. The differences in concentration observed on a case-by-case basis for these molecules are considered to be nil and to have no impact on the forensic interpretation (37). In addition to toxic concentrations, the concentrations of morphine, methadone or cocaine found in a toxicological analysis may reflect exposure levels, but do not allow a dose-effect relationship to be established. Many factors come into play with opioids, such as tolerance, a period of abstinence prior to resumption of use, the presence of co-intoxication, medical history, age, sex or environmental context (14,38–42). Studies in this field have observed overlaps between the concentrations found in living users and in subjects who have died (37). Several cases of victims who died while using heroin even show that blood morphine concentrations are significantly lower than those measured in living users. A fixed level associated with death cannot therefore be determined. It is thusly even more important to identify 6MAM.

Cocaine is not always the cause of death, but it can be a precipitating factor in sudden death, particularly in a person with a history of cardiovascular disease. The presence of any quantity of cocaine or its metabolites may therefore be compatible with a cocaine-induced death. Its secondary effects can lead to behavioral changes that may play a role in determining death

(43,44) . It is when the degradation reaches the point of disappearance that storage on the tube becomes deleterious for forensic purposes.

For tramadol, the differences observed in our study do not imply significant repercussions in terms of concentration, *ante mortem* clinic or accountability to death. In one case, the concentrations of the micro-sample and the tube were both slightly above the dose considered potentially lethal. In the second case, they were both within the range of therapeutic concentrations (37).

The concentrations of benzodiazepines detected in our study were all in the therapeutic range. However, in many cases, it is the multiple intoxication of several toxicological substances that leads to the diagnosis of death of toxicological origin. The failure to detect any of these substances may therefore call these conclusions into question.

For case 20, the toxicology report would probably have concluded that death was due to cocaine intoxication in both cases. However, the presence of additional intoxication with opiates and benzodiazepines makes the circumstances of the death all the clearer. In addition, the level of exposure to cocaine was considerably higher with the micro-sampling (one VAMS in this case).

4. Limitations of the study

Our study was carried out under conditions of routine practice and not under controlled experimental conditions. As a result, several limiting factors were encountered

4.1 Workforce

Our yield, between the bodies initially included in the study and the expert appraisals that were carried out, was around 50%. These numbers are insufficient to establish statistically significant results.

4.2 Reproducibility and missing data

The protocol for sampling the feet or ankles was relatively tedious and was not applied systematically by the investigators. Micro-sampling was not systematically carried out at the same site for each body.

Our study includes many parameters but does not consider the length of time toxicological samples are kept before analysis, which may affect the interpretation of the results.

The presence of a double inclusion also means that PMDs are missing for some of the samples taken in 2021. A switch from the use of DBS to the use of VAMS was made during 2021, and it is important to bear in mind the difference between the samples of VAMS polymer material and the cellulose used in the DBS cards (20).

Conclusion

High quality blood sampling for toxicological purposes is the responsibility of the forensic pathologist, who chooses the most suitable sampling site and medium possible. These choices influence the interpretation of the toxicological analysis, which is already subject to numerous variables such as inter-individual variability in metabolism and the instability of molecules *in vitro*. Forensic considerations regarding liability add additional factors to consider, such as possible tolerance to the molecule found, the presence of co-intoxication, the post-mortem delay in sample collection, or the respective *post-mortem* redistributions of the molecules found. We

have proposed an approach that is likely to reduce the *in vitro* instability of molecules by using dried blood on micro-samples: VAMS and DBS. This study sheds light on their application in routine practice at forensic institutes.

No handling difficulties have been noted when using blood collected by femoral puncture. The use of capillary blood, as in the case of living subjects, is possible but not as easy to carry out. The primary aim of our study was to compare molecular concentrations between the micro-sample and the fluoride tube. The recent literature on DBS and VAMS was in favour of better stability for most molecules compared to tubes. Our results indicate that they are of major interest for detecting heroin use, most benzodiazepines and cocaine. For these molecules, several of the intoxications in our study were not detected on conventional fluoride tubes. In real-life, these subjects would therefore have had no intoxication, or even an established cause of death for these substances.

For other molecules such as tramadol, micro-samples could be an alternative, with the advantage of meeting ecological and economic benefits in terms of storage and transport. In the case of methadone, it should be noted that concentrations in micro-samples were found to be lower than those in fluoride tubes and may underestimate the *ante mortem* concentration. This may be due to the physico-chemical properties of the molecule during the extraction process and not to instability during storage. Given this potential underestimation of methadone concentration, DBS and VAMS could offer an alternative in forensic thanatology.

For the detection of cannabis and its metabolites, the difficulties of extraction are greater and were already known. VAMS is not currently a suitable medium for reproducible use and reliable estimation of the concentration of THC and its metabolites in *post-mortem* blood. They can, however, be used to identify cannabis use.

To complement this blood volume reduction approach, micro-tubes were used for ethanol. There was no change in the direct or indirect attributability of death to variations in blood ethanol levels between the micro-tube and the tube.

In view of the results of our study, we can only recommend the use of micro-samples using dried blood during autopsy and body examinations as part of standard practice in forensic institutes. Following the end of this research work, a protocol was put in place in our forensic institute to continue taking samples so that the long-term benefits could be assessed on a larger number of subjects.

Table 1: Molecule Counts and Concentration Changes by Sample Type

Molecule	Detected on Micro-Sample	Detected in Tube Sample	Mean Concentration Change (Micro vs. Tube, %)	Median Concentration Change (Micro vs. Tube, %)	Standard Deviation of Concentration Change (Micro vs. Tube, %)
ethanol	11	12	-17.9	-11.3	39.7
6MAM	3	1	1466.0		
morphine	4	3	-13.4	-24.1	79.3
codeine	4	3	-22.4	-2.1	28.4
methadone	8	8	-50.0	-62.5	28.1
EDDP	8	8	31.3	-32.5	143.4
tramadol	2	2	-15.8	-15.8	40.2
N-desmethyltramadol	3	3	-4.43	0.0	21.7
O-desmethyltramadol	3	3	17.2	-0.5	35.5
cocaine	9	8	14410.8	460.0	26335.8
EME	9	8	160.6	-36.4	540.5
BZE	8	7	67.4	-13.3	164.7
cocaethylene	3	3	19666.0	103.8	2846.5
THC	2	2	-85.3	-85.3	2.2
THC-OH	2	2	-95.2	-95.1	4.8
THC-COOH	3	3	-64.2	-60.3	25.3
alprazolam	3	1	775.0		
bromazepam	2	2	93.4	93.4	34.6
clonazepam	1	0			
7-clonazepam	1	1	62.0		
lorazepam	3	1	2400.0		
oxazepam	10	6	43148.7	397.4	65583.8
temazepam	2	1	17500.0		
zopiclone	3	1	0.0		
diazepam	7	5	-29.0	-40.1	32.1
nordazepam	9	7	60.5	20.4	88.56

Table 2: Box 4, Detected Compounds by Sample Type

Case #4		
(PMD: 67, age: 47, sex: female)		
Ethanol: micro-sampling: 1.09; tube: 0.95		
molecule	micro-sampling ($\mu\text{g/L}$)	tube ($\mu\text{g/L}$)
6-mam	13.4	nd
morphine	25.8	34
codeine	4.7	4.8
methadone	118	84
EDDP	46	11
Cocaine	49	nd
BZE	72	nd
EMA	21.8	nd
THC-COOH	6	15.1
nordazepam	429	121
oxazepam	traces	nd
cetirizine	141	nd
hydroxyzine	52	35

Table 3: Case #11, Detected Compounds by Sample Type

Case #11		
(PMD: 39, age: 18, sex: male)		
Ethanol: micro-sampling: 0 g/l; tube: 0 g/l		
molecule	micro-sampling (µg/L)	tube (µg/L)
6-mam	3.6	nd
morphine	10.5	80
codeine	4.2	12

Table 4: Case #20, Detected Compounds by Sample Type

Case #20		
(PMD: 127, age: 53, sex: male)		
Ethanol: micro-sampling: 2.6 g/l; tube: 3.51 g/l		
molecule	micro-sampling (µg/L)	tube (µg/L)
morphine	43	nd
codeine	13.9	nd
methadone	48	190
cocaine	952	2
EDDP	12	8
BZE	851	103
EME	510	32
cocaethylene	40	13
diazepam	traces	nd
oxazepam	traces	nd

References

1. Pepin G, Deveaux M, Goullé JP, Kintz P. LES PRELEVEMENTS D'AUTOPSIE NECESSAIRES A LA BONNE EXECUTION DES EXPERTISES TOXICOLOGIQUES.
2. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. An analysis of post-mortem toxicology practices in drug-related death cases in Europe: technical report. [Internet]. LU: Publications Office; 2019 [cité 16 avr 2025]. Disponible sur: <https://data.europa.eu/doi/10.2810/81554>
3. Ben Yahyaten F, Labat L, Houzé P. Nouvelles applications des systèmes alternatifs de micro-prélèvements. Rev Francoph Lab. oct 2021;2021(535):54-64.
4. Houzé P, Borowski I, Bito E, Magny R, Morcos A, Voicu S, et al. New Trend in Toxicological Screening Using Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) and High-Resolution Mass Spectrometry (HR/MS) Combination. Molecules. 14 avr 2023;28(8):3466.
5. Jamey C, Tracqui A, Ludes B, Raul JS. Étude de la stabilité de sept benzodiazépines, de la méthadone et du zolpidem dans des taches de sang. Toxicol Anal Clin. avr 2014;26(1):32-8.
6. Skopp G, Pötsch L, Klingmann A, Mattern R. Stability of Morphine, Morphine-3-Glucuronide, and Morphine-6-Glucuronide in Fresh Blood and Plasma and Postmortem Blood Samples. J Anal Toxicol. 1 janv 2001;25(1):2-7.
7. Gish A, Richeval C, Wiart JF, Hennart B, Hakim F, Demarly C, et al. Interpretation of hair and nails findings in an infant death case related to maternal addiction to tramadol. Drug Test Anal. 2023;15(9):1022-6.
8. Gicquel T, Richeval C, Mesli V, Gish A, Hakim F, Pelletier R, et al. Fatal intoxication related to two new arylcyclohexylamine derivatives (2F-DCK and 3-MeO-PCE). Forensic Sci Int. juill 2021;324:110852.
9. R. B. Forney. Abstracts of Symposia and Contributed Papers Presented to APhA Academy of Pharmaceutical Sciences at the Meeting of the 118th Annual Meeting of the American Pharmaceutical Association, San Francisco, Calif., March 27-April 2, 1971, Vol. 1, No. 1, pp 28-29.
10. Taylor L, Remeškevičius V, Saskoy L, Brodie T, Mahmud J, Moir H, et al. Determination of ethanol in micro-volumes of blood by headspace gas chromatography: Statistical comparison between capillary and venous sampling sites. Med Sci Law. avr 2021;61(2):86-96.
11. Mandrioli R, Mercolini L, Protti M. Blood and Plasma Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) Coupled to LC-MS/MS for the Forensic Assessment of Cocaine Consumption. Molecules. 26 févr 2020;25(5):1046.
12. Le Quan Sang KH, Levacher M, Thalabard JC. Liens métaboliques entre la codéine et la morphine. Sci Sports. août 2005;20(4):218-21.
13. Wyman J, Bultman S. Postmortem Distribution of Heroin Metabolites in Femoral Blood, Liver, Cerebrospinal Fluid, and Vitreous Humor*. J Anal Toxicol. 1 mai 2004;28(4):260-3.
14. Bouvet R, Baert A, Morel I, Le Gueut M. Décès et héroïne : proposition d'un guide d'aide au diagnostic. Rev Médecine Légale. déc 2011;2(4):147-57.

15. Huertas T, Jurado C, Salguero M, Soriano T, Gamero J. Stability studies in biological fluids during post-analysis custody. Opiate compounds derived from heroin consumption. *Forensic Sci Int*. 1 avr 2019;297:326-34.
16. Høiseth G, Fjeld B, Burns ML, Strand DH, Vindenes V. Long-term stability of morphine, codeine, and 6-acetylmorphine in real-life whole blood samples, stored at -20°C. *Forensic Sci Int*. juin 2014;239:6-10.
17. Otero-Fernández M, Cocho JA, Tabernero MJ, Bermejo AM, Bermejo-Barrera P, Moreira-Piñeiro A. Direct tandem mass spectrometry for the simultaneous assay of opioids, cocaine and metabolites in dried urine spots. *Anal Chim Acta*. 19 juin 2013;784:25-32.
18. Quantitative determination by UHPLC-MS/MS of 18 common drugs of abuse and metabolites, including THC and OH-THC, in volumetric dried blood spots: a sustainable method with minimally invasive sampling - ScienceDirect [Internet]. [cité 16 avr 2025]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023224003465>
19. Karinen R, Andresen W, Smith-Kielland A, Mørland J. Long-Term Storage of Authentic Postmortem Forensic Blood Samples at -20°C: Measured Concentrations of Benzodiazepines, Central Stimulants, Opioids and Certain Medicinal Drugs Before and After Storage for 16–18 Years. *J Anal Toxicol*. 1 déc 2014;38(9):686-95.
20. Mestad IO, Gjelstad A, Pedersen-Bjergaard S, Øiestad EL. Green and sustainable drug analysis – Combining microsampling and microextraction of drugs of abuse. *Sustain Chem Pharm*. 1 déc 2021;24:100517.
21. Sadler Simões S, Castañera Ajenjo A, Dias MJ. Dried blood spots combined to an UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of drugs of abuse in forensic toxicology. *J Pharm Biomed Anal*. 5 janv 2018;147:634-44.
22. Saracino MA, Marcheselli C, Somaini L, Pieri MC, Gerra G, Ferranti A, et al. A novel test using dried blood spots for the chromatographic assay of methadone. *Anal Bioanal Chem*. août 2012;404(2):503-11.
23. Ververi C, Vincenti M, Salomone A. Recent advances in the detection of drugs of abuse by dried blood spots. *Biomed Chromatogr BMC*. juill 2023;37(7):e5555.
24. Lugibühl M, Angelova S, Gaugler S, Längin A, Weinmann W. Automated high-throughput analysis of tramadol and O-desmethyltramadol in dried blood spots. *Drug Test Anal*. août 2020;12(8):1126-34.
25. Dubois-Chabert D, Flament E, Hoizey G, Chatenay C, Fanton L, Bottinelli C. Development of a dried blood spot screening test using gas chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry: application in authentic postmortem samples. *J Anal Toxicol*. 15 févr 2025;bkaf011.
26. Isenschmid DS, Levine BS, Caplan YH. A comprehensive study of the stability of cocaine and its metabolites. *J Anal Toxicol*. 1989;13(5):250-6.
27. Skopp G, Klingmann A, Pötsch L, Mattern R. In Vitro Stability of Cocaine in Whole Blood and Plasma Including Ecgonine as a Target Analyte. *Ther Drug Monit*. avr 2001;23(2):174.
28. Alfazil AA. STABILITY OF DRUGS AND PESTICIDES OF FORENSIC TOXICOLOGICAL INTEREST AND THEIR METABOLITES IN BIOLOGICAL SAMPLES.
29. Ellefsen KN, da Costa JL, Concheiro M, Anizan S, Barnes AJ, Pirard S, et al. Cocaine and Metabolite Concentrations in DBS and Venous Blood After Controlled Intravenous Cocaine Administration. *Bioanalysis*. 1 sept 2015;7(16):2041-56.

30. Alfazil AA. Stability of drugs and pesticides of forensic toxicological interest and their metabolites in biological samples [Internet] [PhD]. University of Glasgow; 2009 [cité 16 avr 2025]. Disponible sur: <https://eleanor.lib.gla.ac.uk/record=b2696432>
31. Mercolini L, Protti M, Catapano MC, Rudge J, Sberna AE. LC-MS/MS and volumetric absorptive microsampling for quantitative bioanalysis of cathinone analogues in dried urine, plasma and oral fluid samples. *J Pharm Biomed Anal.* mai 2016;123:186-94.
32. Joye T, Sidibé J, Déglon J, Karmime A, Sporkert F, Widmer C, et al. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for broad-spectrum drug screening of dried blood spot as microsampling procedure. *Anal Chim Acta.* 31 juill 2019;1063:110-6.
33. Skopp G, Pötsch L, König I, Mattern R. A preliminary study on the stability of benzodiazepines in blood and plasma stored at 4 degrees C. *Int J Legal Med.* 1998;111(1):1-5.
34. El Mahjoub A, Staub C. Stability of benzodiazepines in whole blood samples stored at varying temperatures. *J Pharm Biomed Anal.* 1 nov 2000;23(6):1057-63.
35. Atanasov VN, Stoykova S, Runiov A, Dimitrova T, Aleksandrova D, Tsakovski S, et al. Stability of diazepam in blood samples at different storage conditions and in the presence of alcohol. *Forensic Sci Int.* 10 févr 2012;215(1):159-63.
36. Robertson M, Drummer O. Stability of Nitrobenzodiazepines in Postmortem Blood. *J Forensic Sci.* 1 janv 1998;43(1):5-8.
37. Schulz M, Iwersen-Bergmann S, Andresen H, Schmoldt A. Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Crit Care.* 26 juill 2012;16(4):R136.
38. Goudie AJ, Griffiths JW. Behavioural factors in drug tolerance. *Trends Pharmacol Sci.* 1 janv 1986;7:192-6.
39. Siegel S, Hinson RE, Krank MD, McCully J. Heroin « Overdose » Death: Contribution of Drug-Associated Environmental Cues. *Science.* 23 avr 1982;216(4544):436-7.
40. Gutiérrez-Cebollada J, de la Torre R, Ortúñoz J, Garcés JoséM, Camí J. Psychotropic drug consumption and other factors associated with heroin overdose. *Drug Alcohol Depend.* 1 avr 1994;35(2):169-74.
41. Ingold FR. Study of deaths related to drug abuse in France and Europe. *Bull Narc.* 1 janv 1986;38(1-2):81-9.
42. O'Brien CP, Childress AR, McLellan AT, Ehrman R. A learning model of addiction. *Res Publ - Assoc Res Nerv Ment Dis.* 1 janv 1992;70:157-77.
43. Lange RA, Hillis LD. Sudden death in cocaine abusers. *Eur Heart J.* 1 févr 2010;31(3):271-3.
44. Mittleman R, Wetli C. Cocaine and Sudden “Natural” Death. *J Forensic Sci.* 1 janv 1987;32(1):11-9.

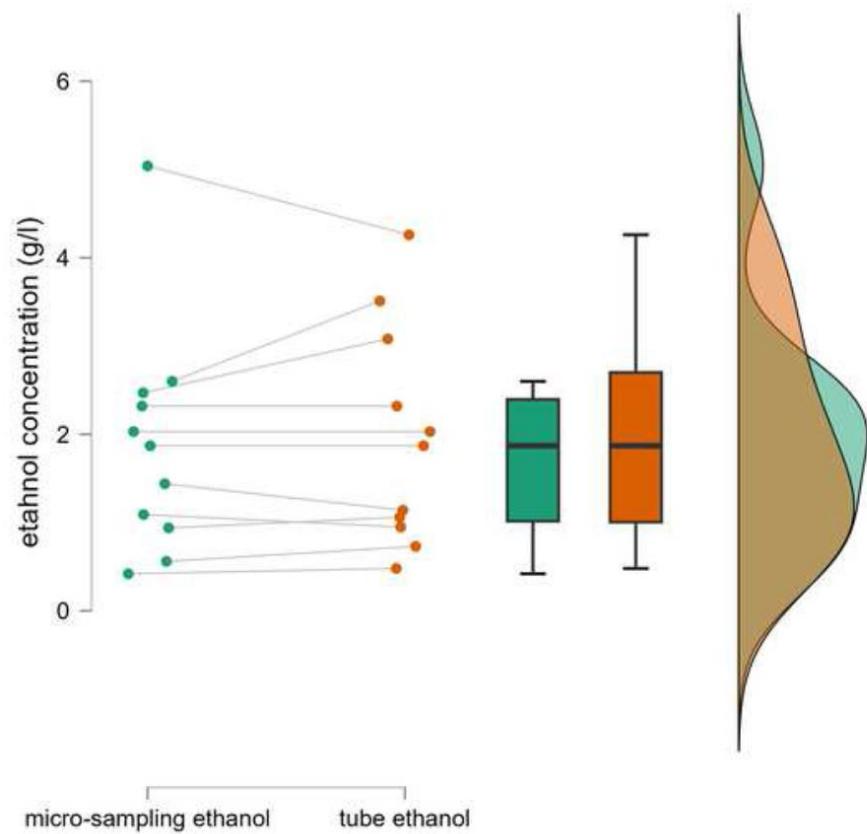


Figure 1

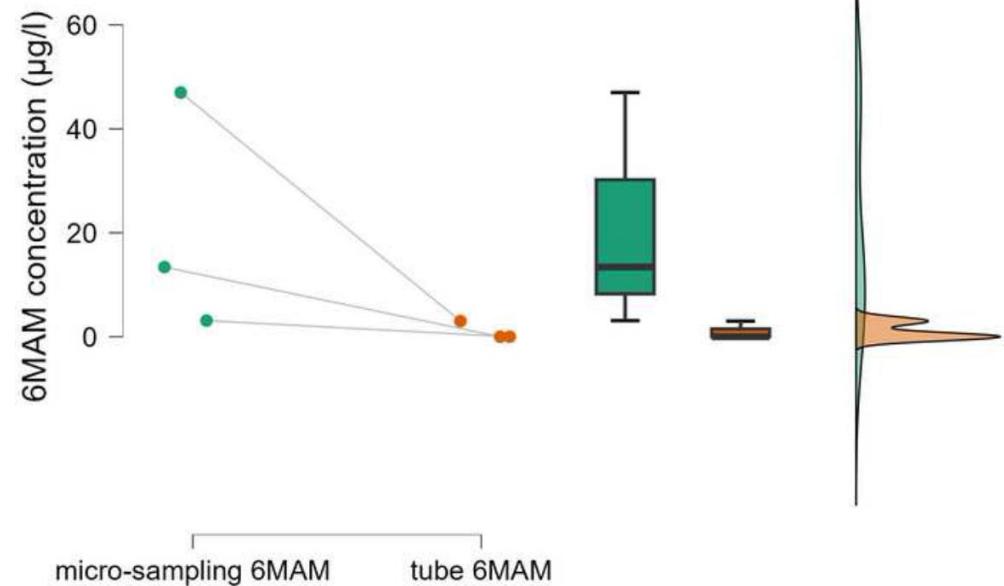


Figure 2

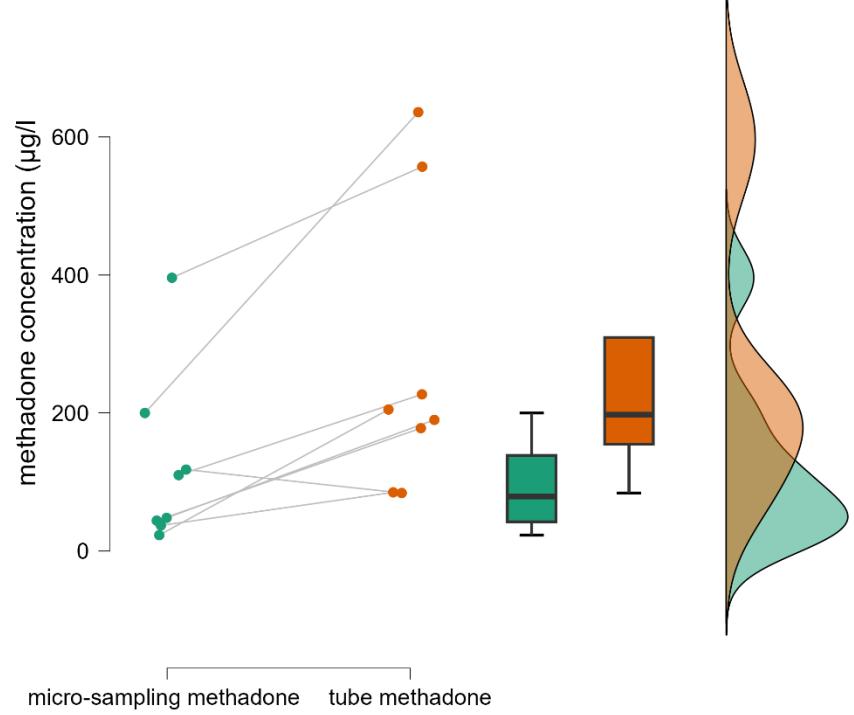


Figure 3

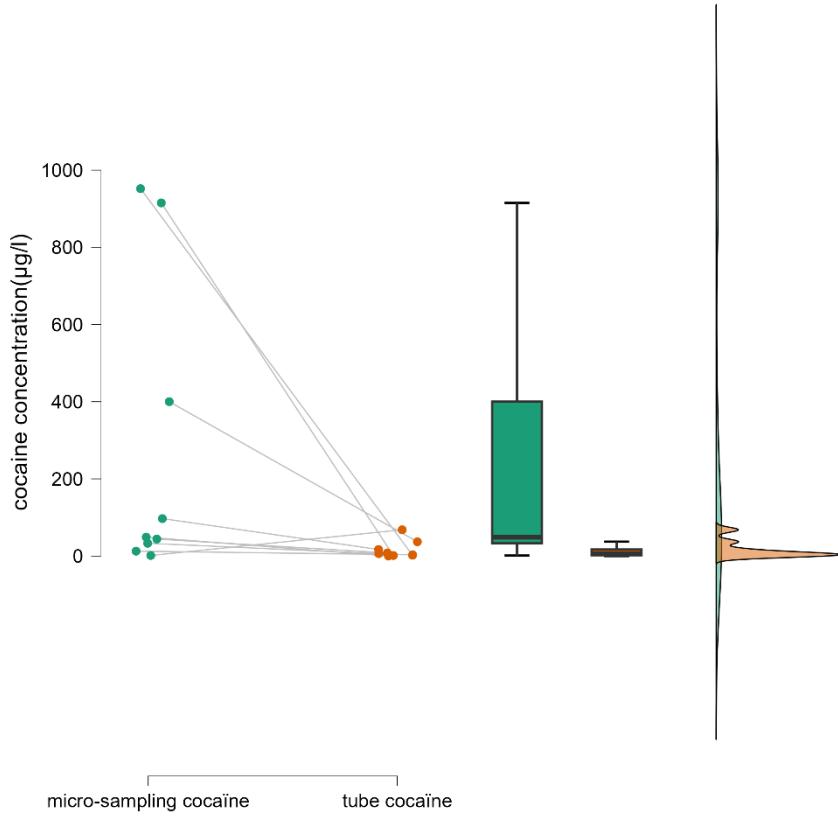


Figure 4

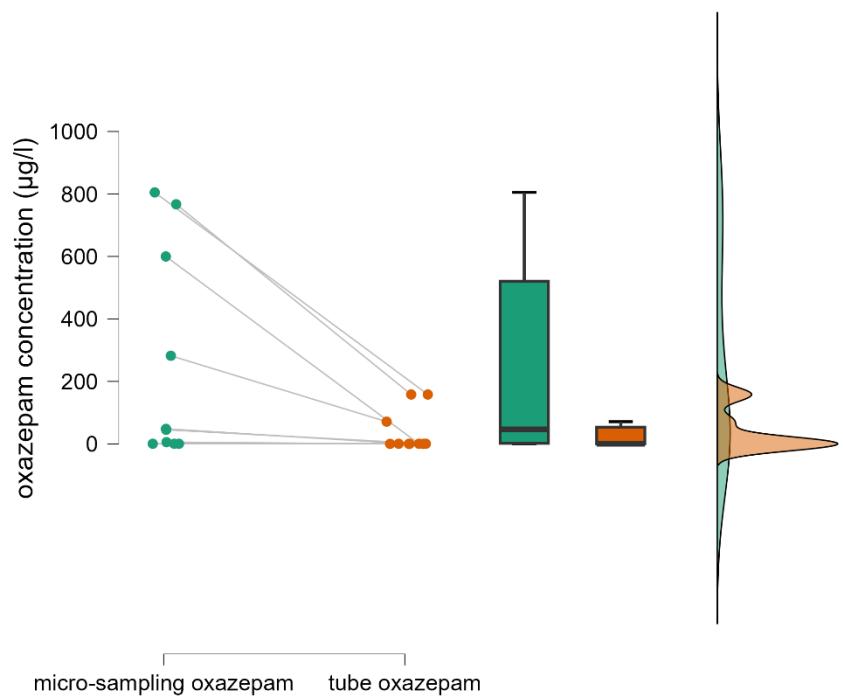


Figure 5

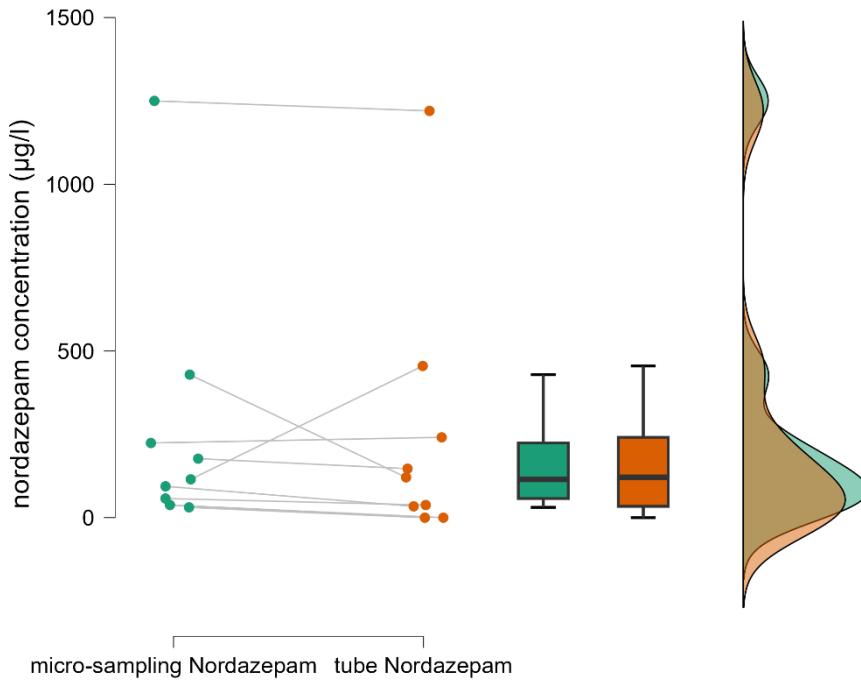


Figure 6

Nom : GISH Prénom : Alexandre

ENDOCANNABINOÏDES ET CANNABINOÏDES

**BIOMARQUEURS, MATRICES ALTERNATIVES, METHODES ALTERNATIVES DE
PRELEVEMENT ET APPLICATIONS EN TOXICOLOGIE BIOLOGIQUE ET MEDICOLEGALE**

Mots-clés: endocannabinoïdes, cannabinoïdes, biomarqueurs, méthodes alternatives de prélèvement, toxicologie biologique, toxicologie médicolégale

Résumé : Les cannabinoïdes, au sens large de ce terme (endocannabinoïdes, cannabis, cannabidiol, cannabinoïdes de synthèse ou d'hémisynthèse), font partie des sujets d'actualité pour des raisons scientifiques, sociétales et médiatiques. Cependant, et malgré de nombreuses recherches dans le domaine médical, plusieurs aspects pharmacologiques et toxicologiques de ces substances demeurent mal connus. La complexité de recherche analytique des molécules agissant sur les récepteurs cannabinoïdes réside d'une part, dans la multitude et la variété des cannabinoïdes endogènes (endocannabinoïdes) et exogènes (phytocannabinoïdes, cannabinoïdes de synthèse et d'hémisynthèse), et d'autre part dans leurs particularités physicochimiques, des concentrations circulantes généralement très faibles dans les matrices biologiques et un métabolisme parfois intense. Compte tenu de ces difficultés, la capacité d'identifier et de quantifier ces molécules présente de nombreux écueils sur les plans pré-analytique, analytique et post-analytique. L'objectif de ma thèse était d'appréhender ces difficultés et d'étudier les implications des endocannabinoïdes, et des cannabinoïdes en général, dans les domaines de la toxicologie biologique et médico-légale à travers le développement d'outils analytiques permettant leurs mises en évidence dans les différentes matrices biologiques.

A cet effet, trois méthodes analytiques de quantification d'endocannabinoïdes et de substances endocannabinoïdes-like dans trois matrices biologiques différentes (plasma, cheveux et spot de sang séché - DBS), ainsi qu'un outil d'exploration de métabolisme *in silico* des cannabinoïdes de synthèse, ont été développées. Ces outils ont été mis en œuvre dans 3 projets de recherche et ont permis (i) d'étudier la relation entre cannabinoïdes sériques et insulinorésistance chez des personnes co-infectées VIH-VHC et d'explorer les effets (de la guérison VHC et de la prise de cannabinoïdes) sur les endocannabinoïdes, (ii) d'étudier l'évolution des endocannabinoïdes dans le sang en période *post-mortem*, et (iii) d'étudier le métabolisme de 13 « nouveaux » cannabinoïdes de synthèse, pour certains, non décrit précédemment dans la littérature, circulant en 2023 sur l'île de Mayotte, France.

Au total, ce travail réalisé au cours de ces trois années de thèse m'a permis d'élaborer des outils analytiques de détection et quantification d'endocannabinoïdes et de cannabinoïdes exogènes dans différentes matrices (et avec des méthodes alternatives de prélèvement sanguin) ; outils complétés de procédures *in silico* de prédiction à la fois du métabolisme et des paramètres analytiques de biomarqueurs (métabolites) d'exposition qui pourront être appliquées à un périmètre élargi en toxicologie biologique et médicolégale.

ENDOCANNABINOID AND CANNABINOID

**BIOMARKERS, ALTERNATIVE BIOLOGICAL SAMPLES, ALTERNATIVE SAMPLING
METHODS AND APPLICATIONS IN BIOLOGICAL AND FORENSIC TOXICOLOGY**

Keywords: endocannabinoids, cannabinoids, biomarkers, alternative sampling methods, biological toxicology, forensic toxicology

Abstract: Cannabinoids, in the broad sense of this word (endocannabinoids, cannabis, cannabidiol, synthetic or semi-synthetic cannabinoids), are a hot topic for scientific, societal and media reasons. However, despite extensive medical researchs, many pharmacological and toxicological aspects of these substances remain unclear. The complexity of analytical research on molecules that interact with cannabinoid receptors lies, on the one hand, in the multitude and diversity of endogenous (endocannabinoids) and exogenous (phytocannabinoids, synthetic and semi-synthetic cannabinoids) compounds and, on the other hand, in their physicochemical characteristics, their generally very low circulating concentrations in biological matrices and their sometimes-intense metabolism. Given these difficulties, the ability to identify and quantify these molecules presents many pitfalls at the pre-analytical, analytical and post-analytical stages. The aim of my research was to understand these difficulties and explore the implications of endocannabinoids and cannabinoids in general terms, in the fields of biological and forensic toxicology through the development of analytical tools for their detection in different biological matrices.

In this way, three analytical methods were developed in order to quantify endocannabinoids and endocannabinoid-like substances in three different biological matrices (plasma, hair and dried blood spots - DBS), as well as a tool to *in silico* explore the metabolism of synthetic cannabinoids. These tools were implemented in three research projects and allowed (i) to study the relationship between plasma cannabinoids and insulin resistance in people co-infected with HIV and HCV and to explore the effects (of HCV cure and cannabinoid use) on endocannabinoids, (ii) study the evolution of endocannabinoids in the blood during the *post-mortem* period, and (iii) study the metabolism of 13 'new' synthetic cannabinoids, some of which have never been described in the literature, circulating in 2023 on the island of Mayotte, France.

Overall, this work has enabled me to develop analytical tools for the detection and quantification of endocannabinoids and exogenous cannabinoids in different matrices (and using alternative blood sampling methods). These tools are complemented by *in silico* procedures for predicting both the metabolism and analytical parameters of exposure biomarkers (metabolites), which can be applied to a wider range of applications in biological and forensic toxicology.