

SOMMAIRE

TABLEAUX ET FIGURES	11
INTRODUCTION	14
1. Chimie des molécules et outils analytiques	16
1.1 Les 2C-x.....	16
1.1.1 Présentation de la structure.....	16
1.1.2 Action pharmacodynamique et relation structure – activité.....	18
1.1.3 Métabolisme.....	19
1.2 La 5-MeO-DALT.....	20
1.2.1 Présentation de la structure.....	20
1.2.2 Activité sur les récepteurs.....	21
1.2.3 Métabolisme.....	22
1.3 Outils analytiques utilisés.....	23
1.3.1 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	23
1.3.2 Chromatographie liquide couplée à un détecteur UV à barrette de diodes.....	23
1.3.3 Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.....	24
1.3.4 Avantages et inconvénients des techniques utilisées.	25
2 Études clinico-analytiques retrouvées dans la littérature.....	26
2.1 Recherche analytique menée sur les outils analytiques utilisés	26
2.1.1 Étude sur les 2C-x	26
2.1.2 Étude sur la 5-MeO-DALT	31
2.2 Cas cliniques recensés dans la littérature	33
3 Recherche Analytique	37
3.1 Matériels et méthodes	37
3.1.1 Analyses immunologiques qualitatives et semi-quantitatives.....	37
3.1.2 Analyse chromatographique qualitative en CPG/SM.....	38
3.1.3 Analyse chromatographique qualitative et quantitative en CLHP/UV-BD.....	38
3.1.4 Analyse chromatographique quantitative en CLUHP/SM/SM	40
3.2 Résultats	45
3.2.1 Analyses immunologiques qualitatives et semi quantitatives	45
3.2.2 Analyse chromatographique qualitative en CPG/SM.....	45
3.2.3 Analyse chromatographique qualitative et quantitative en CLHP/UV-BD.....	46

3.2.4	Analyse chromatographique quantitative en CLUHP/SM/SM	48
4	Application à des cas cliniques	52
4.1	Patient 1 (Dossier Centre Antipoison n°381449)	52
4.1.1	Présentation	52
4.1.2	Résultats	52
4.1.3	Discussion	55
4.2	Patient 2 (Dossier Centre Antipoison n°372467)	56
4.2.1	Présentation	56
4.2.2	Résultats	56
4.2.3	Discussion	59
4.3	Patient 3 (Dossier Centre Antipoison n°409741)	60
4.3.1	Présentation	60
4.3.2	Résultats	60
4.3.3	Discussion	63
4.4	Patient 4 (Dossier Centre Antipoison n°397113)	65
4.4.1	Présentation	65
4.4.2	Résultats	65
4.4.3	Discussion	68
4.5	Résumé et présentation des autres cas.	69
5	Conclusion	71

TABLEAUX ET FIGURES

TABLEAUX

Tableau I. Nombre de substances de type 2C-x et tryptamines ayant été identifiées en France (entre 2000 et mars 2014).

Tableau II. Liste des molécules de type 2C-x classées comme stupéfiants par l'ANSM.

Tableau III. Présentation des molécules de la famille des 2C-x.

Tableau IV. Avantages et inconvénients des outils utilisés.

Tableau V. Études déjà menées sur les 2C-x.

Tableau VI. Études déjà menées sur la 5-MeO-DALT.

Tableau VII. Recensement des cas cliniques d'intoxications aiguës, aux 2C-x et à la 5-MeO-DALT décrits dans la littérature.

Tableau VIII. Recensement des cas cliniques d'intoxications chroniques aux 2C-x dans la littérature.

Tableau IX. Calibrateurs et seuils de détection des différentes techniques immunologiques.

Tableau X. Préparation de la gamme de calibration et des contrôles pour la validation de méthode en CLHP/UV-BD.

Tableau XI. Évolution des conditions d'analyse en CLUHP/SM/SM.

Tableau XII. Préparation des échantillons pour la gamme de calibration en CLUHP/SM/SM.

Tableau XIII. Résultats de la mise au point des techniques d'identification sur CLHP/UV-BD, CPG/SM et CLUHP/SM/SM.

Tableau XIV. Résultats de la validation de la linéarité et de la fidélité en CLUHP/SM/SM.

Tableau XV. Résultats de l'étude de l'effet matrice et du rendement pour la validation de méthode en CLUHP/SM/SM pour chaque transition (1) et (2).

Tableau XVI. Concentrations urinaires en 2C-E sans hydrolyse et après hydrolyse enzymatique.

Tableau XVII. Cas d'intoxications aux phényléthylamines de type 2C-x et à la 5-MeO-DALT documentés au laboratoire de pharmacologie-toxicologie d'Angers.

FIGURES

Figure 1.1. Structure de la phényléthylamine.

Figure 1.2. Structure de la 5-méthoxy- N,N-diallyl-tryptamine (5-MeO-DALT).

Figure 1.3. Structures du tryptophane (a) et de la sérotonine (b).

Figure 1.4. Cascade de réactions faisant suite à l'activation des récepteurs 5-HT₁.

Figure 1.5. Explication du principe de la spectrométrie de masse en tandem.

Figure 3.1. Fragmentation observée en CPG/SM pour la 5-MeO-DALT dérivée par HFBA.

Figure 3.2. Fragmentation observée en CPG/SM pour les molécules de type 2C-X dérivée par HFBA.

Figure 3.3. Spectres UV des molécules 2C-x.

Figure 3.4. Spectre UV de la 5-MeO-DALT.

Figure 4.1. Chromatogramme CLHP/UV-BD urinaire à 230 nm du patient 1.

Figure 4.2. Spectre UV du pic $t_R = 8,106$ min (a) comparé à celui de la 2C-P (b).

Figure 4.3. Chromatogramme obtenu en mode Scan pour l'urine du patient 1 par CPG/SM après dérivaison par HFBA.

Figure 4.4. Spectre de masse en impact électronique de la 2C-P ($t_R = 7,594$ min) retrouvée dans l'urine du patient 1 après dérivaison par HFBA.

Figure 4.5. Chromatogrammes urinaires observés pour le patient 1 par CLUHP/SM/SM : 2C-P ($t_R = 7,91$ min, transitions 1 et 2) (a) et méthylmilnacipran (b).

Figure 4.6. Chromatogramme CLHP/UV-BD urinaire à 230 nm du patient 2.

Figure 4.7. Spectre UV du pic $t_R = 7,769$ min (a) comparé à celui de la 2C-T-4 (b).

Figure 4.8. Chromatogramme CLHP/UV-BD plasmatique à 230 nm du patient 2.

Figure 4.9. Chromatogramme en mode Scan de l'urine du patient 2 par CPG/SM après dérivaison HFBA.

Figure 4.10. Spectre de masse de la 2C-T-4 ($t_R = 9,192$ min) retrouvée dans l'urine du patient 2 par CPG/SM après dérivation HFBA.

Figure 4.11. Chromatogrammes urinaires (patient 2) de la 2C-T-4 ($t_R = 7,16$ min, transitions 1 et 2) (a) et du méthylmilnacipran (b) par CLUHP/SM/SM.

Figure 4.12. Chromatogramme urinaire à 230 nm du patient 3 par CLHP/UV-BD après double extraction : 2C-E ($t_R = 7,02$ min) ; Méthylmilnacipran ($t_R = 7,79$ min).

Figure 4.13. Spectre UV du pic $t_R = 7,025$ min (a) comparé à celui de la 2C-E (b) ainsi qu'un métabolite supposé de la 2C-E (c).

Figure 4.14. Chromatogrammes urinaires (patient 3) de la 2C-E ($t_R = 6,41$ min) (a) et du méthylmilnacipran (b) par CLUHP/SM/SM.

Figure 4.15. Chromatogramme CLHP/UV-BD du comprimé de 2C-E.

Figure 4.16. Spectre UV du pic $t_R = 6,704$ min (a) comparé à celui de la 2C-E (b).

Figure 4.17. Chromatogramme CLHP/UV-BD urinaire à 230 nm du patient 4.

Figure 4.18. Spectre UV du pic $t_R = 8,837$ min (a) comparé à celui de la 5-MeO-DALT (b).

Figure 4.19. Chromatogramme CPG/SM de l'urine du patient 4.

Figure 4.20. Spectre de masse de la 5-MeO-DALT ($t_R = 9,192$ min) retrouvé dans l'urine du patient 4.

Figure 4.21. Chromatogrammes urinaires de la 5-MeO-DALT ($t_R = 6,49$ min) (a) et du méthylmilnacipran (b) par CLUHP/SM/SM.

INTRODUCTION

Depuis quelques années, de nouvelles classes de substances font leur apparition sur le marché des drogues licites ou illicites et ne cessent de s'étendre. Ces nouvelles drogues de synthèse (NDS ou NPS pour New Psychoactive Substances) dérivent notamment de la phényléthylamine pour la série 2C-x et de la tryptamine pour la 5-MeO-DALT. Elles ont été synthétisées, pour la plupart d'entre elles, par Alexander SHULGIN (pharmacologue américain) puis expérimentées par lui-même et sa femme et décrites dans son ouvrage PiHkal (SHULGIN, 1991). Le Docteur SHULGIN a donné le nom de « 2C » pour représenter les deux atomes de carbone qui séparent le groupement amine et le noyau benzène. En France en 2013, 81 nouveaux produits de synthèse ont été identifiés contre 73 en 2012 et 49 en 2011 (LAHAIE, 2014) et le tableau I présente le nombre de substances ayant été identifiées, pour les deux familles chimiques étudiées : les tryptamines et les phényléthylamines. Ces drogues de synthèse, également appelées « drogues de rue » sont facilement accessibles à l'achat par l'intermédiaire d'Internet sous le nom de « sels de bains » ou « nourriture pour plante » (COPPOLA, 2012). Elles peuvent se présenter sous plusieurs formes : comprimés, gélules, poudre ou encore buvard. Le statut licite de huit de ces nouvelles drogues leur confère un certain succès comparativement à celles classées stupéfiants présentées dans le tableau II (FUNEL, 2013). En effet, de simples modifications du cycle permettent le contournement de la loi en rendant cette nouvelle drogue licite. Elles sont surtout plébiscitées dans un contexte festif (boîtes de nuit, *rave party*...) en raison de leurs effets psychostimulant et hallucinogène, mais peuvent cependant causer de sérieux dommages sur la santé (FÉREC, 2013).

Tableau I. Nombre de substances de type 2C-x et tryptamines ayant été identifiées en France (entre 2000 et mars 2014) (LAHAIE 2014).

Famille	2000-2007	2008-2011	2012-2014
Phényléthylamines (série 2C)	7	10	9
Tryptamines (5-MeO-DALT)	3	3	4

Tableau II. Liste des molécules de type 2C-x classées comme stupéfiants par l'ANSM.

Nom	Date de l'arrêté
2C-T-2	13/10/2003
2C-T-7	
2C-I	18/08/2004
2C-B	15/07/2002

Face à l'augmentation du nombre de cas d'exposition, aux 2C-x et à la 5-MeO-DALT, recensés au Centre Antipoison d'Angers, le laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie a souhaité mettre en œuvre des méthodes pour documenter ces cas d'un point de vue analytique et ce travail de thèse s'inscrit dans cette démarche.

Le chapitre 1 présente d'une part les 2C-x étudiées et la 5-MeO-DALT en termes de structures, d'activité et de métabolisme et d'autre part les outils analytiques qui ont été utilisés lors de ce travail en expliquant leur principe.

Le chapitre 2 est une analyse bibliographique de ce qui a pu être décrit auparavant en toxicologie analytique pour les 2C-x et la 5-MeO-DALT. Un tableau répertorie tous les cas cliniques rencontrés dans les publications.

Le chapitre 3 reprend toute la recherche analytique faite en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM), en chromatographie liquide couplée à un détecteur UV à barrette de diodes (CLHP/UV-BD) et en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CLUHP/SM/SM). Ces analyses toxicologiques qualitatives et/ou quantitatives ont été appliquées à l'étude des liquides biologiques de patients.

Enfin 4 cas cliniques sont présentés dans le chapitre 4.

1. Chimie des molécules et outils analytiques

1.1 Les 2C-x

1.1.1 Présentation de la structure

Les substances de la série 2C sont des dérivés de la phényléthylamine (figure 1.1). Cette substance est naturellement présente dans le corps humain mais aussi dans certains aliments (chocolat, fromages).

Les 2C-x ont des groupements méthoxy ($\text{CH}_3\text{-O}$) en position 2 et 5 du cycle et pour la plupart un substituant lipophile en position 4 du noyau benzène. À la différence des amphétamines, le carbone en α de l'azote n'est pas substitué.

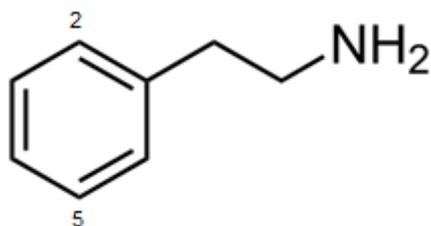


Figure 1.1. Structure de la phényléthylamine.

D'autres analogues des 2C-x ont été décrits, sur le marché de la drogue, tels que les NBOMe dans lesquels un groupement 2-méthoxybenzyle vient se greffer à l'amine primaire des 2C-x.

Le tableau III présente les 11 phényléthylamines étudiées dans cette thèse.

	Nom	Formule brute	Masse molaire (g/mol)	Structure	
				R	Formule développée
2C-B	4-bromo-2,5-diméthoxyphényléthylamine	C ₁₀ H ₁₄ BrNO ₂	260,1	Br	
2C-C	4-chloro-2,5-diméthoxyphényléthylamine	C ₁₀ H ₁₄ ClNO ₂	215,7	Cl	
2C-D	2,5-diméthoxy-4-méthylphényléthylamine	C ₁₁ H ₁₇ NO ₂	195,3	CH ₃	
2C-E	2,5-diméthoxy-4-éthylphényléthylamine	C ₁₂ H ₁₉ NO ₂	209,3	C ₂ H ₅	
2C-H	2,5-diméthoxyphényléthylamine	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂	181,2	H	
2C-I	4-iodo-2,5-diméthoxyphényléthylamine	C ₁₀ H ₁₄ INO ₂	307,1	I	
2C-N	4-nitro-2,5-diméthoxyphényléthylamine	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₄	226,2	NO ₂	
2C-P	2,5-diméthoxy-4-propylphényléthylamine	C ₁₃ H ₂₁ NO ₂	223,3	Propyle	
2C-T-2	4-éthylthio-2,5-diméthoxyphényléthylamine	C ₁₂ H ₁₉ SNO ₂	241,4	S- C ₂ H ₅	
2C-T-4	4-isopropylthio-2,5-diméthoxyphényléthylamine	C ₁₃ H ₂₁ SNO ₂	255,4	S-isopropyle	
2C-T-7	4-propylthio-2,5-diméthoxyphényléthylamine	C ₁₃ H ₂₁ SNO ₂	255,4	S-propyle	

Tableau III. Présentation des molécules de la famille des 2C-x.

1.1.2 Action pharmacodynamique et relation structure – activité

Les molécules de la famille des 2C possèdent une affinité pour les récepteurs 5-HT₂ qui représentent la cible essentielle des hallucinogènes.

L'activité hallucinogène des 2C-x est due à l'amine primaire, aux deux atomes de carbone qui séparent l'amine du cycle benzène, aux deux groupements méthoxy et au substituant hydrophobe. Dans ce type de structure, le profil pharmacologique est nettement influencé par la nature du substituant en position 4 du cycle benzène. Un petit substituant lipophile conduit à un agonisme tandis qu'un gros substituant lipophile conduit à un antagonisme (DOWD, 2000).

Les différents effets des hallucinogènes sur les récepteurs 5HT_{2A} (activation) au niveau des cellules pyriformes de la couche V (augmentation du potentiel d'action postsynaptique), du thalamus (diminution de la capacité du noyau réticulé, qui fait le lien entre le cortex et le thalamus, à contrôler l'afflux d'informations), du locus coeruleus (effet anxiogène et réponses inappropriées aux stimulus sensoriels) et de l'aire tegmentale variable (libération de dopamine) ont fait récemment l'objet d'un travail bibliographique (LEROUX, 2013).

Ces molécules sont capables d'induire d'importantes modifications au niveau psychique et social. Elles agissent sur l'humeur et les perceptions.

Les molécules de cette famille sont, en revanche, moins actives que leurs homologues amphétaminiques qui possèdent un groupement méthyl en α de l'azote. Elles ont une moins bonne stabilité (métabolisation plus rapide), une plus grande lipophilie et une activité intrinsèque moins importante.

Ces molécules agissent également sur les récepteurs 5HT₁, 5HT₆ (rôle dans le contrôle moteur, émotions, la cognition et la mémoire) et 5HT₇ mais aussi sur les récepteurs dopaminergiques et les récepteurs α_2 adrénergiques.

1.1.3 Métabolisme

Les principales modifications de ce type de molécules s'effectuent au niveau des groupements méthoxy en position 2 et 5 sur le cycle benzène et au niveau de l'amine. Ces composés peuvent subir une O-déméthylation, une N-acétylation par la N-acétyltransférase (MEYER, 2014) et une désamination oxydative par les monoamines oxydases A et B conduisant à un alcool et un acide. Les 2C-x possèdent une affinité pour les monoamines oxydase A et B, mais celle-ci est plus marquée pour la monoamine oxydase A. En effet, selon MAURER (2010), le site d'action de l'enzyme est plus grand et peut donc accueillir plus facilement le substituant en position 4 du noyau benzène. La chaîne latérale peut aussi subir une hydroxylation (LEROUX, 2013).

1.2 La 5-MeO-DALT

1.2.1 Présentation de la structure

La 5-MeO-DALT (figure 1.2) est un dérivé de la tryptamine ; celle-ci est naturellement retrouvée dans les plantes et les champignons. Les détails de la synthèse sont connus depuis 2004. Cette molécule a une structure chimique proche de celle d'un acide aminé, le tryptophane et d'une monoamine servant de neurotransmetteur, la sérotonine (figure 1.3). On retrouve dans ces trois structures le noyau indole.

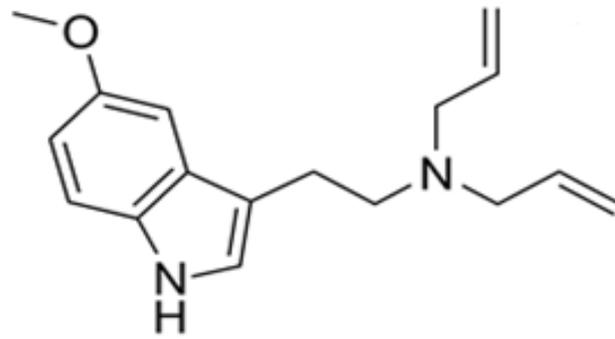


Figure 1.2. Structure de la 5-méthoxy-N,N-diallyl-tryptamine (5-MeO-DALT).

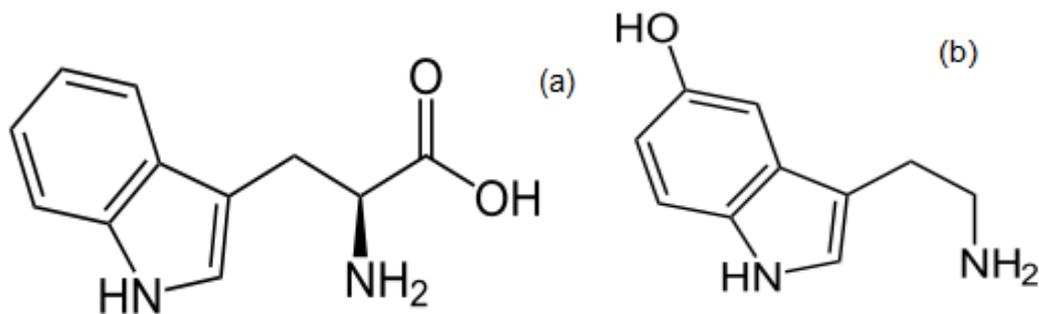


Figure 1.3. Structures du tryptophane (a) et de la sérotonine (b).

1.2.2 Activité sur les récepteurs

Il existe très peu d'informations concernant l'activité de la 5-MeO-DALT dans le corps humain.

C'est un activateur de l'activité sérotoninergique dans le système nerveux central par augmentation de la libération de la sérotonine (agoniste). Des études *in vitro*, menées sur des cerveaux de rats, ont montrées que la substance permettait l'activation de la protéine Gi couplée aux récepteurs 5-HT₁ (NONAKA, 2007). Cela entraîne une cascade de réactions qui aboutit à une baisse du potentiel d'action (figure 1.4). L'inhibition provoquée par la sérotonine serait donc à l'origine de l'effet hallucinogène.

Elle joue également un rôle dans l'inhibition compétitive de la recapture de sérotonine dans la fente synaptique grâce au transporteur SERT (Serotonin reuptake transporter) (NAGAI, 2007). Cet effet pharmacologique va entraîner une élévation transitoire de la sérotonine libre au niveau du système nerveux central conduisant à une baisse de l'activité de la tryptophane hydroxylase, enzyme impliquée dans la synthèse de sérotonine et donc à une baisse importante de la production de 5-hydroxytryptamine. Ainsi, l'euphorie du début, due à une élévation de la sérotonine libre, sera vite remplacée par des effets hallucinogènes, dus à la déplétion.

Aucun effet n'a été démontré sur la recapture de la dopamine et de la noradrénaline (NAGAI, 2007). La 5-MeO-DALT a une faible activité sur le relargage de ces molécules.

5-HT₁ → Activation protéine Gi → Inhibition adénylate cyclase → AMP cyclique ↓ → Inactivation de la protéine kinase A → Fuite de potassium → Hyperpolarisation → Potentiel d'action ↓

Figure 1.4. Cascade de réactions faisant suite à l'activation des récepteurs 5-HT₁.

1.2.3 Métabolisme

Le métabolisme de la 5-MeO-DALT a été peu exploré mais celui d'un autre dérivé de la tryptamine, la 5-méthoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5-MeO-DIPT) a été étudié. Les métabolites qui ont été mis en évidence sont : la 5-hydroxy-N,N-diisopropyltryptamine (5-OH-DIPT), la 6-hydroxy-5-méthoxy-N,N-diisopropyltryptamine (6-OH-5-MeO-DIPT) et la 5-méthoxy-N-isopropyl-tryptamine (5-MeO-NIPT) (KAMATA, 2010).

On peut penser que la 5-MeO-DALT subit un même mécanisme de métabolisation qui conduit à la 5-OH-DALT, la 6-OH-5-MeO-DALT et la 5-MeO-NALT.

D'après SULLIVAN (1986), la 5-MeO-DALT serait, essentiellement, métabolisée par la monoamine oxydase-A et la monoamine oxydase-B.

1.3 Outils analytiques utilisés

1.3.1 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Il s'agit d'une méthode dite séparative par injection des échantillons sur une colonne capillaire (phase stationnaire) et élution plus ou moins rapide par un flux gazeux, souvent d'hélium (phase mobile), en fonction de la température environnante et donc de la volatilité des composés. Au cours de l'analyse, un gradient de température est utilisé afin d'optimiser le temps d'analyse entre molécules de faible masse molaire et molécules plus lourdes. En sortie de colonne, les molécules pénètrent dans la spectrométrie de masse où elles sont ionisées par collision avec un flux d'électrons émis par un filament chauffé. Un électron est arraché conduisant à un ion moléculaire M^+ , plus ou moins stable, qui lui-même pourra donner des ions fragments. Ces ions passeront ensuite dans le quadripôle où ils sont accélérés et séparés selon leur rapport masse/charge. Les cations sont ensuite accélérés une nouvelle fois et déviés pour entrer en collision avec le channeltron. Celui-ci va permettre l'émission de plusieurs dizaines d'électrons. L'ensemble des ions collectés à un instant t va constituer le spectre de masse de la molécule. Le chromatogramme obtenu représente la somme des intensités des différents ions observés au cours du temps (TIC : total ion current).

1.3.2 Chromatographie liquide couplée à un détecteur UV à barrette de diodes

Les échantillons sont injectés à l'état liquide dans la colonne chromatographique et les molécules sont éluées plus ou moins rapidement selon leur plus ou moins grande affinité pour la phase mobile ou pour la phase stationnaire. Les produits sont détectés en sortie de colonne grâce à leur propriété physique d'absorption de la lumière UV-Visible et caractérisés par un pic chromatographique à un instant donné (t_r , temps de rétention).

La cellule de mesure du détecteur est éclairée en permanence par une lumière blanche (UV-Visible, lampe deutérium) permettant ainsi l'obtention instantanée du

spectre d'absorption de la molécule sur une plage de longueurs d'ondes (barrette de diodes).

1.3.3 Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Dans cet appareil, la détection n'est plus lumineuse mais basée sur les ions formés par ionisation des substances en sortie de colonne dans un spray de solvant à pression atmosphérique (mode Electron Spray Ionization). Les molécules de solvant sont en grande partie éliminées par chauffage et les cations (mode ESI+) ou les anions (mode ESI-) formés sont dirigés alors dans le spectromètre de masse constitué d'un triple quadrupôle. La partie Q0 permet la focalisation. Toutes les molécules de solvant restantes vont être éliminées. Les molécules sont ensuite dirigées vers la partie Q1. Elles vont être séparées suivant leur masse m/z et une seule molécule ionisée va être autorisée à entrer dans la cellule de collision. Il s'agit de l'ion parent. Celui-ci est fragmenté, dans la partie Q2, par collision avec des molécules de gaz neutre (Azote). Des ions fragments sont alors générés et vont passer dans la partie Q3 pour être séparés. Enfin, ceux-ci entrent en collision avec le détecteur et produisent une impulsion d'électrons. L'impulsion est convertie en signal numérique qui permet un comptage d'ions. On obtient ainsi des transitions ion parent-ion fragment, généralement très spécifiques, qui permettent la caractérisation de telle ou telle molécule dans un échantillon [abs-ciex]. L'identification sera d'autant plus pertinente qu'elle se fera sur deux ou trois transitions (Multiple reaction monitoring, MRM) plutôt qu'une (Single reaction monitoring, SRM).

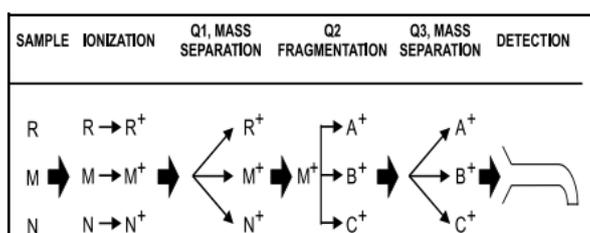


Figure 1.5. Explication du principe de la spectrométrie de masse en tandem (AB SCIEX, 2010).

Dans notre travail, les échantillons ont été analysés par un système de chromatographie liquide à deux colonnes appelé chromatographie liquide à deux dimensions (2D-LC). Dans un premier temps, les échantillons sont injectés dans des conditions non éluantes sur une colonne de « purification-concentration » (étape 1) installée en ligne et les substances d'intérêt sont piégées (piégeage on-line) sur cette cartouche. Pendant ce temps, la colonne analytique, isolée par une vanne, est conditionnée pour la séparation à venir. L'étape 2 consiste alors à connecter par basculement de la vanne la cartouche vers la colonne analytique, la séparation des molécules pouvant alors se faire en fonction de leur plus ou moins grande affinité pour les phases mobile et stationnaire.

1.3.4 Avantages et inconvénients des techniques utilisées.

De part son application simple, la CLHP/UV-BD est la technique préférée en routine. Les autres techniques permettent de confirmer ce qui a été trouvé dans les liquides biologiques. Le tableau IV résume les avantages et inconvénients de chaque technique analytique.

Tableau IV. Avantages et inconvénients des outils utilisés.

	Avantages	Inconvénients
CPG/SM	<ul style="list-style-type: none"> - Dérivation favorise la chromatographie - Pas d'interaction entre les analytes et la phase mobile - Obtention spectre de raies spécifique 	<ul style="list-style-type: none"> - Molécules doivent être volatiles - Molécules doivent être thermostables (haute température)
CLHP/UV-BD	<ul style="list-style-type: none"> - Acquisition à toutes les longueurs d'onde : obtention spectre de bande - Mise en application plus simple 	Limite de détection
CLUHP/SM/SM	<ul style="list-style-type: none"> - Caractérisation par transitions spécifiques - Détection optimisée pour les molécules d'intérêt - Amélioration rapport signal-bruit donc meilleure sensibilité pour des concentrations faibles 	On ne trouve que ce que l'on cherche

2 Études clinico-analytiques retrouvées dans la littérature

2.1 Recherche analytique menée sur les outils analytiques utilisés

2.1.1 Étude sur les 2C-x

De nombreuses études sur les 2C-x ont déjà été réalisées et sont présentées dans le tableau V.

En 2004, CARMO et coll. est à l'origine de deux recherches menées sur la 2C-B en CPG/SM avec comme objectif l'étude du métabolisme. Six métabolites ont ainsi pu être identifiés. La même année, SOARES développe une méthode analytique en CLHP/UV et VORCE entre des données en CPG/SM sur cette même molécule. VORCE étudie également la 2C-T-7.

En 2005, KANAMORI va lui aussi baser ses recherches sur l'étude du métabolisme de la 2C-B (après hydrolyse enzymatique) en CPG/SM. L'équipe de KIKURA-HANAJIRI constitue une base de données et développe une méthode analytique pour 4 phényléthylamines de type 2C-x par CLHP/SM et CPG/SM. HABRDOVA met également au point une méthode analytique pour 7 molécules de la série des 2C. Son équipe fait face à la non-validation de la méthode pour la 2C-T-2 et la 2C-T-7. Dans le même temps, des recherches sur le métabolisme de la 2C-T-2, la 2C-T-7, la 2C-E et la 2C-B conduites par l'équipe de THEOBALD sont faites entre 2005 et 2006. En 2006, ISHIDA est à l'origine du développement d'une nouvelle méthode analytique semi-quantitative en CPG/SM.

En 2008, PICHINI développe une méthode analytique quantitative par CLHP/SM afin d'étudier les urines de 32 consommateurs réguliers de nouvelles drogues de synthèse dont 5 molécules de la famille des 2C-x. Cette même année, ROHANOVA et son équipe étudient le métabolisme de la 2C-B. Elle confirme l'étude menée par THEOBALD en retrouvant des métabolites communs après acétylation.

En 2009, DREES est le premier à développer une méthode analytique quantitative en CLUHP/SM/SM. Il utilise cette technique dans le cadre d'un cas d'intoxication à la 2C-I. L'année suivante, WOHLFARTH, met au point, lui aussi, une méthode en CLUHP/SM/SM sur 8 phényléthylamines de la série des 2C de même que

KERRIGAN, qui étudie les 2C-x sur cette technique après avoir testé ces substances par CPG/SM quelques années auparavant.

En 2011, KANAMORI étudie le métabolisme de la 2C-I. Les métabolites trouvés sont en accord avec les études des métabolismes des autres 2C-x.

En 2012, ZUBA et son équipe sont les premiers à étudier la 2C-N en CPG/SM et en CLHP/SM afin de pouvoir documenter un éventuel cas d'intoxication à cette substance.

MEYER, pour sa part, a étudié récemment (2014) l'implication d'une isoenzyme (N-acétyltransférase NAT) dans le métabolisme de phase II pour plusieurs de ces substances. Il a utilisé les NAT humaines recombinantes (I et II) exprimées par l'ADNc et a mis en évidence la formation de métabolites par CPG/SM. Il a pu montrer que la NAT II pourrait être la seule forme de l'enzyme à être impliquée dans l'acétylation.

Tableau V. Études déjà menées sur les 2C-x.

Molécules	Outils analytiques utilisés	Matrice	Qualitatif (q) / Quantitatif (Q)	Ions fragments (CPG/SM) ou transitions (CLHP/SM(/SM))	Référence bibliographique
2C-B	CPG/SM	Hépatocytes de 6 espèces	q	Dérivation TFA ¹ (fraction basique) et TMS ² (fraction acide).	CARMO (2004)
2C-B	CPG/SM	Urines de souris	q	Dérivation TFA ¹ , TMS ² et N-TFA-O-TMS	CARMO (2004)
2C-B	CLHP/UV	Urines	Q		SOARES (2004)
2C-B 2C-T-7	CPG/SM	Urines Sang	q	Dérivation PFPA ⁴ 229, 242, 407 225, 238, 401	VORCE (2004)
2C-I 2C-T-2 2C-T-4 2C-T-7	CLHP/SM CPG/SM	Substances pures	q + Q q	Pas de données sur les ions fragments et transitions.	KIKURA-HANAJIRI (2005)
2C-B 2C-D 2C-E 2C-I 2C-P 2C-T-2 2C-T-7	CPG/SM	Plasma	Q	Dérivation HFBA ⁵ 242, 244, 229, 455, 457 165, 178, 391 179, 192, 405 290, 277, 503 193, 206, 419 211, 224, 437 225, 238, 451	HABRDOVA (2005)
2C-B	CPG/SM	Urines et hépatocytes de rats	q	Dérivation n-butyryl (fraction basique) et TMS ² (fraction acide)	KANAMORI (2005)
2C-T-2	CPG/SM	Urines de rats	q	Dérivation TFA ¹ et acétylation	THEOBALD (2005)
2C-T-7	CPG/SM	Urines de rats	q	Dérivation TFA ¹ et acétylation	THEOBALD (2005)

2C-E	CPG/SM	Urines de rats	q	Dérivation TFA ¹ , acétylation, propionylation et méthylation + acétylation	THEOBALD (2006)
2C-B	CPG/SM	Urines de rats	q	Dérivation acétylation	THEOBALD (2006)
2C-B 2C-I 2C-T-2 2C-T-7	CPG/SM	Urines	Q	Dérivation acétylation 242, 229, 148 290, 275, 349 224, 211, 283 238, 225, 297	ISHIDA (2006)
2C-B 2C-D 2C-E 2C-I 2C-T-2	CLHP/SM	Urines	Q	262 > 245 et 262 > 164 196 > 179 et 196 > 164 210 > 193 et 210 > 193 308 > 290 et 308 > 276 242 > 225 et 242 > 195	PICHINI (2008)
2C-B	CPG/SM	Plasma et foie de rats	Q	Dérivation acétylation	ROHANOVA (2008)
2C-I	CLUHP/SM/SM	Urines	Q	308 > 291	DREES (2009)
2C-B 2C-D 2C-H 2C-I 2C-P 2C-T-2 2C-T-4 2C-T-7	CLUHP/SM/SM	Plasma	Q	260 > 243 et 260 > 228 196 > 179 et 196 > 149 182 > 165 et 182 > 150 308 > 291 et 308 > 276 224 > 207 et 224 > 192 242 > 225 et 242 > 210 256 > 239 et 256 > 167 256 > 239 et 256 > 167	WOHLFARTH (2010)
2C-B 2C-H 2C-I 2C-T-2 2C-T-7	CPG/SM	Urines	Q	232, 216, 261 152, 137, 181 278, 262, 307 212, 183, 241 226, 183, 255	KERRIGAN (2011)
2C-I	CPG/SM	Urines de rats	q	Dérivation TFAA ⁷	KANAMORI (2011)

2C-N	CPG/SM	Substances pures	q	Sans dérivation : 197, 180, 165, 151, 121, 226 Avec dérivation TFAA ⁵ : 210, 136, 126, 196, 322	ZUBA (2012)
	CLHP/SM	Substances pures	q	227 > 210 et 227 > 195	
2C-B 2C-C 2C-D 2C-E 2C-H 2C-I 2C-T-2 2C-T-4 2C-T-7	CLUHP/SM/SM	Urines	Q	262 > 245 et 262 > 230 216 > 199 et 216 > 184 196 > 179 et 196 > 164 210 > 193 et 210 > 178 182 > 165 et 182 > 150 308 > 291 et 308 > 276 242 > 225 et 242 > 134 256 > 239 et 256 > 197 256 > 239 et 256 > 197	KERRIGAN (2014)
2C-B 2C-D 2C-E 2C-H 2C-I 2C-P 2C-T-2 2C-T-7	CPG/SM	Substances pures	Q		MEYER (2014)

¹ TFA = Trifluoroacétylation

² TMS = Triméthylsilylation

³ PFPA = Anhydride pentafluoropropionique

⁴ HFBA = Anhydride heptafluorobutyrique

⁵ TFAA = Anhydride trifluoroacétique

2.1.2 Étude sur la 5-MeO-DALT

La 5-MeO-DALT a fait l'objet de très peu d'études analytiques sur les trois appareils utilisés. En 2009, l'équipe de TAKAHASHI est la première à étudier cette substance en CPG/SM et CLHP/UV. Ils mettent en évidence la 5-MeO-DALT dans 5 produits commercialisés sur 205 analysés. Trois ans plus tard, en 2012, CORKERY et ses collègues décrivent un cas clinique avec analyse par chromatographie liquide couplée à un détecteur UV et mettent en évidence la présence d'un dérivé de la tryptamine. Afin de préciser la nature de cette substance, une analyse en CLHP/SM est également effectuée. Au final, grâce à la comparaison avec la substance standard, aucun doute n'est permis concernant la présence de la 5-MeO-DALT dans le sang fémoral. En 2013, NAKAZONO va, à partir de la solution standard de 5-MeO-DALT, l'étudier en CPG/SM et en CLUHP/SM/SM afin d'identifier cette molécule dans les milieux biologiques. Dans le même temps, MEYER et AMBACH développent une méthode analytique, respectivement sur CLHP/SM et CLUHP/SM/SM. Ces méthodes permettent à la fois d'identifier la 5-MeO-DALT mais aussi de la quantifier dans les liquides biologiques. Le tableau VI reprend les études publiées sur cette molécule.

Tableau VI. Études déjà menées sur la 5-MeO-DALT.

Outils analytiques utilisés	Matrice	Qualitatif (q) / Quantitatif (Q)	Ions fragments (CPG/SM) ou transitions (CLHP/SM/SM)	Référence bibliographique
CPG/SM	Produits commercialisés	q	110, 160, 174, 270 [M+]	TAKAHASHI (2009)
CLHP/UV-BD	Produits commercialisés	q		
CLHP/UV-BD	Sang	q		CORKERY (2012)
CLHP/SM	Sang fémoral	q		
CPG/SM	Substance pure	q	Sans dérivation : 110, 41, 160, 81, 68, 270 [M+] Avec dérivation TMS ² : 110, 73, 41, 232, 332 [M-TMS+] 271 > 110 et 271 > 174	NAKAZONO (2014)
CLUHP/SM/SM	Substance pure	q		
CLHP/SM	Plasma Urines	Q	271 > 110, 271 > 174, 271 > 148, 271 > 122 et 271 > 79	MEYER (2014)
CLUHP/SM/SM	Sang	Q	271 > 110 et 271 > 174	AMBACH (2014)

2.2 Cas cliniques recensés dans la littérature

Le premier cas d'intoxication aiguë exposé dans la littérature a été décrit par CURTIS en 2003. Il s'agit d'un homme de 20 ans décédé après avoir « sniffé » 35 mg d'une poudre contenant de la 2C-T-7 lors d'une soirée privée entre amis. Dans ce même article, 4 autres décès, observés dans l'Oklahoma, le Tennessee et Washington depuis janvier 2000, sont également attribués à cette molécule. LOOD et coll. (2004) rapporte le second cas, cette fois d'exposition collective, de trois hommes qui ont consommés de la 2C-E. Aucune information supplémentaire concernant l'anamnèse n'a pu être retrouvée. Neuf ans plus tard, un nouveau cas d'intoxication à la 2C-E est relaté par SACKS (2012) et VRANCKEN (2013). Un homme de 26 ans, avec des antécédents psychiatriques et de toxicomanie, est retrouvé inconscient dans la maison d'un ami après avoir consommé de la 2C-E. Le premier cas de 2C-T-4 est relaté dans la littérature par MIYAJIMA (2008). Il s'agit d'un homme de 40 ans, avec des antécédents psychiatriques, qui a avalé le contenu liquide d'une bouteille étiquetée « Vanilla aroma » achetée sur Internet. Il avouera avoir pris ce produit pour augmenter son plaisir durant la masturbation. En 2009, DREES fait état d'un cas d'exposition à la 2C-I chez une femme de 39 ans ayant consommé lors de la soirée du Nouvel an. Un an plus tard, AMBROSE (2010) relate le cas d'une femme de 43 ans qui a avalé un liquide contenant de la 2C-B. CORKERY (2012) et JOVELL (2013) rapportent les deux premiers cas d'intoxication aiguë à la 5-MeO-DALT. Il s'agit de deux hommes : le premier a consommé cette substance avant d'être fauché par une voiture alors qu'il marchait seul au milieu d'une autoroute ; le deuxième a pris un comprimé de « Lucy-N-Nate » pour tester quelque chose de nouveau.

Le tableau VII reprend ces 11 cas d'intoxications aiguës aux 2C-x étudiés et à la 5-MeO-DALT. Parmi toutes ces publications, seules deux présentent des données quantitatives.

Le tableau VIII présente 23 cas (consommateurs réguliers de NDS) d'intoxications chroniques aux 2C-x décrits par PICHINI (2008). Dans cette étude portant sur l'analyse des urines, il fait état d'un métabolisme de phase II par glucuroconjugaison pour ces composés. La conjugaison est plus ou moins forte suivant les molécules. PICHINI émet également l'hypothèse qu'il existe une interaction métabolique entre la 2C-B et la MDMA, qui sont toutes les deux des substrats des monoamines oxydases (A et B). Aucune autre étude n'a été réalisée pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Tableau VII. Recensement des cas cliniques d'intoxications aiguës, au 2C-x et à la 5-MeO-DALT décrits dans la littérature.

Molécule	Évolution	Analyses toxicologiques		Référence bibliographique	
		Qualitatif	Quantitatif		
			Technique		Résultats
2C-T-7	Décès		CPG/SM CPG/DAP ⁽¹⁾	Sang cardiaque = 57 ng/mL Sang fémoral = 100 ng/mL Urines = 1120 ng/mL	CURTIS (2003)
2C-E	Inconnue	CPG/SM (aucune donnée)			LOOD (2004)
2C-T-4	Guérison	Aucune			MIYAJIMA (2008)
2C-I	Séquelles		CLUHP/SM/SM	Urines = 311 ng/mL	DREES (2009)
2C-B	Séquelles	Aucune			AMBROSE (2010)
5-MeO-DALT	Décès	CLHP/UV-BD CLHP/SM			CORKERY (2012)
5-MeO-DALT	Guérison	Dépistage urinaire: Présence amphétamines et cannabinoïdes			JOVEL (2013)
2C-E	Décès	Aucune			SACKS (2012) VRANCKEN (2013)

⁽¹⁾ Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur spécifique azote-phosphore

Tableau VIII. Recensement des cas cliniques d'intoxications chroniques aux 2C-x dans la littérature (PICHINI, 2008)

Molécules	Analyse toxicologique en CLUHP/SM/SM	
	[C] sans hydrolyse enzymatique (µg/L)	[C] après hydrolyse enzymatique (µg/L)
2C-D	81,3	107,1
	123,9	302,7
2C-B	1656,3	3039,6
	276,3	822,6
	2254,2	23791,6
	1099,5	9618
	2417	28060,8
	4912,8	59413,1
	4892,6	31932,5
2C-T-2	28,5	236,9
	133,2	431,7
	355,1	545,3
2C-I	166,9	1429,5
	121,4	561,5
	0	851,5
	82,2	1096,1
	66,1	249,4
2C-E	77,1	258,5
	0	68,4
2C-B (+MDMA)	27090,9	34710,1
	7259,2	7249,6
	11910,9	17361,1
	33606,4	33626,2

3 Recherche Analytique

3.1 Matériels et méthodes

Les solutions pures à 1 mg/mL de chaque produit ont été obtenues chez Euromedex (Souffelweyersheim, France) et LGC Standards (Molsheim, France). Les différents solvants et réactifs utilisés sont de qualité CLHP ou pour analyse.

3.1.1 Analyses immunologiques qualitatives et semi-quantitatives

Des approches immunologiques sont effectuées par un test rapide d'immunochromatographie (IC) par compétition sur un panel Multiline 5 (BMD Biomedical diagnostics, Marne la Vallée, France), par un dépistage immuno-enzymatique de type EMIT[®] utilisant la glucose-6-phosphate déshydrogénase (EIA Multigent[®] sur un appareil ARCHITECT C16000, Abbott, Paris, France) et par méthode immunochimique par polarisation de fluorescence (FPIA) sur un appareil AxSYM (Abbott, Paris, France).

Pour les trois types d'analyses, les produits ont fait l'objet d'un ajout dosé à 10 mg/L dans une urine témoin.

Les seuils de positivité ainsi que les molécules servant de calibrateurs sont différents suivant la technique utilisée (tableau IX).

Tableau IX. Calibrateurs et seuils de détection des différentes techniques immunologiques.

Technique	Molécules	Calibrateurs	Seuil de positivité (en ng/mL)
IC	Amphétamines (AMP)	d-amphétamine	1000
	MéthylèneDioxy-MetAmphétamine (Ecstasy) (MDMA)	d,l-MDMA	500
EIA	Amphétamines et metamphétamine	d-metamphétamine	500
	Ecstasy	MDMA	500
FPIA	Amphétamines	d-amphétamine	500

3.1.2 Analyse chromatographique qualitative en CPG/SM

Le chromatographe en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (CPG/SM) est un appareil HP6890/HP5973N (Agilent, Les Ulis, France).

La colonne CPG est une colonne 5% phénylméthylsiloxane (30 m, DI 0,250 mm, film 0,25 µm) (Agilent, Les Ulis, France). La pression du gaz en tête de colonne est fixée à 15 psi et correspond à un débit du gaz d'élution (hélium) de 1,3 mL/min dans les conditions initiales de température (70°C). Le gradient de température est le suivant : 70°C pendant 1 min puis première rampe de température à 30°C/min jusqu'à 205°C (5,5 min), deuxième rampe à 20°C/min jusqu'à 275°C (9 min) et enfin augmentation de 25°C/min jusqu'à 300°C. L'analyse est terminée à 12 minutes avec retour à une température de 70°C. L'acquisition est faite en mode balayage (SCAN) durant 10 minutes. Les produits sont caractérisés par leur spectre de masse et leur temps de rétention, informations mises en mémoire en bibliothèque. Ils pourront être identifiés dans les milieux biologiques grâce à ces caractéristiques.

Les produits purs sont analysés après dérivation par l'anhydride heptafluorobutyrique (HFBA) afin de faciliter leur chromatographie en phase gazeuse. À 5 µL de solution mère (1mg/mL méthanol) évaporés à 70°C pendant 5 min, 50 µL d'acétate d'éthyle et 50 µL d'HFBA sont ajoutés. La dérivation (réaction d'acylation) se fait à l'étuve à 70°C pendant 20 min. Après évaporation à sec sous courant d'azote à 50°C, le résidu sec est solubilisé par 200 µL d'acétate d'éthyle avec agitation pendant 1 min. 2 µL sont injectés.

3.1.3 Analyse chromatographique qualitative et quantitative en CLHP/UV-BD

Le chromatographe en phase liquide couplé à un détecteur à barrette de diodes (CLHP/UV-BD) est un appareil HP1200 (Agilent, Les Ulis, France).

Les conditions chromatographiques et d'acquisition de données sont les mêmes que celles utilisées quotidiennement dans le laboratoire pour la recherche large de toxiques dans le sang et/ou l'urine ("screening"). La colonne CLHP est une colonne Uptisphère ODB 5 µm (100 x 2,1 mm DI) (Interchim, Montluçon, France) précédée

d'une précolonne de 10 mm, maintenue à 40°C. La phase mobile (débit : 0,4mL/min) est constituée d'un mélange de tampon phosphate KH_2PO_4 à 20mM, ajusté à pH 6,0 avec de la triéthylamine, et d'acétonitrile (85/15 v/v). L'analyse (20 min) est réalisée selon un gradient multilinéaire : 55/45 à 6,5 min puis 20/80 de 16 à 18 min puis retour aux conditions de départ. L'acquisition des données est faite à 3 longueurs d'onde (210, 230 et 254 nm). Les informations spectrales et chromatographiques des produits, sont mises en mémoire dans la base de données (bibliothèque : Toxicol.L) créée par le laboratoire. Pour cette étape, l'analyse des différentes substances consiste en une simple dilution au 1/20^{ème} de la solution mère (1 mg/mL), c'est-à-dire 50 µL auxquels sont ajoutés 450 µL de méthanol et 500 µL d'eau ; 25 µL sont injectés. Les substances pourront ensuite être identifiées ultérieurement, dans des liquides biologiques, par comparaison de leur spectre et de leur temps de rétention.

Une approche quantitative a été effectuée sur le même appareil CLHP/UV-BD après purification des échantillons biologiques par extraction liquide-liquide en deux temps (alcaline puis réextraction acide). Tous les produits n'ont pas fait l'objet de cette approche par manque de temps ; seulement les 2C-H, 2C-B, 2C-C, 2C-I et la 5-MeO-DALT ont été étudiés en mélange ainsi que la 2C-T-4 qui a été étudiée à part.

Les échantillons sont préparés selon une gamme (6 points) de concentration (0,05 à 2 mg/L). Une quantité x d'échantillon est prélevée dans la solution de départ (tableau X) à laquelle sont ajoutés 25 µL d'étalon interne (méthylmilnacipran, Pierre Fabre, Castres, France ; 2C-T-7 pour la gamme de la 2C-T-4) et 500 µL de plasma CTS (Etablissement Français du Sang, Angers, France). On utilise comme étalon interne la 2C-T-7 plutôt que le méthylmilnacipran car celui-ci à un temps de rétention très proche à celui de la 2C-T-4. Ces deux produits interfèrent donc ensemble. L'extraction se fait par 4 mL d'un mélange hexane-alcool isoamylique (98/2 v/v) en présence de 100 µL de soude 4N. Le mélange est agité pendant 10 min puis centrifugé à 3500 tours/min pendant 3 min. La phase organique est ensuite transférée dans un deuxième tube et ré-extraite par 100 µL d'acide chlorhydrique 0,02N (par agitation durant 1 min et centrifugation). Après évacuation de la phase organique par aspiration sous léger vide, les traces de solvant sont éliminées sous courant d'azote à 50°C pendant 2 min. 25 µL de la phase aqueuse sont injectés.

Cette méthode a fait l'objet d'une validation (sauf pour la 2C-T-4) selon une procédure interne au laboratoire. La linéarité, la fidélité et la justesse sont calculées en analysant les échantillons de la gamme 2 fois par jour pendant 4 jours et 3 échantillons de contrôle (0,075 ; 0,4 et 1,5 mg/L) 4 fois par jour pendant 4 jours selon les recommandations SFTA (DINGEON, 2005) (tableau IV). Les échantillons de contrôle sont préparés dès le premier jour dans 10mL de plasma et des aliquotes de 500 µL sont conservées au réfrigérateur à +4°C. La linéarité est évaluée grâce au coefficient de corrélation et au pourcentage de déviation. La fidélité est obtenue à partir de deux valeurs de coefficients de variation : CV_R (répétabilité) et CV_{fi} (reproductibilité). Le CV est le rapport entre l'écart type et la moyenne.

Tableau X. Préparation de la gamme de calibration et des contrôles pour la validation de méthode en CLHP/UV-BD.

Concentration de la solution de départ	Concentration des points de gamme (mg/L)	Volume à prélever (µL) pour 500µL de plasma
5mg/L (10µL de chaque produit dans méthanol qsp 2 mL)	0,05	5
	0,1	10
	0,2	20
	0,5	50
50mg/L (50µL de chaque produit dans méthanol qsp 1 mL)	1	10
	2	20
Concentration de la solution de départ	Concentration des points de contrôle (mg/L)	Volume à prélever (µL) pour 10mL de plasma
50mg/L (50µL de chaque produit dans méthanol qsp 1 mL)	0,075	15
	0,4	80
Solution mère 1g/L	1,5	15

3.1.4 Analyse chromatographique quantitative en CLUHP/SM/SM

Une approche par chromatographie liquide ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CLUHP/SM/SM) sur un appareil API 4000 QTRAP (AB Sciex, Les Ulis, France) avec source d'ionisation electrospray en mode positif (ESI+) a aussi été réalisée. Les produits sont en mélange à 10 mg/L dans le méthanol.

La première étape a consisté à rechercher pour chaque molécule deux transitions les plus sensibles par infusion des produits dans la spectrométrie de masse. Pour cela, et afin de gagner du temps de mise au point, des mélanges de molécules, ayant des

masses molaires différentes d'au moins 4 g/mol, ont été préparés. Les solutions infusées sont à une concentration de 100 µg/L. Les résultats des différentes transitions pour l'ensemble des substances sont présentés dans le tableau XIII. Pour l'étalon interne, une seule transition est utilisée : méthylmilnacipran (261 > 244).

Tous ces produits ont fait l'objet de cette approche quantitative.

Les échantillons sont préalablement purifiés « en ligne » par piégeage sur une cartouche SPE (Extraction en Phase Solide) 25 µm Strata X polymère (20 x 2 mm). La pompe isocratique C sert au « chargement » de l'échantillon sur la cartouche SPE. La phase mobile est constituée de formiate d'ammonium 2mM / eau (tableau XI). La colonne analytique UPLC est une colonne Kinetex[®] phényl hexyl 2,6 µm (100 x 3 mm DI) (Phenomenex, Le Pecq, France) maintenue à 45°C. La phase mobile est un mélange de formiate d'ammonium 2 mM / acide formique 0,2% dans l'eau (A) et de formiate d'ammonium 2 mM / acide formique 0,2% dans l'acétonitrile (B). Les molécules sont ensuite transférées, grâce à un spray, dans la spectrométrie de masse.

Avant la chromatographie en deux dimensions, les échantillons sont initialement préparés de la façon suivante : 100 µL (calibrants, contrôles ou plasmas) sont prélevés dans un microtube de 1,5 mL puis 150 µL de méthanol/EI (composée de 100 µL de méthylmilnacipran à 20 mg/L dilués dans 9900 µL de méthanol) sont ajoutés pour précipiter les protéines. Le mélange est agité pendant 10 minutes puis centrifugé à 13000 tours/min pendant 5min. 50 µL de surnageant sont prélevés et dilués avec 150 µL d'eau. 10 µL sont injectés. La gamme de calibration est effectuée entre 10 µg/L et 1000 µg/L à partir du mélange à 10 mg/L. 20 µL de solution finale sont mélangés à 180 µL de plasma (tableau XII) et traités comme ci-dessus.

Le temps de rétention de chaque molécule a été préalablement déterminé en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) à partir d'un mélange des solutions pures. L'acquisition des calibrants et échantillons est faite en mode Scheduled MRM c'est-à-dire en mode séquentiel. Cette approche permet d'analyser les transitions de l'analyte seulement autour de son temps de rétention (plus ou moins 30 secondes) avec suffisamment de points de données pour générer un pic chromatographique bien défini.

Ce mode permet une amélioration des performances de l'appareil par un meilleur rapport signal/bruit.

Cette méthode a fait l'objet d'une validation selon une procédure interne au laboratoire et les recommandations de la Société Française de Toxicologie Analytique (DINGEON, 2005).

La linéarité, la fidélité et la justesse sont calculées en analysant les échantillons de la gamme 2 fois par jour pendant 4 jours et 3 échantillons de contrôle (15, 150 et 750 µg/L) 8 fois par jour pendant 4 jours selon les recommandations SFTA. Les échantillons de contrôle sont préparés dès le premier jour.

La limite de quantification est validée en analysant 10 fois le point de gamme le plus bas (E10).

Le dernier paramètre étudié est l'effet matrice (MATUSZEWSKI, 2003). Il est important de savoir si la réponse de l'appareil pour des concentrations données est la même quel que soit le plasma utilisé. Pour cela, 5 plasmas différents sont utilisés et trois concentrations (15,150 et 750 ng/mL) sont testées. L'effet matrice est également évalué sur l'étalon interne. Pour calculer l'effet matrice et le rendement, trois grandes étapes sont réalisées :

- Étape 1 : Les quantités d'analytes et d'étalon interne sont diluées directement dans le solvant de reprise terminal et le signal obtenu constitue le signal de référence.
- Étape 2 : Les analytes et l'étalon interne sont ajoutés dans le surnageant de centrifugation de l'échantillon de plasma préalablement traité par le méthanol pour précipiter les protéines. Le signal obtenu représente l'effet matrice proprement dit.
- Étape 3 : Les analytes et l'étalon interne sont ajoutés dans l'échantillon de plasma avant la précipitation par le méthanol. Il s'agit de la méthode standard de préparation des échantillons et le signal obtenu est la résultante du paramètre rendement et du paramètre effet matrice.

La comparaison des aires des pics permet de calculer l'effet matrice et le rendement pour chaque concentration et chaque molécule :

$$\text{Effet matrice (\%)} = [\text{Aire (étape 2)} / \text{Aire (étape 1)}] \times 100$$

$$\text{Rendement (\%)} = [\text{Aire (étape 3)} / \text{Aire (étape 2)}] \times 100$$

Tableau XI. Evolution des conditions d'analyse en CLUHP/SM/SM.

Temps (en min)	Module	Évènement	Paramètre	Étape
0	Pompe A/B	Concentration	10% B	Chargement cartouche SPE et conditionnement colonne analytique
0	Pompe C	Débit	2 mL/min	
0	Four	Ouverture vanne gauche	Position 1	
1.00	Pompe A/B	Concentration	10% B	Connexion cartouche SPE et colonne analytique
1.00	Pompe C	Débit	2 mL/min	
1.00	Four	Ouverture vanne droite	Position 1	
1.10	Pompe C	Débit	0,2 mL/min	Élution des composés d'intérêt
9,50	Pompe A/B	Concentration	35% B	
10	Pompe A/B	Concentration	90% B	
11	Pompe A/B	Concentration	90% B	
11	Four	Fermeture vanne droite	Position 0	Interruption connexion des colonnes
11.10	Pompe C	Débit	2 mL/min	Reconditionnement de la cartouche SPE
11.10	Pompe A/B	Concentration	10% B	
12	Contrôle	Stop		

(L'évènement concentration correspond au changement du rapport A/B (%), Débit à 0,6 mL/min pour la pompe A/B)

Tableau XII. Préparation des échantillons pour la gamme de calibration en CLUHP/SM/SM.

(S0 : Solution de départ à 10 mg/L)

Echantillons	Solutions intermédiaires	Solutions finales	
E0		20 µL d'eau	+ 180 µL de plasma
E10	S6 : 20 µL S1 + 980 µL eau	20 µL de S6	
E20	S5 : 20 µL S1 + 480 µL eau	20 µL de S5	
E50	S4 : 20 µL S1 + 180 µL eau	20 µL de S4	
E100	S3 : 20 µL S0 + 180 µL eau	20 µL de S3	
E250	S2 : 25 µL S0 + 75 µL eau	20 µL de S2	
E500	S1 : 100 µL S0 + 100 µL eau	20 µL de S1	
E1000		20 µL de S0	

3.2 Résultats

3.2.1 Analyses immunologiques qualitatives et semi quantitatives

Les analyses des molécules effectuées par les différentes techniques EIA, FPIA et IC ont toutes donné des résultats inférieurs au seuil de positivité pour la concentration étudiée (10 mg/L).

3.2.2 Analyse chromatographique qualitative en CPG/SM

Le temps de rétention ainsi que les 4 principaux ions observés pour chaque produit par CPG/SM sont présentés dans le tableau XIII (a). L'ion fragment 1 représente l'ion principal (majoritaire). Les ions fragments 2,3 et 4 correspondent à d'autres ions classés par ordre d'intensité décroissante. L'ion moléculaire (MM-HFBA)⁺ est parfois absent du spectre de masse notamment pour la 5-MeO-DALT.

Les ions fragments m/z 356 et 110 représentent la cassure de la 5-MeO-DALT en α de l'azote non dérivé (figure 3.1).

L'ion fragment m/z 226 est souvent retrouvé pour les molécules de type phényléthylamine. Cet ion fils correspond à la cassure de la liaison en β de l'azote qui a subi la dérivation (figure 3.2). L'ion m/z 91 a été choisi comme ion fragment pour certaines molécules de la série des 2C mais il est peu spécifique : il correspond au cycle aromatique à 6 carbones substitué par un méthyl.

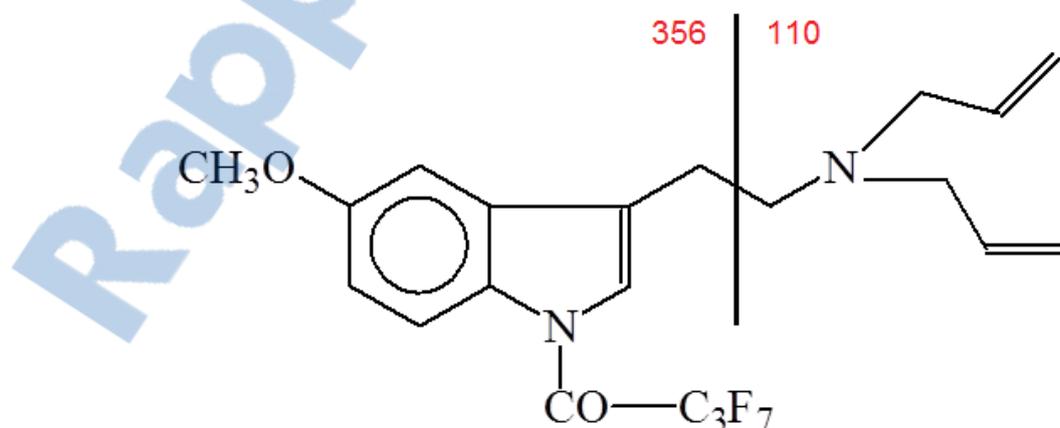


Figure 3.1. Fragmentation observée en CPG/SM pour la 5-MeO-DALT dérivée par HFBA.

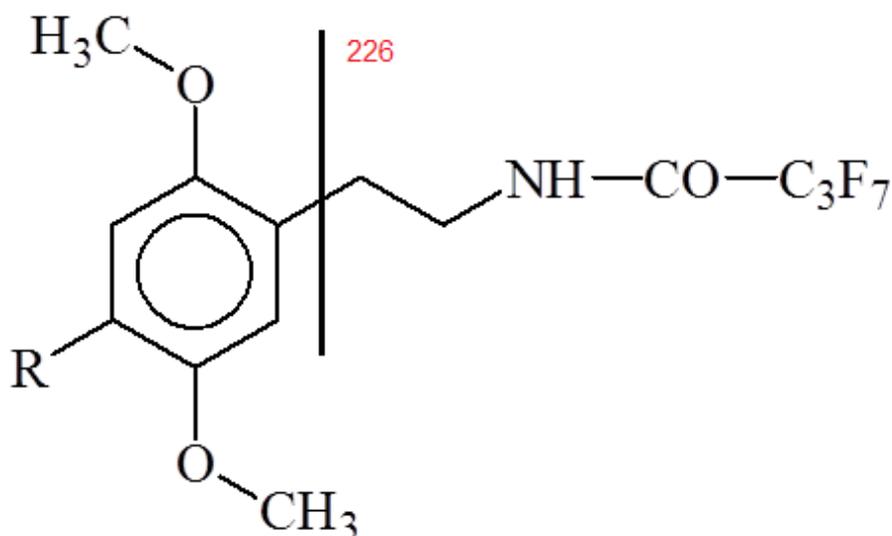


Figure 3.2. Fragmentation observée en CPG/SM pour les molécules de type 2C-X dérivées par HFBA.

3.2.3 Analyse chromatographique qualitative et quantitative en CLHP/UV-BD

Les spectres UV obtenus en CLHP/UV-BD sont assez similaires pour les molécules appartenant à la série des 2C. En effet, les absorptions maximales (λ) sont plus ou moins identiques sauf pour la 2C-N pour laquelle on voit une absorption maximale supplémentaire à 372 nm (figure 3.3). Elle correspond à l'absorption en ultraviolet du groupement nitro associé au noyau aromatique.

Le spectre UV de la 5-MeO-DALT présente deux maxima d'absorption à 220 et 276 nm (figure 3.4).

Les molécules les plus polaires sont éluées plus rapidement de la colonne.

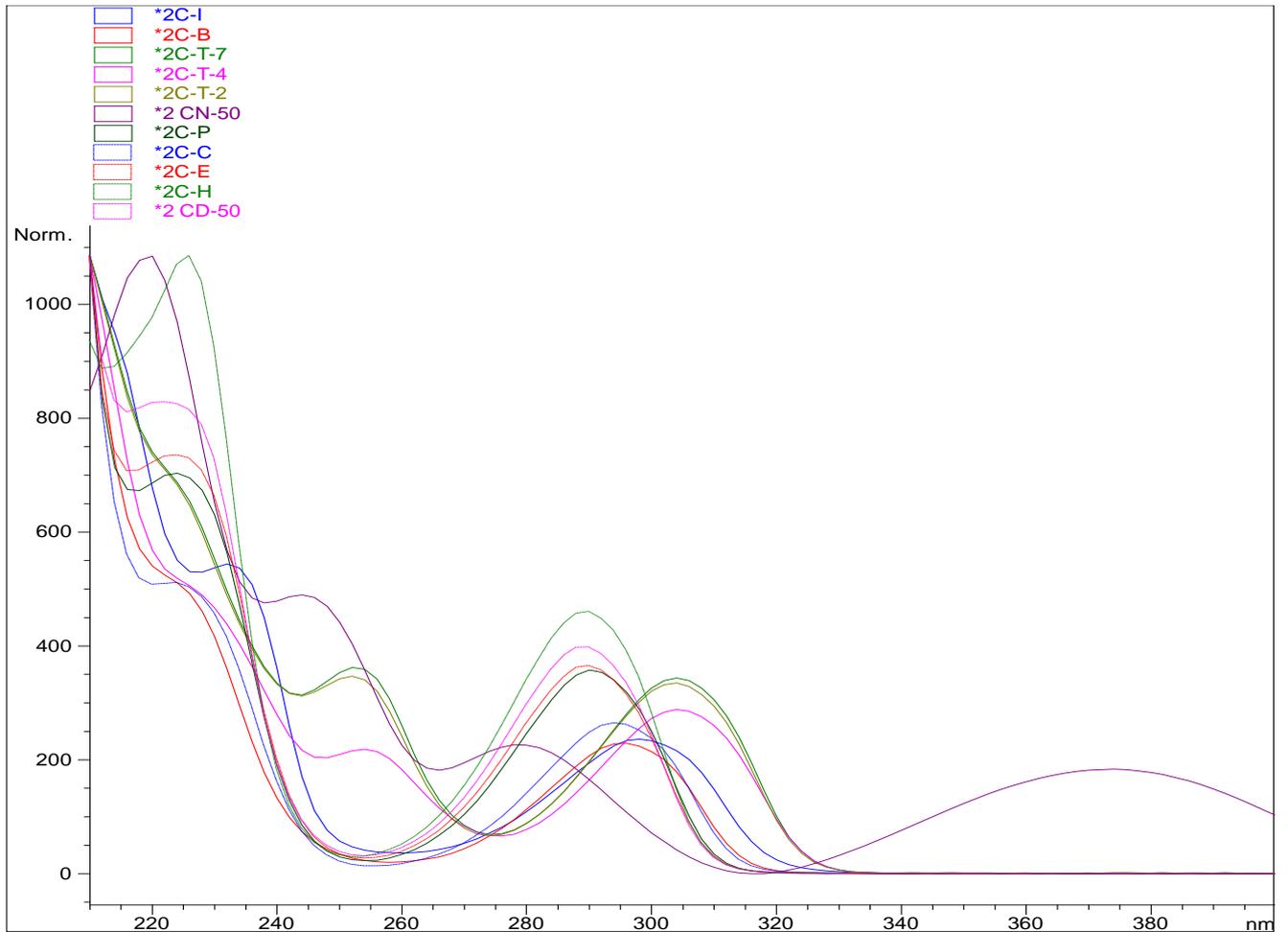


Figure 3.3. Spectres UV des molécules 2C-x.

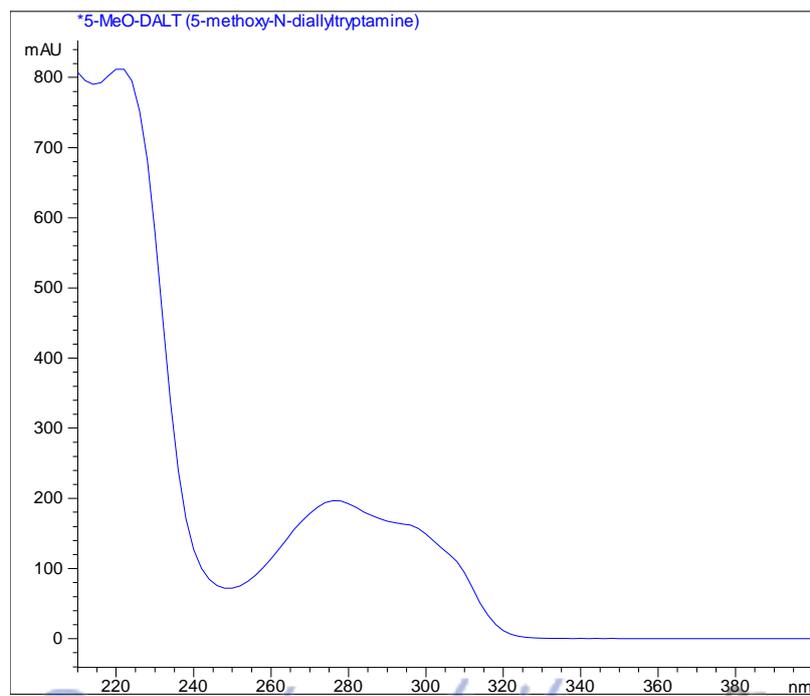


Figure 3.4. Spectre UV de la 5-MeO-DALT.

La méthode CLHP/UV-BD après double réextraction est linéaire ($r^2 > 0,999$ et % de déviation $< 15\%$), de 0,05 mg/L à 2 mg/L. La fidélité ($CV_r < 12,3\%$ et $CV_{fi} < 10,7\%$) et la justesse ($I < 15\%$) répondent aux critères de validation utilisés dans le laboratoire sauf pour la 2C-I, pour laquelle la fidélité et la justesse sont au-delà des normes ($CV_{fi} > 15\%$ et $I > 15\%$). Elle a été validée sur le signal A (230 nm) et C (210 nm). Le signal B (254 nm) n'a pas été utilisé car à cette longueur d'onde, l'intensité du signal est basse pour la plupart des molécules étudiées.

3.2.4 Analyse chromatographique quantitative en CLUHP/SM/SM

Les temps de rétention observés en CLUHP/SM/SM et les deux transitions spécifiques de chaque molécule sont présentés dans le tableau XIII (c).

Tableau XIII. Résultats de la mise au point des techniques d'identification sur CPG/SM (a), HPLC/UV-BD (b) et CLUHP/SM/SM (c) (* : Présence d'un épaulement ; A : 230nm ; B : 254 nm ; C : 210 nm ; Tr : temps de rétention ; ND : Non détecté).

CPG/SM						
(a)	Ions fragments				(MM-HFBA) ⁺	Tr (min)
	1	2	3	4		
2C-B	242	229	148	226	455	7,75
2C-C	198	185	155	200	411	7,39
2C-D	178	165	135	163	391	7,59
2C-E	179	192	91	177	405	7,02
2C-H	164	121	151	91	377	6,64
2C-I	290	277	148	91	503	8,20
2C-N	209	226	169	136	422	9,32
2C-P	193	206	177	226	419	8,17
2C-T-2	211	224	226	181	437	8,23
2C-T-4	183	225	153	226	451	8,23
2C-T-7	225	226	238	153	451	8,53
5-MeO-DALT	110	159	144	356	ND	8,64

CLHP-UV							
(b)	Absorption maximale (nm)				Ratio		Tr (min)
	λ_1	λ_2	λ_3	λ_4	A/B	A /C	
2C-B	210	224*	296		17,4	0,37	5,78
2C-C	210	224	296		32,7	0,39	5,16
2C-D	210	222	290		22,2	0,60	5,30
2C-E	210	224	290		24,1	0,55	6,73
2C-H	226	290			31,1	0,97	2,85
2C-I	210	232	298		12,4	0,48	6,49
2C-N	220	244	278	372	1,66	0,83	3,90
2C-P	210	224	290		26,8	0,53	8,17
2C-T-2	210	252	304		1,64	0,51	6,45
2C-T-4	210	254	304		2,17	0,43	7,41
2C-T-7	210	252	304		1,59	0,52	7,80
5-MeO-DALT	220	276			7,49	0,74	8,82

CLUHP/SM/SM				
(c)	Ion parent	Ions fragments		Tr (min)
		1	2	
2C-B	262	230	245	5,88
2C-C	216	184	169	5,39
2C-D	196	164	149	5,07
2C-E	210	178	193	6,62
2C-H	182	150	165	3,51
2C-I	308	276	291	6,71
2C-N	227	151	210	4,28
2C-P	224	207	192	8,11
2C-T-2	242	210	225	6,56
2C-T-4	256	197	239	7,55
2C-T-7	256	197	239	8,06
5-MeO-DALT	271	110	174	6,73

La courbe de calibration en CLUHP/SM/SM est linéaire ou quadratique selon les substances ($r^2 > 0,996$ et % de déviation $< 15\%$), de 10 µg/L à 1000 µg/L (tableau XIV). La fidélité ($CV_r < 6,11\%$ et $CV_{fi} < 10,8\%$) et la justesse ($l < 15\%$) répondent aux critères de validation utilisés dans le laboratoire.

Tableau XIV. Résultats de la validation de la linéarité et de la fidélité en CLUHP/SM/SM.

	Linéarité		Fidélité	
	Courbe de régression	r^2	CV_r	CV_{fi}
2C-B (1)	Quadratique	$> 0,9993$	$< 3,37$	$< 7,52$
2C-B (2)	Quadratique	$> 0,9995$	$< 3,71$	$< 6,80$
2C-C (1)	Quadratique	$> 0,9995$	$< 2,72$	$< 6,38$
2C-C (2)	Quadratique	$> 0,9995$	$< 4,02$	$< 6,60$
2C-D (1)	Quadratique	$> 0,9996$	$< 2,60$	$< 6,92$
2C-D (2)	Quadratique	$> 0,9996$	$< 2,71$	$< 7,76$
2C-E (1)	Quadratique	$> 0,9995$	$< 2,55$	$< 8,92$
2C-E (2)	Quadratique	$> 0,9994$	$< 2,78$	$< 7,83$
2C-H (1)	Quadratique	$> 0,9995$	$< 2,97$	$< 8,34$
2C-H (2)	Quadratique	$> 0,9994$	$< 2,95$	$< 9,39$
2C-I (1)	Quadratique	$> 0,9996$	$< 4,21$	$< 8,36$
2C-I (2)	Quadratique	$> 0,9996$	$< 3,24$	$< 5,73$
2C-N (1)	Linéaire	$> 0,9991$	$< 3,72$	$< 7,77$
2C-N (2)	Linéaire	$> 0,9993$	$< 3,82$	$< 10,8$
2C-P (1)	Quadratique	$> 0,9995$	$< 3,86$	$< 8,90$
2C-P (2)	Quadratique	$> 0,9996$	$< 3,35$	$< 9,55$
2C-T-2 (1)	Quadratique	$> 0,9993$	$< 5,99$	$< 8,43$
2C-T-2 (2)	Quadratique	$> 0,9994$	$< 4,62$	$< 5,78$
2C-T-4 (1)	Linéaire	$> 0,9983$	$< 3,36$	$< 6,23$
2C-T-4 (2)	Linéaire	$> 0,9970$	$< 3,97$	$< 5,84$
2C-T-7 (1)	Linéaire	$> 0,9984$	$< 6,11$	$< 8,95$
2C-T-7(2)	Linéaire	$> 0,9969$	$< 5,26$	$< 6,08$
5-MeO-DALT (1)	Quadratique	$> 0,9994$	$< 4,40$	$< 7,52$
5-MeO-DALT (2)	Quadratique	$> 0,9996$	$< 5,04$	$< 7,08$

Une transition est utilisée pour la quantification et l'autre est utilisée pour la qualification (c'est-à-dire la vérification).

La limite de quantification (LDQ) a été choisie et validée à 10 µg/L (n=10). Cette limite a été choisie car il constitue le premier point de gamme. Un test a été effectué à 5 µg/L mais n'a pu être validé. Une amélioration possible de la sensibilité pourrait être de diluer seulement au 1/2 le surnageant de centrifugation au lieu de 1/4. Cette approche n'a pas été évaluée.

Concernant l'étude sur l'effet matrice, l'expérimentation a donné des résultats satisfaisants tant au niveau de l'effet matrice (91,5 à 105,5%) qu'au niveau du rendement (85,5 à 92%) (tableau XV).

Tableau XV. Résultats de l'étude de l'effet matrice et du rendement pour la validation de méthode en CLUHP/SM/SM pour chaque transition (1) et (2).

Molécules	Effet matrice (%)	Rendement (%)
2C-B (1)	95 ± 4	85,5 ± 4,5
2C-B (2)	95,5 ± 4,5	85,5 ± 3,5
2C-C (1)	97 ± 2	87,5 ± 4,5
2C-C (2)	96 ± 3	88 ± 5
2C-D (1)	95,5 ± 3,5	89,5 ± 4,5
2C-D (2)	97 ± 4	89,5 ± 3,5
2C-E (1)	95,5 ± 3,5	85,5 ± 2,5
2C-E (2)	94,5 ± 4,5	86,5 ± 2,5
2C-H (1)	96,5 ± 2,5	91 ± 6
2C-H (2)	96,5 ± 2,5	90,5 ± 5,5
2C-I (1)	98,5 ± 1,5	80,5 ± 4,5
2C-I (2)	100 ± 2	82 ± 3
2C-N (1)	101,5 ± 3,5	90 ± 5
2C-N (2)	100 ± 1	90 ± 5
2C-P (1)	92 ± 7	84,5 ± 2,5
2C-P (2)	91,5 ± 7,5	85 ± 3
2C-T-2 (1)	100,5 ± 2,5	88,5 ± 4,5
2C-T-2 (2)	99 ± 2	89,5 ± 4,5
2C-T-4 (1)	101 ± 2	87 ± 4
2C-T-4 (2)	101 ± 2	86 ± 4
2C-T-7 (1)	103 ± 4	87 ± 4
2C-T-7(2)	104 ± 5	86,5 ± 4,5
5-MeO-DALT (1)	105,5 ± 6,5	91,5 ± 6,5
5-MeO-DALT (2)	104,5 ± 5,5	92 ± 7

4 Application à des cas cliniques

4.1 Patient 1 (Dossier Centre Antipoison n°381449)

4.1.1 Présentation

Un homme d'une vingtaine d'années est hospitalisé, en même temps qu'un ami, après la prise de 4 gouttes sur un sucre d'une drogue présentée comme étant de la mescaline.

A l'admission, le patient est désorienté. Il présente une mydriase bilatérale, une tachycardie sinusale à 140 battements/min et une hypersudation. Peu de temps après son arrivée, il aura une phase d'hallucinations et d'agitation.

Pour pallier à ses symptômes, un traitement symptomatique par benzodiazépines lui est administré.

Le patient et son ami sortent après 24h de surveillance lorsque les symptômes se sont totalement dissipés.

4.1.2 Résultats

La figure 4.1 présente le chromatogramme urinaire obtenu par CLHP/UV-BD après double réextraction. Le pic à 7,62 min est celui de l'étalon interne (méthylmilnacipran). Le pic à 8,11 min présente un spectre caractéristique des 2C-x (figure 4.2) et le temps de rétention trouvé est similaire à celui enregistré dans la bibliothèque ($t_R = 8,17$ min) pour la 2C-P. Le pic à 4,16 min présente une analogie spectrale avec celui de la 2C-P et pourrait donc être un métabolite plus polaire. Le pic à 9,47 min a une analogie spectrale avec la lidocaïne ainsi qu'un temps de rétention similaire. Cette présence est due à une utilisation de lidocaïne dans le service pour poser une sonde urinaire.

L'analyse de l'urine par CPG/MS après dérivation HFBA (figure 4.3) permet de confirmer les données obtenues précédemment et d'obtenir plus amples informations. Le spectre de masse observé à 7,59 min (figure 4.4) est comparable à celui de la 2C-P entré dans la bibliothèque avec l'ion principal 119 et les ions fragments 193, 206, 177 et 226 effectivement retrouvés. Le temps de rétention est légèrement différent de celui entré à titre indicatif ($t_R = 8,17$ min) dans la bibliothèque mais cette donnée n'est pas retenue comme critère d'identification car la longueur de

la colonne peut être légèrement diminuée au cours du temps afin de conserver une qualité d'injection correcte.

L'urine a également été étudiée en CLUHP/SM/SM. La figure 4.5 présente le chromatogramme obtenu avec un temps de rétention ($t_R = 7,91$ min) identique pour les deux transitions retenues et comparable à celui enregistré ($t_R = 8,11$ min). La concentration urinaire déterminée grâce à la gamme d'étalonnage sur plasma en diluant au préalable l'urine au $1/5^{\text{ème}}$ dans un plasma témoin au préalable est égale à $1262 \mu\text{g/L}$.

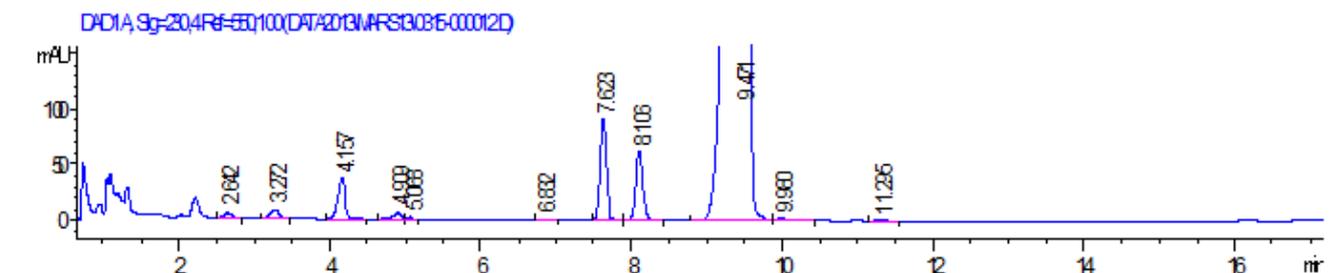


Figure 4.1. Chromatogramme CLHP/UV-BD urinaire à 230 nm du patient 1.

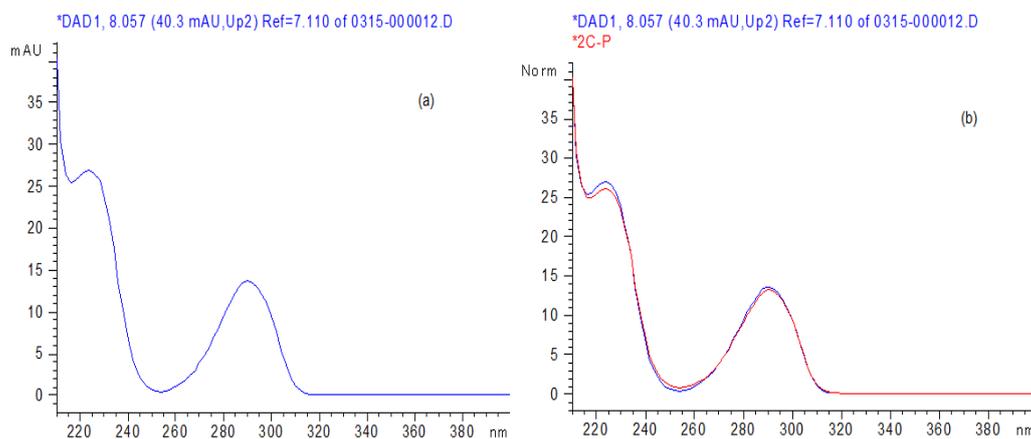


Figure 4.2. Spectre UV du pic $t_R = 8,11$ min (a) comparé à celui de la 2C-P (b).

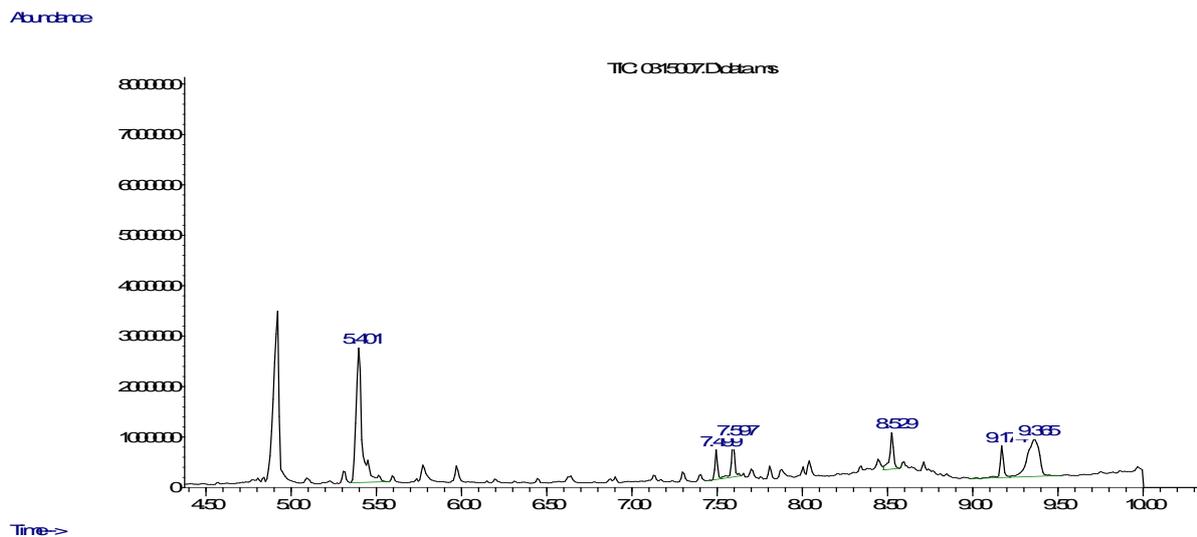


Figure 4.3. Chromatogramme obtenu en mode Scan pour l'urine du patient 1 par CPG/SM après dérivation par HFBA.

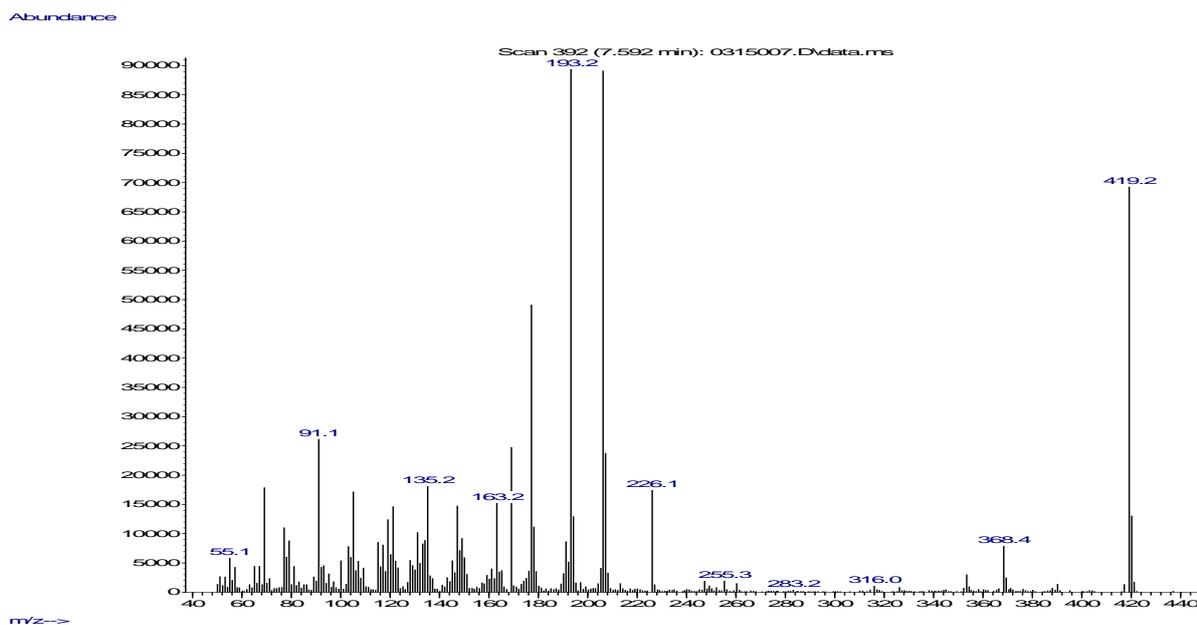


Figure 4.4. Spectre de masse en impact électronique de la 2C-P ($t_R = 7,59$ min) retrouvée dans l'urine du patient 1 après dérivation par HFBA.

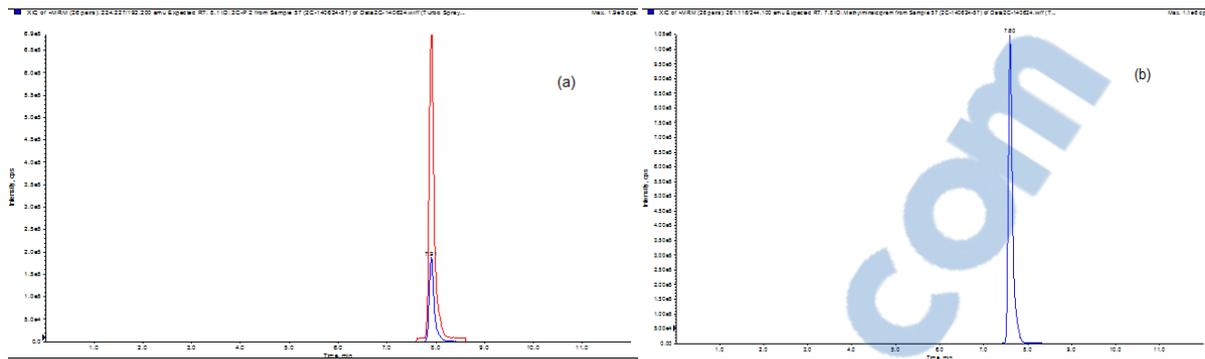


Figure 4.5. Chromatogrammes urinaires observés pour le patient 1 par CLUHP/SM/SM : 2C-P ($t_R = 7,91$ min, transitions 1 et 2) (a) et méthylmiltnacipran (b).

4.1.3 Discussion

Aucun cas concernant la 2C-P n'a été recensé dans la littérature. 4 autres cas d'exposition à cette substance ont également été documentés par le laboratoire et le Centre Antipoison et sont en cours de publication. Aucune concentration plasmatique n'a pu être mesurée. En effet, la 2C-P était éventuellement visible mais inférieure à $10\mu\text{g/L}$ ou encore non détectée et c'est l'analyse urinaire qui a permis de confirmer l'exposition.

4.2 Patient 2 (Dossier Centre Antipoison n°372467)

4.2.1 Présentation

Un homme de 41 ans est hospitalisé pour des convulsions survenues 4 heures après la prise orale de 20 mg d'une drogue présentée comme étant de la 2C-T-2. Il aurait aussi fumé du cannabis lors de la soirée.

Le patient est agité, délirant et montre des signes d'hallucinations à son arrivée. Il présente une tachycardie sinusale à 130 battements/min, une hypertension artérielle, une instabilité hémodynamique et une mydriase. Son score de Glasgow est égal à 11/15.

Le centre antipoison est appelé pour savoir quelle est la conduite à tenir pour ce cas-là. Sur les conseils du médecin toxicologue, un soluté de remplissage lui est administré ainsi que des benzodiazépines. Un prélèvement de sang et d'urines sont effectués pour analyse toxicologique à son arrivée soit environ 4h après la prise de cette drogue.

Le patient sort à H15 après disparition des symptômes.

4.2.2 Résultats

L'alcoolémie se révèle négative. Le dépistage urinaire des stupéfiants classiques est seulement positif au cannabis.

La figure 4.6 présente le chromatogramme urinaire obtenu par CLHP/UV-BD après double réextraction. Le pic à 8,12 min est celui de l'étalon interne (2C-T-7). Le pic à 7,77 min présente un spectre similaire à celui de la 2C-T-4 (figure 4.7) et de la 2C-T-2 mais le temps de rétention observé est proche de celui enregistré pour la 2C-T-4 ($t_R = 7,41$ min) contre 6,45 min pour la 2C-T-2. Les autres pics (à 2,12 et 3,69 min) présentent une analogie spectrale avec celui de la 2C-T-4 et pourraient donc être des métabolites plus polaires. On obtient une concentration urinaire de 2,25 mg/L. La figure 4.8 présente le chromatogramme obtenu après double réextraction du plasma. On retrouve également la 2C-T-4 représenté par le pic à 7,61 min. On obtient une concentration plasmatique de 0,088 mg/L.

L'analyse de l'urine par CPG/SM après dérivation HFBA (figure 4.9) confirme qu'il ne s'agit pas de la 2C-T-2 mais bien de la 2C-T-4. Le spectre de masse à 9,19 min (figure 4.10) est semblable à celui de la 2C-T-4 avec les ions fragments 183, 225, 153 et 196 effectivement retrouvés ici. L'ion moléculaire – HFBA (MM-HFBA 451) est visible. L'ion 225 provient de la cassure de la liaison en β de l'azote. La présence de métabolites n'est pas exclue mais difficile à déterminer sur cette urine.

L'urine a également été étudiée en CLUHP/SM/SM. La figure 4.11 présente le chromatogramme obtenu. Le temps de rétention ($t_R = 7,16$ min) est similaire à celui enregistré pour la 2C-T-4 ($t_R = 7,55$ min). La concentration urinaire a pu être déterminée grâce à la gamme d'étalonnage du plasma. L'urine a été diluée au préalable au $1/10^{\text{ème}}$. On retrouve une concentration finale de 2540 $\mu\text{g/L}$.

Le patient a donc consommé de la 2C-T-4 et non de la 2C-T-2.

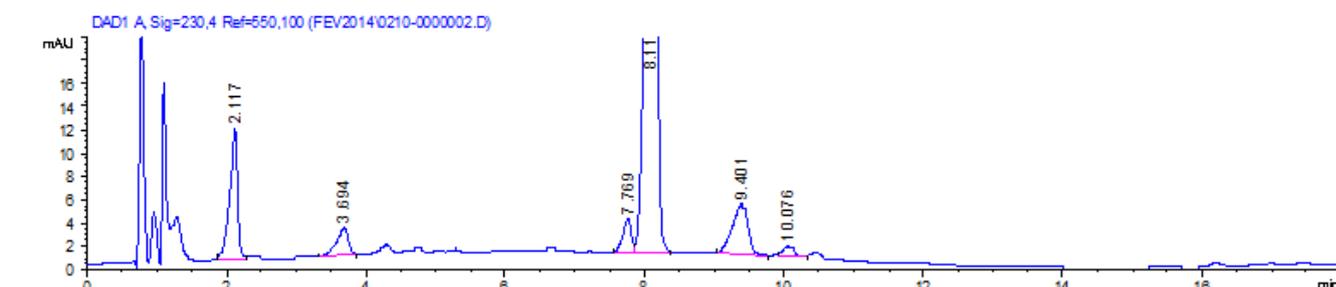


Figure 4.6. Chromatogramme CLHP/UV-BD urinaire à 230 nm du patient 2.

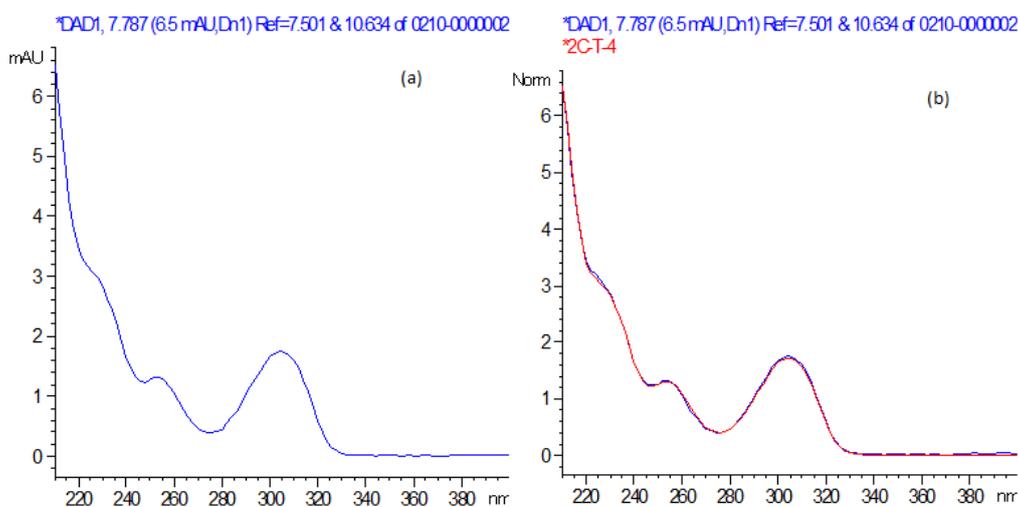


Figure 4.7. Spectre UV du pic $t_R = 7,77$ min (a) comparé à celui de la 2C-T-4 (b).

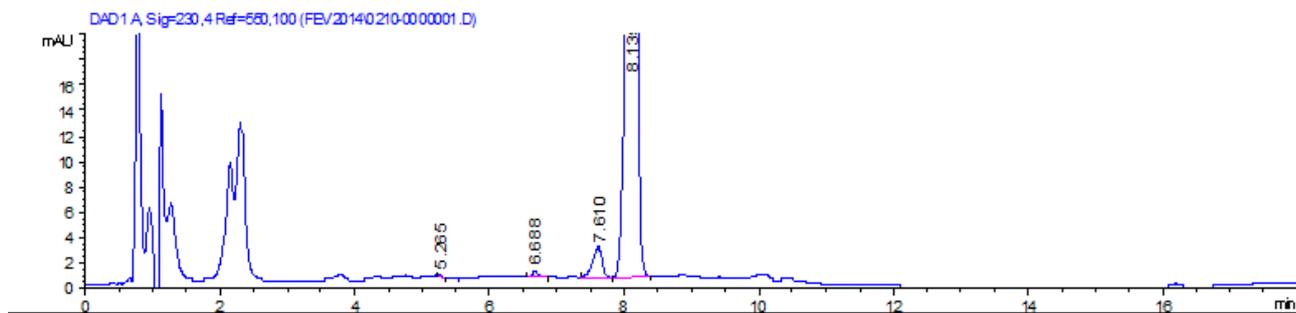


Figure 4.8. Chromatogramme CLHP/UV-BD plasmatique à 230 nm du patient 2.

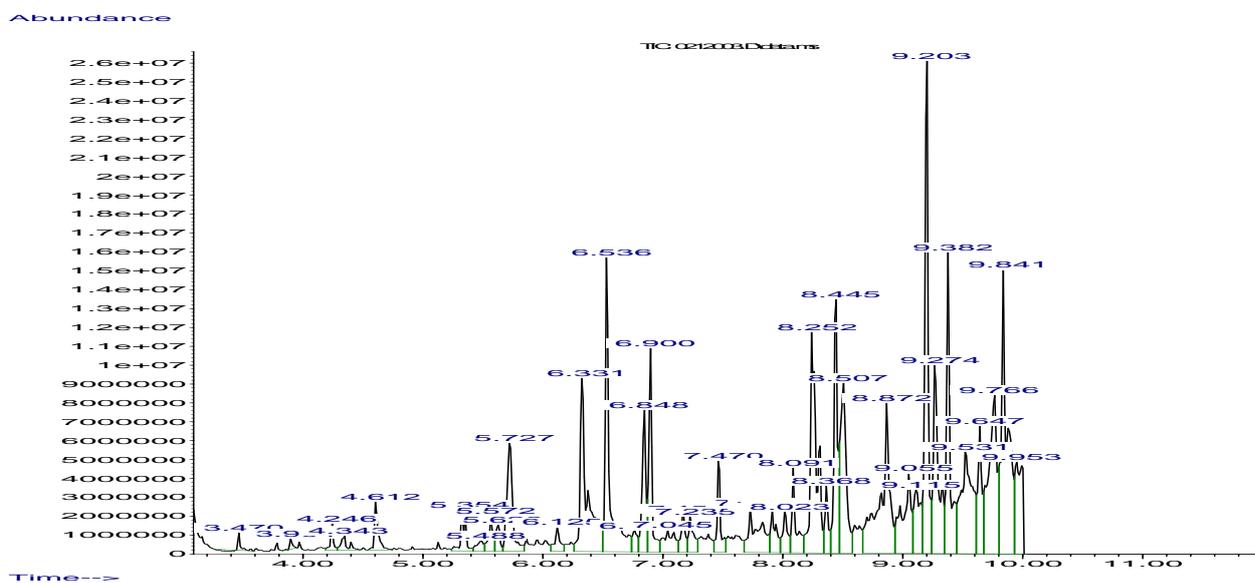


Figure 4.9. Chromatogramme en mode Scan de l'urine du patient 2 par CPG/SM après dérivation HFBA.

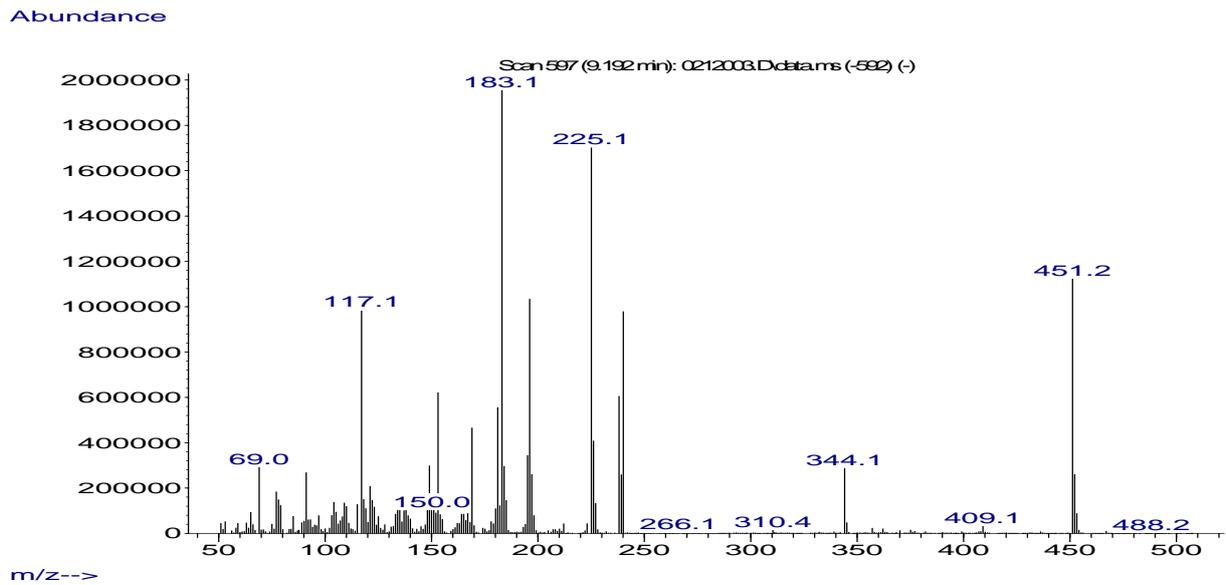


Figure 4.10. Spectre de masse de la 2C-T-4 ($t_R = 9,19$ min) retrouvée dans l'urine du patient 2 par CPG/SM après dérivation HFBA.

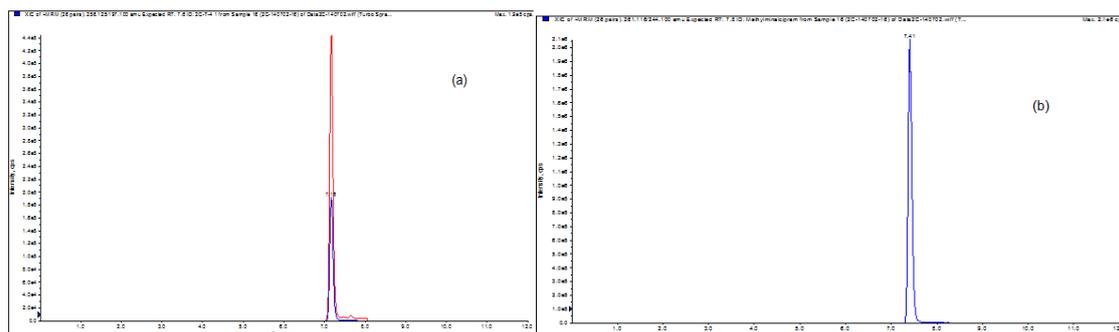


Figure 4.11. Chromatogrammes urinaires (patient 2) de la 2C-T-4 ($t_R = 7,16$ min, transitions 1 et 2) (a) et du méthylmilnacipran (b) par CLUHP/SM/SM.

4.2.3 Discussion

MIYAJIMA et coll. (2008) décrivent le seul cas de 2C-T-4 trouvé dans la littérature. Cependant, aucune analyse, tant qualitative que quantitative, n'y est décrite.

4.3 Patient 3 (Dossier Centre Antipoison n°409741)

4.3.1 Présentation

Une jeune femme de 23 ans est hospitalisée une heure après avoir pris un demi-comprimé d'Halucium (2C-E). Elle a acheté ce produit (deux comprimés) sur internet sur conseil de son entourage. Elle n'a pas d'antécédents de toxicomanie ou de consommation régulière de produits stupéfiants. La patiente ramène un comprimé avec elle.

A l'arrivée aux urgences, la patiente présente des hallucinations, des tremblements et une tachycardie à 91 battements/min. Le reste de l'examen clinique est normal.

Un bilan toxicologique sur le sang, l'urine et le comprimé est effectué.

La patiente sort à H19 après que les symptômes se soient dissipés.

4.3.2 Résultats

L'alcoolémie est négative. Le dépistage urinaire à la cocaïne, aux opiacés, au cannabis et aux amphétamines est lui aussi négatif. L'analyse sur le sang a montré la présence de tramadol à une concentration inférieure à 0,05 mg/L/

La figure 4.12 présente le chromatogramme urinaire obtenu par CLHP/UV-BD après double réextraction. Le pic à 7,80 min est celui de l'étalon interne (méthylmilnacipran). Le pic à 7,03 min présente un spectre assez caractéristique de la 2C-E (figure 4.13) et un temps de rétention comparable à celui enregistré dans la bibliothèque ($t_R = 6,73$ min) pour cette molécule. Le pic à 2,28 min présente une analogie spectrale avec celui de la 2C-E et pourrait donc être un métabolite.

La figure 4.14 présente le chromatogramme urinaire obtenu en CLUHP/SM/SM. Le temps de rétention ($t_R = 6,42$ min) est similaire à celui enregistré pour la 2C-E ($t_R = 6,61$ min). La concentration urinaire a été déterminée grâce à la gamme d'étalonnage du plasma et retrouvée égale à 29 $\mu\text{g/L}$. L'analyse du plasma n'a pas permis de mettre en évidence la 2C-E.

Le comprimé amené par la jeune femme a été étudié seulement en CLHP/UV-BD (figures 4.15 et 4.16). Les données macroscopiques sont les suivantes : comprimé

blanc-beige, sécable en deux, poids 185 mg et diamètre de 8 mm pour une épaisseur de 3,2 mm. La moitié du comprimé (84,3 mg) a été dissoute dans 10 mL de méthanol. Il subsiste une forte proportion de poudre non soluble. Après centrifugation, le méthanol surnageant est dilué au 1/20^e. Afin de connaître la concentration en 2C-E du comprimé, on a pris la solution de référence à 50 mg/L pour comparaison. La concentration finale est de 30 mg par comprimé (forme base).

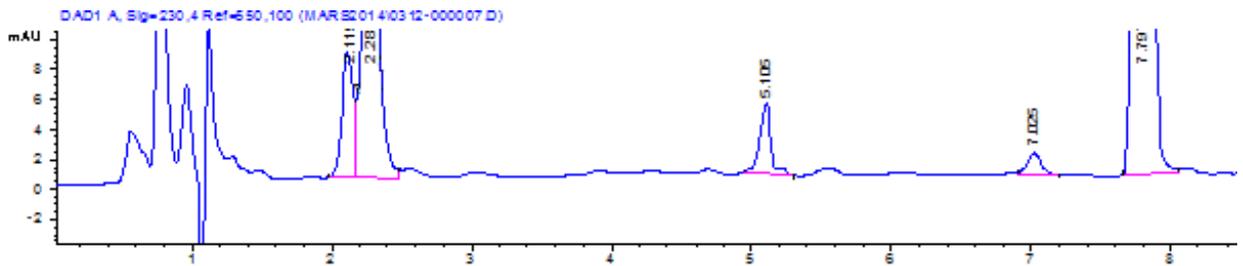
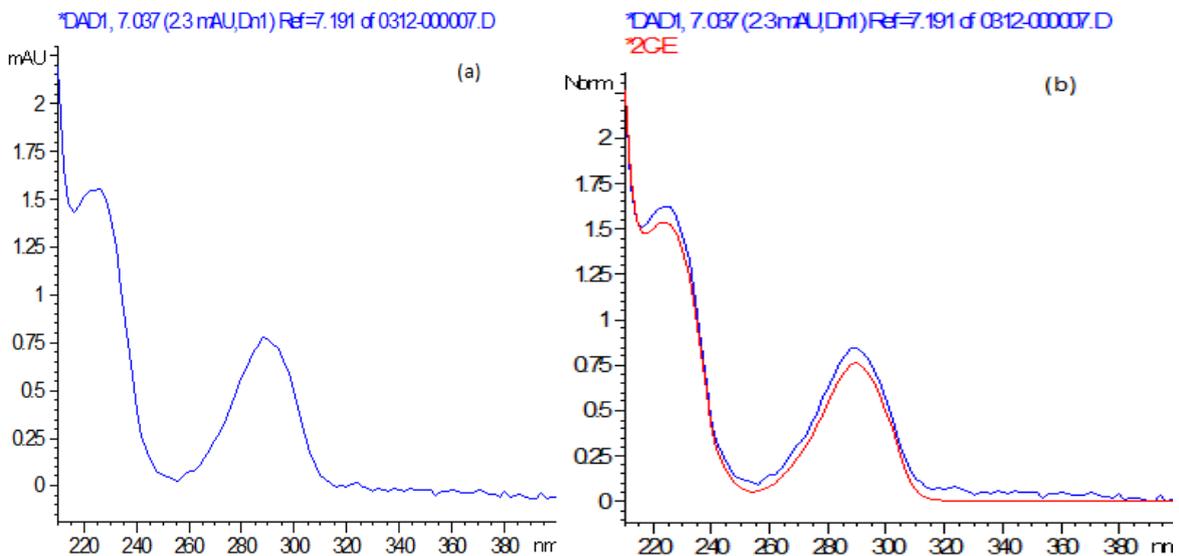


Figure 4.12. Chromatogramme urinaire à 230 nm du patient 3 par CLHP/UV-BD après double extraction : 2C-E (tr 7,02 min) ; Méthylmilnacipran (tr 7,79 min).



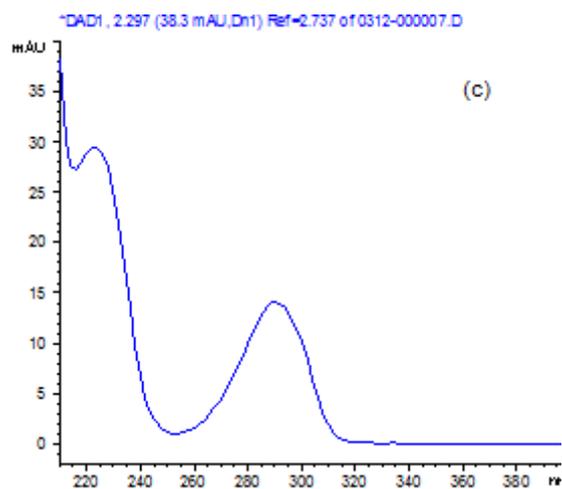


Figure 4.13. Spectre UV du pic $t_R = 7,03$ min (a) comparé à celui de la 2C-E (b) ainsi qu'un métabolite supposé de la 2C-E (c).

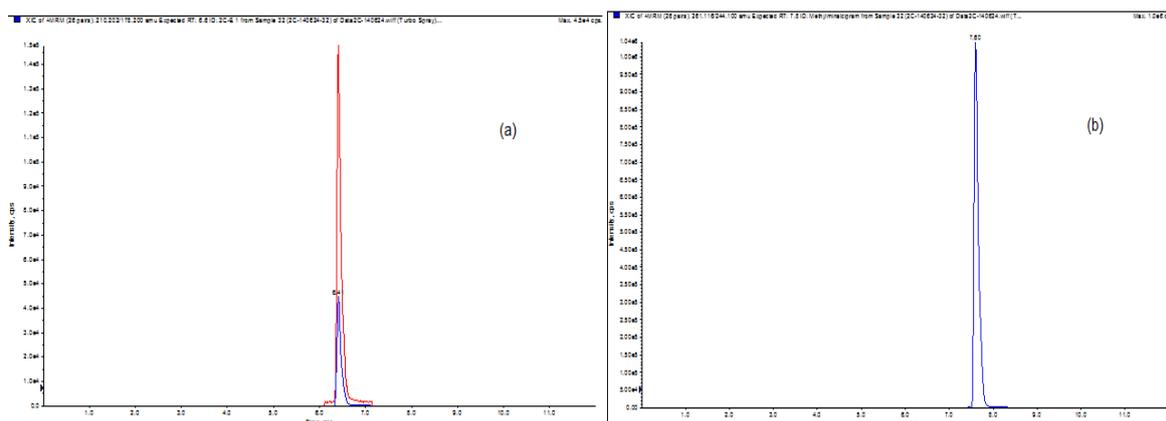


Figure 4.14. Chromatogrammes urinaires (patient 3) de la 2C-E ($t_R = 6,41$ min) (a) et du méthylmilnacipran (b) par CLUHP/SM/SM.

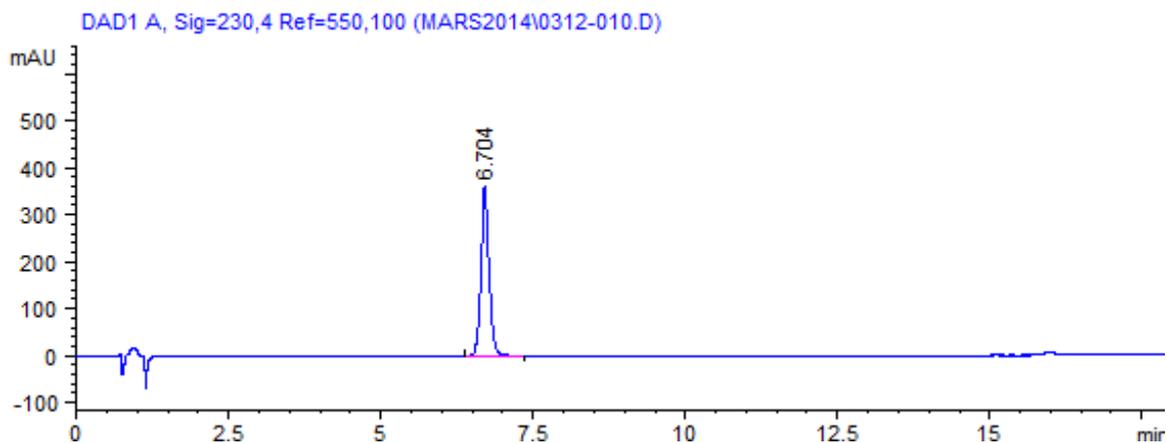


Figure 4.15. Chromatogramme CLHP/UV-BD du comprimé de 2C-E.

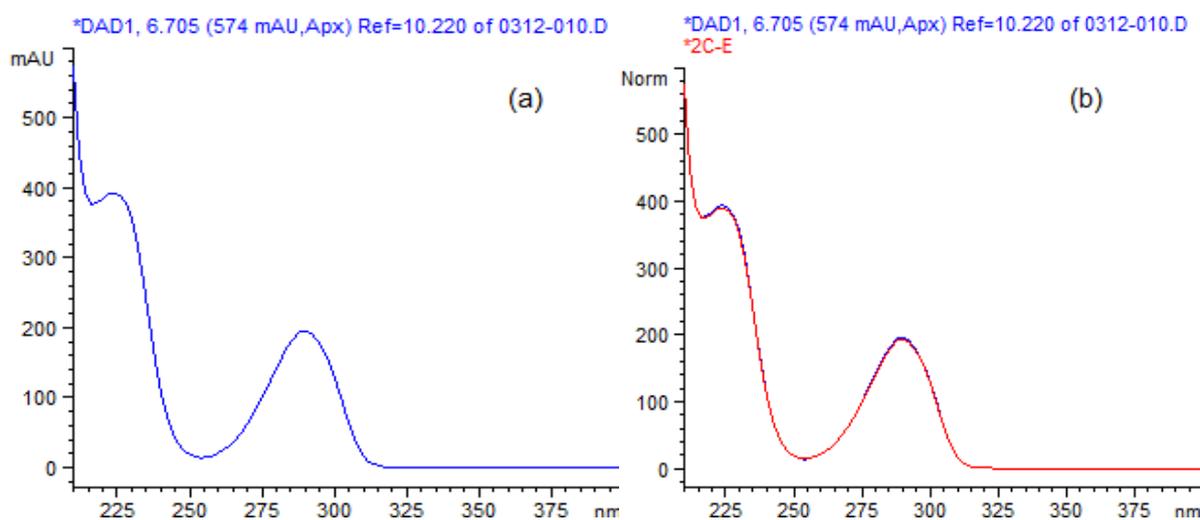


Figure 4.16. Spectre UV du pic $t_R = 6,704$ min (a) comparé à celui de la 2C-E (b).

4.3.3 Discussion

VRANCKEN et coll. (2013) ainsi que SACKS et coll. (2012) relatent le cas d'un même homme (26 ans). Ce patient est retrouvé inconscient dans la maison d'un ami après avoir pris de la 2C-E, information donnée par cet ami. Ce jeune homme a des antécédents psychiatriques et de consommation de stupéfiants. À l'admission, le patient présente une insuffisance rénale et une leucocytose. L'IRM montre une leuco encéphalopathie. L'homme décédera deux semaines plus tard. Aucune notion d'analyse toxicologique n'est indiquée.

PICHINI et coll. (2008) présente les cas de trente-deux consommateurs habituels de diverses drogues. La 2C-E a été mise en évidence dans l'urine de deux patients à l'aide d'une chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Les concentrations urinaires sont présentées dans le tableau XVI.

Tableau XVI. Concentrations urinaires en 2C-E sans hydrolyse et après hydrolyse enzymatique

	Concentration sans hydrolyse (en µg/L)	Concentration après hydrolyse enzymatique (en µg/L)
Patient 1	77,1	258,5
Patient 2	0	68,4

LOOD et coll. (2004) ont présentés trois cas d'exposition à la 2C-E. L'analyse toxicologique a été faite dans leurs urines par CPG/SM. Aucune donnée quantitative n'est disponible pour comparaison au cas présenté.

4.4 Patient 4 (Dossier Centre Antipoison n°397113)

4.4.1 Présentation

Un homme de 27 ans est hospitalisé pour un coma et un état de mal convulsif, résistant au Rivotril et Valium, suite à une consommation d'alcool et de stupéfiants lors d'une soirée. L'heure d'exposition exacte n'est pas connue. On retrouve deux sachets de poudres dans ses poches dont un contiendrait de la nicotine.

Des amis disent qu'il aurait pris de la 5-MeO-DALT et qu'il aurait fait d'emblée une crise de tétanie puis une perte de connaissance brutale.

A l'examen clinique, on retrouve un trismus, une hypersalivation, une mydriase bilatérale. Son score de Glasgow est à 3/15. Le patient est intubé et ventilé pour crises convulsives ne cédant pas sous benzodiazépines.

Après extubation (H8), le patient dira avoir consommé un demi-rail de cocaïne, du cannabis, du tabac en snus (tabac humidifié en continu sous la langue) et de l'alcool, en plus de la 5-MeO-DALT. Il présente une amnésie de sa fin de soirée et de son arrivée aux urgences.

Un bilan toxicologique sur le sang, l'urine et les deux poudres est effectué.

Le patient sort de l'hôpital après 48h.

4.4.2 Résultats

Un dépistage urinaire a été effectué et s'est révélé négatif pour le cannabis, la cocaïne, les opiacés et les amphétamines. Son alcoolémie est de 2,2 g/L à l'admission.

La figure 4.17 présente le chromatogramme urinaire obtenu par CLHP/UV-BD après double réextraction. Le pic à 7,41 min est celui de l'étalon interne (méthylmilnacipran). Le pic à 8,84 min présente un spectre assez caractéristique de la 5-MeO-DALT (figure 4.18) et le temps de rétention trouvé est similaire à celui enregistré en bibliothèque ($t_R = 8,82$ min) pour cette molécule. Les autres pics (à 4,38 ; 4,57 et 7,93 min) présentent une analogie spectrale avec celui de la 5-MeO-DALT et pourrait donc être des métabolites plus polaires. La concentration urinaire, mesurée par cette approche CLHP/UV-BD, est égale à 1,60 mg/L. Le pic à 1,78 min a une analogie spectrale avec la méthiopropamine (autre nouvelle drogue de

synthèse non étudiée ici) ainsi qu'un temps de rétention similaire. La quantification de cette substance n'a pas été effectuée pour le moment. La méthode est en cours de mise au point.

L'analyse de l'urine par CPG/SM après dérivation HFBA (figure 4.19) apporte des informations complémentaires permettant de confirmer les données obtenues précédemment. Le spectre de masse à 8,67 min (figure 4.20) est semblable à celui de la 5-MeO-DALT ($t_R = 8,64$ min) de référence. Les ions fragments m/z 110, 159, 144 et 356 sont effectivement retrouvés ici. Quant à l'ion moléculaire – HFBA (MM-HFBA 466), il n'est pas visible, comme pour le spectre de la molécule de référence. Les ions m/z 110 et 356 proviennent de la cassure de la liaison en α de l'azote.

Les deux poudres ont été analysées par CLHP/UV-BD et par CPG/SM. La poudre 1, correspond à un mélange de méthiopropamine et de benzocaïne. L'analyse de la poudre 2 a mis en évidence de la nicotine et du menthol. Aucune des deux poudres ne contenaient la 5-MeO-DALT.

L'urine et le plasma ont également été étudiés en CLUHP/SM/SM. La figure 4.21 présente le chromatogramme urinaire obtenu. Le temps de rétention ($t_R = 6,42$ min) est similaire à celui enregistré pour la 5-MeO-DALT ($t_R = 6,67$ min). La concentration urinaire a pu être déterminée après dilution initiale au 1/5^{ème} dans un plasma témoin. La concentration urinaire finale est égale à 1500 $\mu\text{g/L}$, valeur très proche de celle mesurée en UV/BD. La concentration plasmatique est égale à 31 $\mu\text{g/L}$.

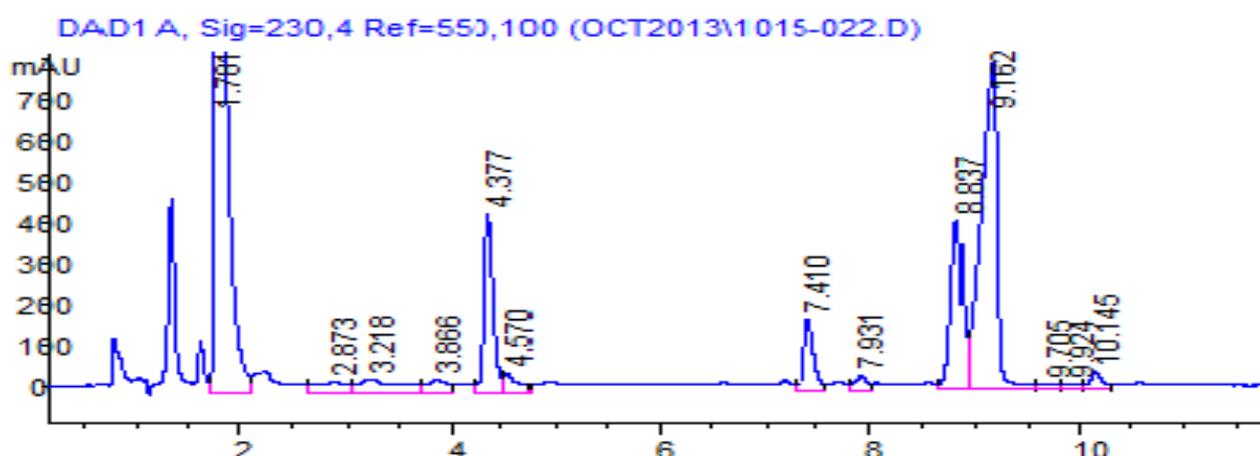


Figure 4.17. Chromatogramme CLHP/UV-BD urinaire à 230 nm du patient 4.

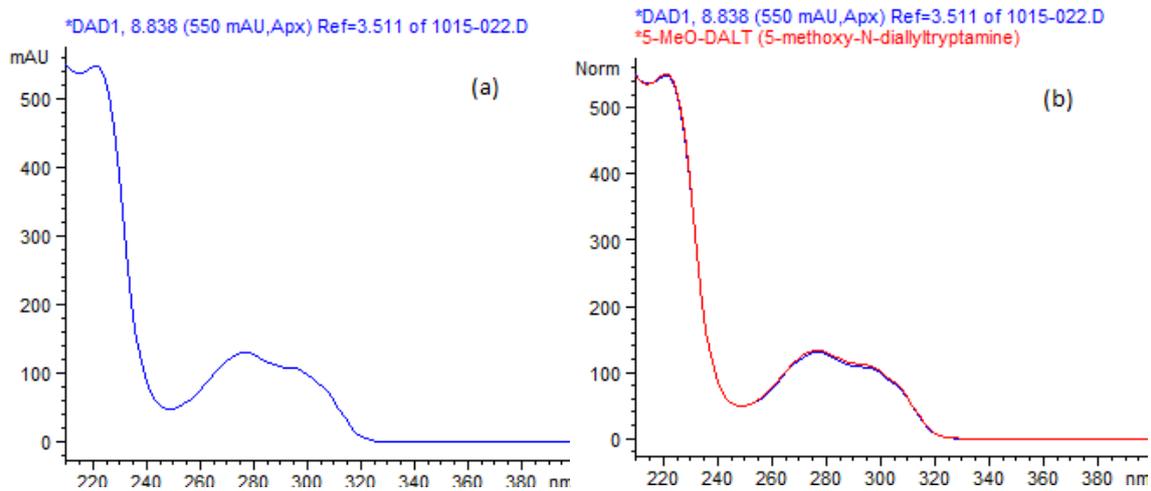


Figure 4.18. Spectre UV du pic $t_R = 8,84\text{min}$ (a) comparé à celui de la 5-MeO-DALT (b).

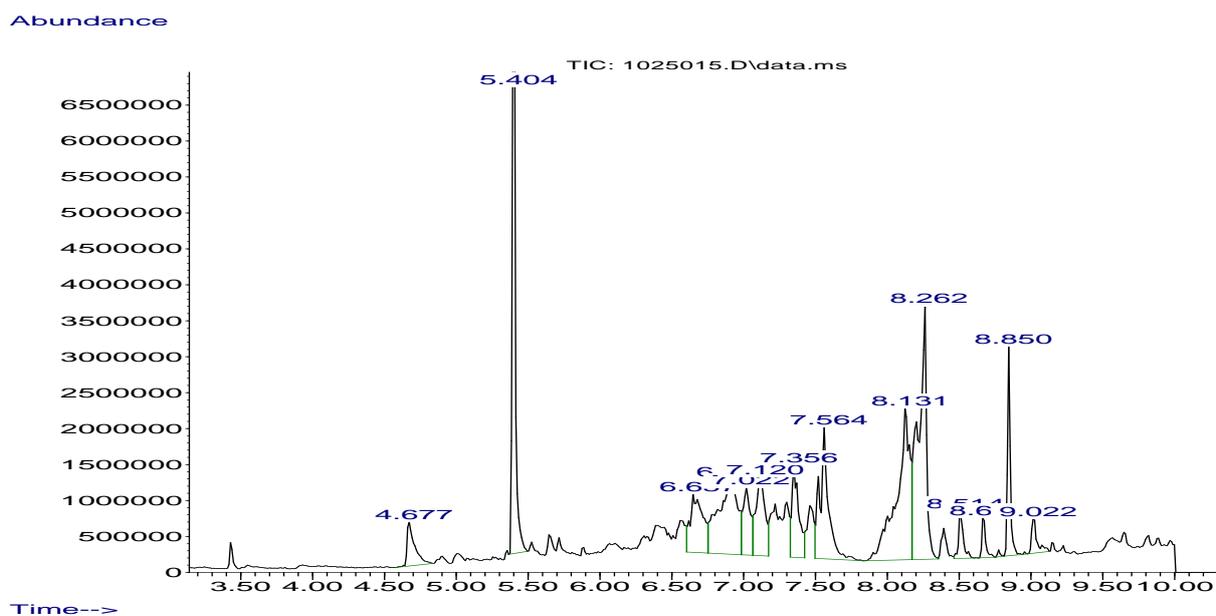


Figure 4.19. Chromatogramme CPG/SM de l'urine du patient 4.

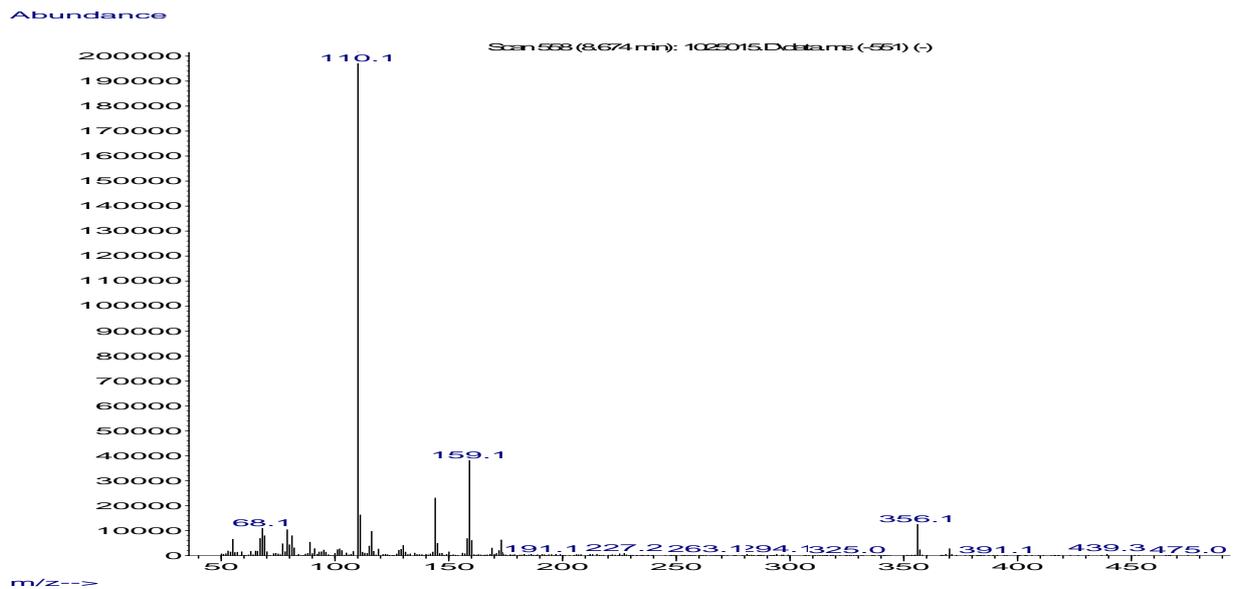


Figure 4.20. Spectre de masse de la 5-MeO-DALT ($t_R = 9,19$ min) retrouvé dans l'urine du patient 4.

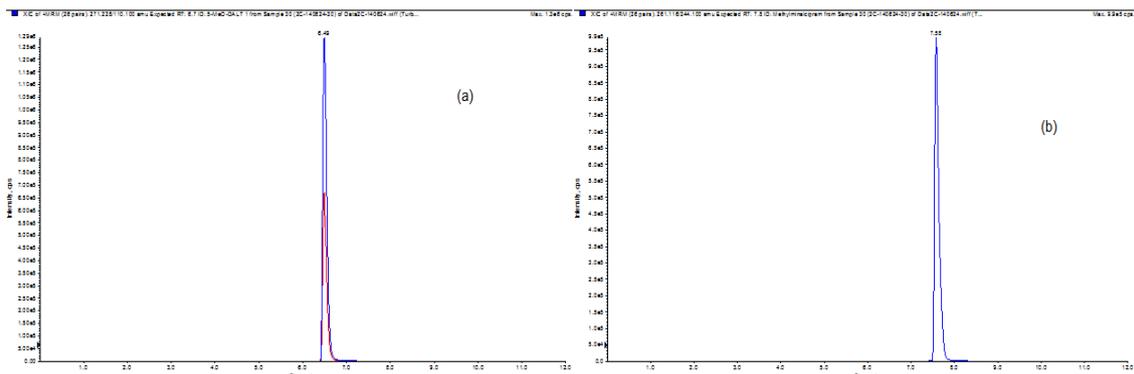


Figure 4.21. Chromatogrammes urinaires de la 5-MeO-DALT ($t_R = 6,49$ min) (a) et du méthylmilnacipran (b) par CLUHP/SM/SM.

4.4.3 Discussion

Les données concernant la 5-MeO-DALT sont peu nombreuses avec seulement 2 cas retrouvés dans la littérature. JOVEL et coll. (2013) relatent une intoxication ayant provoqué des délires [7]. Un simple dépistage urinaire a été effectué et a mis en évidence la présence de cannabinoïdes et amphétamines sans autre identification par analyse complémentaire.

CORKERY et coll. (2012) rapportent le cas d'un jeune homme décédé après avoir été heurté par une voiture alors qu'il marchait sur l'autoroute [8]. D'après l'enquête policière, il aurait « sniffé », plus tôt dans la soirée, 350 mg de 5-MeO-DALT. Une analyse par CLHP/UV-BD, effectuée sur le sang fémoral post-mortem, a montré la présence d'un produit présentant une analogie spectrale avec les tryptamines. Une analyse par CLHP/SM a permis de confirmer la présence de la 5-MeO-DALT dans le sang. Aucune quantification n'a été effectuée.

4.5 Résumé et présentation des autres cas.

Depuis 2011, 9 cas d'intoxication aux nouvelles phényléthylamines et à la 5-MeO-DALT ont été étudiés au laboratoire de pharmacologie-toxicologie d'Angers. Les résultats avec notre méthode sont rassemblés dans le tableau XVII. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux valeurs initialement trouvées pour la 2C-P par une méthode spécialement mise au point pour ces prélèvements après simple précipitation des protéines. Les urines ont été testées après dilution au 1/5^{ème} dans un plasma témoin. On observe une différence plus marquée pour les faibles valeurs qui serait peut-être en lien avec un éventuel problème de stabilité des échantillons urinaires conservés à + 4°C (certains prélèvements datant de 2011).

Tableau XVII. Cas d'intoxications aux phényléthylamines de type 2C-x et à la 5-MeO-DALT documentés au laboratoire de pharmacologie-toxicologie d'Angers.

Patient	Sexe	Age (ans)	Molécule	Quantification en CLUHP/SM/SM (µg/L)	
				Urines	Plasma
1	Masculin	≈ 20	2C-P	1262 (1160)	(20)
2	Masculin	41	2C-T-4	2540	
3	Féminin	23	2C-E	29	
4	Masculin	27	5-MeO-DALT	1500	31
5	Masculin	46	5-MeO-DALT	29	20
6	Masculin	21	2C-P	1515 (1670)	
7	Masculin	17	2C-P	79 (40)	
8	Masculin	21	2C-P	474 (347)	
9	Masculin	21	2C-P	111 (330)	

(xxx) : concentrations initialement trouvées par une autre méthode

Trois cas supplémentaires d'exposition à des drogues de synthèse, concernant 3 hommes ayant été hospitalisés au décours d'une soirée de type rave-party suite à des hallucinations, ont été étudiés. Les spectres obtenus en CLHP/UV-BD présentent une forte analogie spectrale avec la 2C-C mais avec un temps de rétention différent. Cependant la 2C-C n'a pas été retrouvée par CPG/SM et l'étude des urines de ces trois patients en CLUHP/SM/SM démontre qu'il ne s'agit pas de la 2C-C. L'étude de ces cas est toujours en cours.

5 Conclusion

Le travail réalisé avait pour but de constituer des bases de données qualitatives mais également de développer des méthodes analytiques en CLHP/UV-BD et CLUHP/SM/SM voire en CPG/SM pour permettre, dans le futur, une analyse plus pointue de ces nouvelles drogues de synthèse dans les liquides biologiques des patients hospitalisés. L'outil analytique est très important pour le toxicologue car il permet de documenter des cas d'intoxication et/ou réfuter une hypothèse de départ (comme pour le cas de la 2C-T-4). Ces analyses sont indispensables afin de compléter au mieux les dossiers des Centres Antipoison, qui ont un rôle de toxicovigilance.

Dans les quatre cas présentés ici, l'évolution de l'état des patients a été favorable du fait de leur prise en charge précoce. Ce n'est pas le cas pour tous les consommateurs comme cela a été présenté dans le tableau du Chapitre 2. Le tableau clinique est semblable, avec quelques variations, pour toutes ses drogues : hallucinations, agitation, mydriase et tachycardie.

Les molécules de la série des 2C ainsi que la 5-MeO-DALT occupent une place importante dans les milieux festifs en raison de leur faible coût et du statut légal de la plupart d'entre elles. L'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) a classé seulement quelques molécules de la série des 2C ainsi que d'autres drogues comme la famille des cathinones (arrêté du 27 juillet 2012). Mais une grande partie de ces drogues de synthèse n'est toujours pas réglementée, c'est le cas pour la 2C-P, la 2C-T-4, la 2C-E et la 5-MeO-DALT.

Cette consommation de substances de synthèse facilement accessibles en e-commerce ou dispensées dans les soirées festives semble donc en augmentation avec toujours plus de nouvelles substances peu ou non connues des laboratoires d'analyses toxicologiques et dans certains cas non disponibles sous forme de substances de référence.

Il est donc important pour les laboratoires de toxicologie, avec l'aide des Centres Antipoison, d'accumuler des données, telles que celles présentées dans ce rapport. Celles-ci vont constituer autant d'informations pour l'ANSM, à côté de celles recueillies par l'OFDT (Observatoire Français des Drogues et Toxicomanies) par ses

dispositifs TREND (Tendances Récentes et Nouvelles Drogues) ou SINTES (Système d'Identification National des Toxiques et Substances) ou encore par la MILDECA (Mission interministérielle de lutte contre les drogues et les conduites addictives, ex-MILDT), afin d'envisager un éventuel classement de ces molécules en tant que stupéfiant.

BIBLIOGRAPHIE

- Ambach, L., Hernández Redondo, A., König, S., & Weinmann, W. (2014). Rapid and simple LC-MS/MS screening of 64 novel psychoactive substances using dried blood spots. *Drug Testing and Analysis*, 6(4), 367–375.
- Ambrose, J., Bennett, H., Lee, H., & Josephson, S. (2010). Cerebral vasculopathy after 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine ingestion. *The Neurologist*, 16(3), 199–202.
- Carmo, H, de Boer, D, Remião, F, Carvalho, F, dos Reys, L. a, & de Lourdes Bastos, M. (2004). Metabolism of the designer drug 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in mice, after acute administration. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 811(2), 143–52.
- Carmo, H., Hengstler, J. G., de Boer, D., Ringel, M., Remião, F., Carvalho, F., de Lourdes Bastos, M. (2004). Metabolic pathways of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B): analysis of phase I metabolism with hepatocytes of six species including human. *Toxicology*, 206, 75–89.
- Coppola, M., & Mondola, R. (2012). “Synthetic cathinones: Chemistry, pharmacology and toxicology of a new class of designer drug of abuse marketed as “bath salts” or “plant food.” *Toxicology Letters*, 211, 144–149.
- Corkery, J. M., Durkin, E., Elliott, S., Schifano, F., & Ghodse, a H. (2012). The recreational tryptamine 5-MeO-DALT (N,N-diallyl-5-methoxytryptamine): a brief review. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 39(2), 259–62.
- Curtis, B., Kemp, P., Choi, C., & Christensen, D. (2003). Postmortem Identification and Quantitation Using GC-MSD and GC-NPD *. *Journal of Analytical Toxicology*, 27(7), 493–498.
- Dingeon, B., Dreyfuss, M.-F., Gaillard, Y., Le Bouil, A., Lhermitte, M., Mazzega, S., ... Deveaux, M. (2005). Aide à la validation des méthodes en Toxicologie et Suivi Thérapeutique Pharmacologique. *Annales de Toxicologie Analytique*, 17(3), 1–20.
- Dowd, C. ., Herrick-Davis, K., Egan, C., DuPre, A., Smith, C., Teitler, M., & Glennon, R. . (2000). 1-[4-(3-Phenylalkyl)phenyl]-2-aminopropanes as 5-HT(2A) partial agonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(16), 3074–3084.
- Drees, J. C., Stone, J. A., & Wu, A. H. B. (2009). Morbidity involving the hallucinogenic designer amines MDA and 2C-I. *Journal of Forensic Sciences*, 54(6), 1485–1487.

- Férec, S., Bretaudeau-Deguigne, M., Lelièvre, B., Boels, D., Bruneau, C., Leborgne, I., Turcant, A. (2013). Expositions récréatives de 8 patients aux nouvelles drogues de synthèse obtenues sur Internet: à propos de 3,4-méthylènedioxyprovalérone (MDPV) et de méthoxétamine (MXE). *Annales de Toxicologie Analytique*, 25(2).
- Funel, M. (2013). Liste des substances classées comme stupéfiants en France. *Journal Officiel*, 1–9.
- Habrdova, V, Peters, F, T., Theobald, D. S., & Maurer, H. H. (2005). Screening for and validated quantification of phenethylamine-type designer drugs and mescaline in human blood plasma by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(6), 785–795.
- Ishida, T., Kudo, K., Inoue, H., Tsuji, A., Kojima, T., & Ikeda, N. (2006). Rapid screening for and simultaneous semiquantitative analysis of thirty abused drugs in human urine samples using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 30(7), 468–77.
- Jovel, A., Felthous, A., & Bhattacharyya, A. (2013). Delirium Due to Intoxication from the Novel Synthetic Tryptamine 5-MeO-DALT. *Journal of Forensic Sciences*, 59(1), 1–3.
- Kamata, T., Katagi, M., & Tsuchihashi, H. (2010). Metabolism and toxicological analyses of hallucinogenic tryptamine analogues being abused in Japan. *Forensic Toxicology*, 28(1), 1–8.
- Kanamori, T., Kuwayama, K., Tsujikawa, K., Miyaguchi, H., Iwata, Y., & Inoue, H. (2011). Synthesis and identification of urinary metabolites of 4-iodo-2,5-dimethoxyphenethylamine. *Journal of Forensic Sciences*, 56(5), 1319–1323.
- Kanamori, T., Tsujikawa, K., Ohmae, Y., Iwata, Y. T., Inoue, H., Kishi, T., Inouye, Y. (2005). A study of the metabolism of methamphetamine and 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in isolated rat hepatocytes. *Forensic Science International*, 148(2-3), 131–137.
- Kerrigan, S., Banuelos, S., Perrella, L., & Hardy, B. (2011). Simultaneous detection of ten psychedelic phenethylamines in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 35(7).
- Kerrigan, S., Mott, A., Jatzlau, B., Ortiz, F., Perrella, L., Martin, S., & Bryand, K. (2014). Designer psychostimulants in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Forensic Sciences*, 59(1), 175–183.
- Kikura-Hanajiri, R., Hayashi, M., Saisho, K., & Goda, Y. (2005). Simultaneous determination of nineteen hallucinogenic tryptamines/ β -calbolines and phenethylamines using gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–electrospray ionisation-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 825(1), 29–37.

- Lahaie, E., & Martinez, M. (2014). *Nouveaux produits de synthèse identifiés en France depuis 2000* (pp. 1–2).
- Leroux, G. (2013). *Intoxications aiguës aux phénéthylamines : Étude rétrospective au Centre Antipoison d'Angers*. Angers.
- Lood, Y., Eklund, A., & LeBeau, M. (2004). Abstract Book of the 43rd International SOFT/TIAFT Meeting in Washington. *TIAFT2004*, 115.
- Matuszewski, B., Constanzer, M., & Chavez-Eng, C. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75(13), 3019–3030.
- Maurer, H. H. (2010). Chemistry, pharmacology and metabolism of emerging drugs of abuse. *The Drug Monit*, 32(5), 544–549.
- Meyer, M. R., Caspar, A., Brandt, S. D., & Maurer, H. H. (2014). A qualitative/quantitative approach for the detection of 37 tryptamine-derived designer drugs, 5 β -carbolines, ibogaine, and yohimbine in human urine and plasma using standard urine screening and multi-analyte approaches. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(1), 225–37.
- Meyer, M. R., Robert, A., & Maurer, H. H. (2014). Toxicokinetics of novel psychoactive substances: Characterization of N-acetyltransferase (NAT) isoenzymes involved in the phase II metabolism of 2C designer drugs. *Toxicology Letters*, 227(2), 124–128.
- Miyajima, M., Matsumoto, T., & Ito, S. (2008). 2C-T-4 intoxication: acute psychosis caused by a designer drug. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 62(2), 243.
- Nagai, F., Nonaka, R., & Satoh Hisashi Kamimura, R. (2007). The effects of non-medically used psychoactive drugs on monoamine neurotransmission in rat brain. *European Journal of Pharmacology*, 559(2-3), 132–137.
- Nakazono, Y., Tsujikawa, K., Kuwayama, K., Kanamori, T., Iwata, Y., Miyamoto, K., Inoue, H. (2014). Simultaneous determination of tryptamine analogues in designer drugs using gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, 32(1), 154–161.
- Nonaka, R., Nagai, F., Ogata, A., & Satoh, K. (2007). In vitro screening of psychoactive drugs by [(35)S]GTPgammaS binding in rat brain membranes. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30(12), 2328–2333.
- Pichini, S., Pujadas, M., Marchei, E., Pellegrini, M., Fiz, J., Pacifici, R., de la Torre, R. (2008). Liquid chromatography-atmospheric pressure ionization electrospray mass spectrometry determination of “hallucinogenic designer drugs” in urine of consumers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47, 335–342.

- Rohanová, M., Páleníček, T., & Balíková, M. (2008). Disposition of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) and its metabolite 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenethylamine in rats after subcutaneous administration. *Toxicology Letters*, 178(1), 29–36.
- Sacks, J., Ray, M. J., Williams, S., & Opatowsky, M. J. (2012). Fatal toxic leukoencephalopathy secondary to overdose of a new psychoactive designer drug 2C-E (“Europa”). *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*, 25(4), 374–376.
- Sciex AB. (2010). *API 4000™ LC/MS/MS System Hardware Manual* (p. 110).
- Shulgin, A., & Shulgin, A. (1991). *Pihkal: A chemical love story* (Transform ., p. 978). Berkeley, California.
- Soares, M. E., Carvalho, M., Carmo, H., Remião, F., Carvalho, F., & Bastos, M. L. (2004). Simultaneous determination of amphetamine derivatives in human urine after SPE extraction and HPLC-UV analysis. *Biomedical Chromatography*, 18(2), 125–131.
- Sullivan, J., McDonnell, L., Hardiman, O., Farrell, M., Phillips, J., & Tipton, K. (1986). The oxidation of tryptamine by the two forms of monoamine oxidase in human tissues. *Biochemical Pharmacology*, 35(19), 3255–3260.
- Takahashi, M., Nagashima, M., Suzuki, J., Seto, T., Yasuda, I., & Yoshida, T. (2009). Creation and application of psychoactive designer drugs data library using liquid chromatography with photodiode array spectrophotometry detector and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 77(4), 1245–72.
- Theobald, D. S., Fritschi, G., & Maurer, H. H. (2006). Studies on the toxicological detection of the designer drug 4-bromo-2,5-dimethoxy-beta-phenethylamine (2C-B) in rat urine using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 846(1-2), 374–377.
- Theobald, D. S., & Maurer, H. H. (2006). Studies on the metabolism and toxicological detection of the designer drug 4-ethyl-2,5-dimethoxy-beta-phenethylamine (2C-E) in rat urine using gas chromatographic-mass spectrometric techniques. *Journal of Chromatography B*, 842(2), 76–90.
- Theobald, D. S., Staack, R. F., Puetz, M., & Maurer, H. H. (2005a). New designer drug 2,5-dimethoxy-4-ethylthio-beta-phenethylamine (2C-T-2): studies on its metabolism and toxicological detection in rat urine using gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(9), 1157–1172.
- Theobald, D. S., Staack, R. F., Puetz, M., & Maurer, H. H. (2005b). New designer drug, 2,5-dimethoxy-4-propylthio-beta-phenethylamine (2C-T-7): studies on its metabolism and toxicological detection in rat urine using gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(1), 105–116.

- Van Vrancken, M. J., Benavides, R., & Wians, F. H. (2013). Identification of designer drug 2C-E (4-ethyl-2, 5-dimethoxy-phenethylamine) in urine following a drug overdose. *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*, 26(1), 58–61.
- Vorce, S. P., & Sklerov, J. H. (2004). A General Screening and Confirmation Approach to the Analysis of Designer Tryptamines and Phenethylamines in Blood and Urine Using, 28, 2–5.
- Wohlfarth, A., Weinmann, W., & Dresen, S. (2010). LC-MS/MS screening method for designer amphetamines, tryptamines, and piperazines in serum. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(7), 2403–2414.
- Zuba, D., Sekuła, K., & Buczek, A. (2012). Identification and characterization of 2,5-dimethoxy-4-nitro- β -phenethylamine (2C-N)--a new member of 2C-series of designer drug. *Forensic Science International*, 222(1-2), 298–305.