

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

DÉVELOPPEMENT, VALIDATION ET APPLICATION D'UN NOUVEAU CADRE
D'ANALYSE POUR LES NOUVELLES SUBSTANCES PSYCHOACTIVES
PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE
À UN SPECTROMÈTRE DE MASSE EN TANDEM

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

PAR
BÉATRICE GARNEAU

JUILLET 2021

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

REMERCIEMENTS

Les premiers remerciements vont à mes directeurs de recherche Pr André Lajeunesse et Pascal Mireault pour m'avoir donné l'opportunité en or de faire partie de leur équipe et de travailler sur un projet aussi intéressant et pertinent.

Merci également au Centre international de criminologie comparé (CICC) pour la bourse de diffusion à l'international qui m'a permis de présenter les résultats de mes recherches au TIAFT 2019 à Birmingham, une expérience enrichissante!

Brigitte Desharnais : Mentor extraordinaire, collègue, amie, tu as tenu tous ces rôles depuis le début et bien plus! Tu m'as poussé chaque jour à donner le meilleur de moi-même et à saisir les opportunités de m'améliorer. Grâce à toi, ma maîtrise a été remplie de nouveaux défis, d'apprentissages, de réussites... Je sors grandie de ces années à tes côtés, comme jeune chercheuse, mais aussi comme personne. Tu es inspirante, merci pour tout!

Merci à toute l'équipe du département de toxicologie du LSJML! Comment vous décrire...une équipe du tonnerre, efficace, motivée, enjouée. Merci pour les longues réunions, les remarques et les commentaires qui ont contribué à faire de ce projet une réussite. Vous êtes maintenant une deuxième famille pour moi.

Papa, maman, frerot, Marie, Vincent merci de m'avoir toujours appuyé, même dans les moments difficiles. Il y a un peu de vous dans tout ce travail car aujourd'hui je peux dire que cette étape de ma vie est complétée grâce à votre soutien, votre écoute, votre positivisme, vos conseils et vos encouragements.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	vii
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS.....	viii
RÉSUMÉ	ix
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I CADRE THÉORIQUE	2
1.1 Nouvelles substances psychoactives : définition, historique et législations	2
1.2 Classification des nouvelles substances psychoactives	6
1.3 Prévalence et utilisation dans le monde	9
1.4 Les méthodes analytiques couramment utilisées en toxicologie..	14
1.5 Schéma d'analyse au laboratoire de sciences judiciaires et de médecine légale (LSJML).....	14
1.6 Problématiques et défis liés aux NSP.....	17
1.7 Objectifs du projet de recherche.....	23
CHAPITRE II DÉFIS RELIÉS À TROIS CAS D'INTOXICATIONS FATALES IMPLIQUANT PLUSIEURS NOUVEAUX OPIOÏDES DE SYNTÈSE	26
2.1 Préambule	26
2.2 Article scientifique (Full paper)	29
2.2.1 Abstract.....	31
2.2.2 Introduction	31
2.2.3 Methods	33

2.2.4	Results	35
2.2.5	Discussion	41
2.2.6	Conclusions	44
2.2.7	Acknowledgements	44
CHAPITRE III UN PROCESSUS ANALYTIQUE COMPLET, DE LA DÉTECTION D'UNE NPS À SON DÉPISTAGE SYSTÉMATIQUE : VALIDATION DE MÉTHODE ET ÉTUDE DE PRÉVALENCE		45
3.1	Préambule	45
3.2	Article scientifique (full paper)	49
3.2.1	Abstract	51
3.2.2	Introduction	51
3.2.3	Materials and methods	55
3.2.4	Results and Discussion	72
3.2.5	Conclusions	88
CONCLUSION		91
BIBLIOGRAPHIE		94

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Structures chimiques du fentanyl et de ses analogues détectés aux États-Unis de 1981 à 1984 au cours de la première vague de NSP.....	4
1.2 Répartition des saisies de NSP rapportées par l'UNODC de 2009 à 2019 selon la catégorie psychopharmacologique.....	10
1.3 Schéma analytique utilisé au LSJML.....	18
2.1 Case 3 powder analysis	38
3.1 Chromatographic gradient.....	57
3.2 Overlay chromatogram for a 20 ng/mL reference sample in blood (except for remifentanyl at 30 ng/mL).....	58
3.3 Common drugs and drugs of abuse analytical process.....	74
3.4 Chromatographic separation and fragmentation of cis-3-methylfentanyl (A), isobutyrylfentanyl (B) and butyrylfentanyl (C)	82
3.5 Occurrences of the ten most detected NPS	84
3.6 Detection occurrences over time for three benzodiazepine-type NPS..	86

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Classification des nouvelles substances psychoactives	7
1.2 Exemple de classification multidimensionnelle de certains NSP de classe dépresseur au Canada.....	9
2.1 Structures chimiques génériques des différents groupes de NOS	27
2.2 Analytical findings in each fatality.....	39
3.1 Mass spectrometry parameters for individual analytes.....	59
3.2 Sample set-up for the validation of the addition of a new compound to the method	69
3.3 Summary of the validation results	78

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

EMCDDA	Observatoire européen des drogues et des toxicomanies
GC-MS masse	Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de
GC-MS/MS	Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse en tandem
HRMS	Spectromètre de masse à haute résolution
ISO	Organisation internationale de normalisation
LC-MS masse	Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem
LSJML	Laboratoire de sciences judiciaires et de médecine légale
MRM	Multiple reaction monitoring
NOS	Nouveaux opioïdes de synthèse
NSO	Novel synthetic opioids
NPS	New psychoactive substances
NSP	Nouvelles substances psychoactives
ONUDD/UNODC	Office des Nations Unies contre la drogue et le crime

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

% (v : v)	Pourcentage volume : volume
% (wt : wt)	Pourcentage poids : poids
°C	Degré Celsius
μL	Microlitre
μm	Micromètre
eV	Électron-volts
cm	Centimètre
h	Heure
kg	Kilogramme
m/z	Masse sur charge
mg	Milligramme
mL	Millilitre
mm	Millimètre
ng	Nanogramme
V	Volt

RÉSUMÉ

Les nouvelles substances psychoactives (NSP) sont des drogues émergentes récemment accessibles pour les consommateurs. Elles posent de nombreuses problématiques au niveau de leur contrôle législatif, de la santé publique et de leur détection et surveillance dues à la quasi-absence de données à leur sujet et à la rapidité à laquelle elles évoluent. Les laboratoires de toxicologie doivent pouvoir détecter les NSP afin de dresser un portrait clair de la consommation dans une région donnée. Cependant, les nombreux défis analytiques et opérationnels que posent ces substances demandent une approche différente en comparaison aux autres drogues dites traditionnelles. Le présent projet de recherche vise à développer un processus analytique qui répond aux exigences particulières des NSP en trois parties : une méthode d'analyse ciblant 57 NSP et métabolites (32 nouveaux opioïdes de synthèse et 22 de leurs métabolites ainsi que 3 nouvelles benzodiazépines de synthèse) par LC-MS/MS, un système de surveillance pour détecter les NSP en émergence, ainsi qu'un mécanisme accrédité d'ajout et de retrait rapide de composés dans la méthode LC-MS/MS. La méthodologie développée assure un dépistage systématique de tous les dossiers traités par le Laboratoire de sciences judiciaires et de médecine légale (LSJML) dans le but de produire le premier portrait de la prévalence des NSP dans la province de Québec (Canada). Sur une période d'un an, 5 079 dossiers judiciaires ont été analysés à l'aide de ce nouveau processus. Parmi ces dossiers, 3,4% se sont révélés positifs à au moins une NSP. Les benzodiazépines de synthèse et les nouveaux opioïdes de synthèse étaient impliqués dans respectivement 94% et 5% de ces cas. Deux NSP en émergence ont également été détectées et ajoutées avec succès à la méthode. Ce processus combinant haute efficacité, instrumentation simple, accréditation selon la norme ISO 17025 et réponse rapide aux nouvelles tendances en matière de NSP a eu pour résultat d'augmenter d'un facteur de quatre les instances de détection des NSP par rapport à l'ancienne méthodologie.

Mots clés : nouvelle substance psychoactive, dépistage par LC-MS/MS, nouveau opioïde de synthèse, nouvelle benzodiazépine de synthèse

INTRODUCTION

L'interconnectivité et l'augmentation des moyens de production, d'exportation et de vente ont conduit à une croissance constante du marché de la drogue au XX^e siècle (EMCDDA, 2019; ONUDC, 2020b). Du même souffle, les lois, règlements et autres restrictions pour contrôler ce marché noir se sont multipliés. Pourtant, la demande n'a pas diminué. Au contraire, le marché de la drogue n'a cessé de croître et de s'adapter aux actions juridiques, politiques et sanitaires mises en place. Un « jeu du chat et de la souris » s'est engagé entre les trafiquants et les autorités dans les années 2000 avec l'accélération exponentielle de l'apparition des nouvelles substances psychoactives (NSP). Ces drogues émergentes, de toutes classes et structures chimiques confondues, s'apparenteraient même selon certains à l'incarnation de l'hydre de Lerne, monstre aux multiples têtes de la mythologie grecque (Helander et Bäckberg, 2017).

CHAPITRE I

CADRE THÉORIQUE

1.1 NOUVELLES SUBSTANCES PSYCHOACTIVES : DÉFINITION, HISTORIQUE ET LÉGISLATIONS

La définition aujourd'hui généralement acceptée des NSP est celle énoncée par l'Office des Nations Unies contre la drogue et le crime (ONU DC) et l'Observatoire européen des drogues et des toxicomanies (EMCDDA) : « substances dont il est fait abus, consommées pures ou sous la forme de préparations, qui ne sont contrôlées ni par la *Convention unique sur les stupéfiants de 1961* ni par la *Convention sur les substances psychotropes de 1971*, mais qui peuvent toutefois représenter une menace de santé publique » (EMCDDA, 2020; ONU DC, 2020c). Dans cette définition, le terme « nouvelle » ne fait pas référence à des composés qui n'ont jamais été découverts précédemment, mais plutôt au fait que ces composés sont maintenant disponibles et utilisés de manière récréative (ONU DC, 2020c).

Sur le marché de la drogue, les NSP peuvent être décrites comme étant des substances sans danger ou non destinées à la consommation humaine (« sels de bain », « research chemicals », « herbal incense », « aphrodisiac tea », « plant food », « spice », « legal highs »). Souvent dans des emballages colorés à l'allure inoffensive et publicisées comme « légales », les NSP peuvent être perçues par

les consommateurs comme des drogues moins dangereuses ou même sécuritaires. Parallèlement, les NSP se retrouvent également parfois comme adultérant de substances plus traditionnelles ou carrément en remplacement de celle-ci. Elles sont donc consommées à l'insu de l'utilisateur, seules ou mélangées à d'autres drogues, ce qui augmente grandement les risques d'intoxications.

Le phénomène des NSP est devenu particulièrement problématique au XXI^e siècle, mais son origine remonte aux premiers efforts de contrôle international des drogues dans les années 1960 et 1970. La *Convention unique sur les stupéfiants de 1961* et la *Convention sur les substances psychotropes de 1971* ont regroupé et remplacé les multiples traités émis entre 1912 et 1953. Leur importance réside dans le fait qu'elles énonçaient pour la première fois le mécanisme par lequel les états signataires (dont le Canada) pouvaient rapporter une substance qui n'était pas encore soumise au contrôle international. À partir de ce moment et encore aujourd'hui, les nouvelles drogues font l'objet d'une attention particulière. Leur émergence est rapportée aux Nations-Unis qui choisit, après une revue scientifique des risques et des potentiels bienfaits, de les ajouter ou non au contrôle international. Ces conventions internationales étaient donc le balbutiement d'un effort concerté de réglementation et de classification des drogues traditionnelles et émergentes, mais aussi la reconnaissance que le marché de la drogue est un phénomène mondial et non plus seulement régional.

C'est l'apparition aux États-Unis de plusieurs analgésiques narcotiques analogues au fentanyl dans les années 1980 qui a causé les premières grandes inquiétudes face à des drogues émergentes (Baum, 1985; Kram *et al.*, 1981). Vendus comme de l'héroïne, ou comme adultérant de celle-ci, et étant beaucoup plus puissants, ces opioïdes synthétiques ont provoqué une vague d'intoxications qui s'est soldée par plus de 100 décès en Californie (Henderson, 1991).

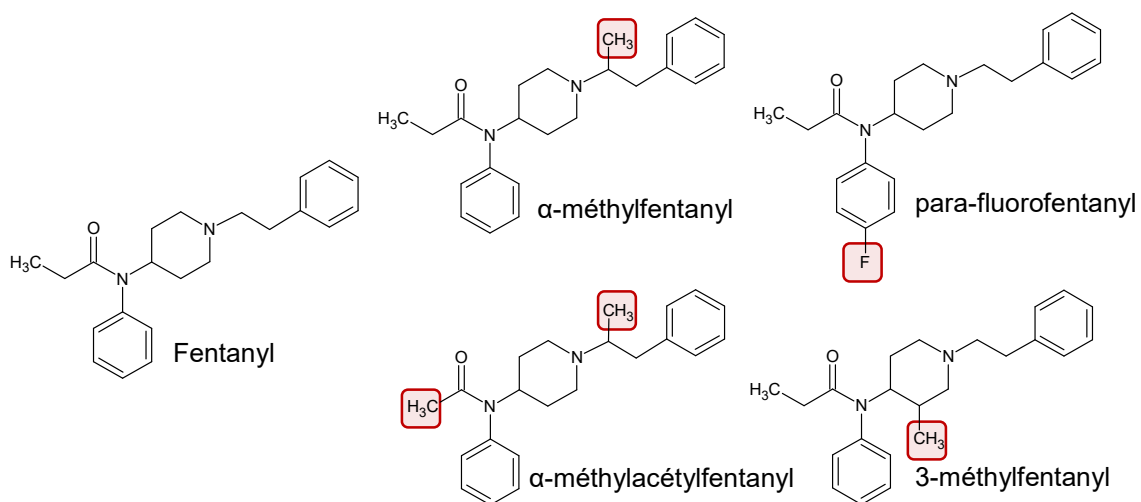


Figure 1.1 Structures chimiques du fentanyl et de ses analogues détectés aux États-Unis de 1981 à 1984 au cours de la première vague de NSP (adaptée de Baum (1985)).

C'est à ce moment que le terme « designer drug », qui peut se traduire par drogue de confection, a été énoncé pour la première fois pour décrire le phénomène (Baum, 1985; Brandt *et al.*, 2014). Le mot « designer » réfère au fait que les drogues sont synthétisées avec un but précis : produire un composé ayant des effets semblables à une substance contrôlée, mais qui ne serait régi par aucune législation internationale (Baum, 1985).

Les années 1990 ont été caractérisées par la prolifération de ces « designer drugs » aux propriétés stimulantes, hallucinogènes ou entactogènes (c'est-à-dire qui amplifie le désir de contact avec autrui et la capacité d'empathie). Elles sont principalement des analogues des phénéthylamines, dérivées des amphétamines, et les tryptamines, imitant les effets du LSD et de la psilocine (ingrédient actif des « champignons magiques ») (King, 2013; King et Kicman, 2011). Cette prolifération de composés et le désir d'éviter les disparités législatives entre les pays de l'Union européenne a donné naissance à l'*Action commune sur les nouvelles drogues de synthèse de 1997*. Une nouvelle expression pour définir ce

que l'on considère aujourd'hui comme des NSP est utilisée : « New synthetic drugs ». Cependant, cette expression exclut notamment les NSP non synthétiques extraites de plantes qui gagnaient en popularité. De fait, elle ne sera pas largement utilisée (Brandt *et al.*, 2014).

Au tournant des années 2000, un changement de cap majeur dans l'élaboration des nouvelles drogues a été observé. Des composés précédemment synthétisés comme potentiels agents thérapeutiques, mais non commercialisés par l'industrie pharmaceutique ou « failed pharmaceuticals », sont redécouverts. Cela entraîne l'apparition successive de plusieurs nouvelles classes de NSP : d'abord les pipérazines (dont les populaires BZP et TFMPP), et les agonistes synthétiques des récepteurs cannabinoïdes (plus communément appelé cannabinoïdes synthétiques). D'autres stimulants dérivés de la cathinone, le principe actif du khat, une plante indigène (King et Kicman, 2011), sont ensuite apparus et ont été commercialisés sous le nom de « bath salt ». Plus tard, les analogues de fentanyl ont fait un retour en force principalement en Amérique du Nord. Ils sont accompagnés d'autres NSP qui ciblent les récepteurs opioïdes, mais à la structure différente, les benzamides et les benzimidazoles. Rassemblés sous l'appellation nouveaux opioïdes de synthèse (NOS), ils s'insèrent dans ce qu'on appelle « la crise des opioïdes » et font augmenter le nombre déjà important de décès. Finalement, les benzodiazépines de synthèse, analogue des benzodiazépines de prescription, font partie de la dernière catégorie à avoir vu le jour devenant l'une des classes en expansion rapide.

C'est finalement en 2005, dans la décision 2005/387/JAI du *Conseil de l'Union européenne* que s'est cristallisée l'utilisation de l'appellation « nouvelles substances psychoactives » pour décrire le phénomène. Ce nouveau dénominateur a volontairement une portée plus large et englobe autant les « designer drugs », les produits d'échecs pharmaceutiques que les psychotropes naturels extraits de plantes ou d'animaux (Measham et Newcombe, 2016).

1.2 CLASSIFICATION DES NOUVELLES SUBSTANCES PSYCHOACTIVES

La définition volontairement large des NSP a eu pour effet de créer un groupe particulièrement hétérogène de substances. Elles peuvent être divisées en de nombreuses catégories selon l'angle d'analyse : la structure chimique, la source, leur statut légal ou leurs effets psychopharmacologiques.

La classification utilisée dans la Section 1.1 est principalement basée sur la structure chimique. Des composés ayant le même cœur structurel, mais dont les groupements fonctionnels sont modifiés font donc partie de la même catégorie : les phénéthylamines, les tryptamines, les pipérazines, les phencyclidines et les aminoindanes en sont les principaux exemples (ONU DC, 2020c).

Les NSP peuvent aussi être distinguées selon leur source, soit naturelle ou synthétique. Les NSP naturelles peuvent provenir de plantes (ex. kratom, salvia, kava) ou d'un animal (ex. sécrétions de la peau de crapaud géant) (Measham et Newcombe, 2016). De manière analogue, les NSP synthétiques peuvent être séparées selon leur nature semi-synthétique (d'abord extraite d'une source naturelle puis modifiées chimiquement) ou entièrement synthétique (Measham et Newcombe, 2016).

Bien que la définition généralement acceptée d'une NSP requiert qu'elle ne soit pas contrôlée selon les conventions internationales de 1961 et de 1971, certaines NSP ont été intégrées à d'autres règlements de niveau national. Cela permet donc leur taxonomie selon leur statut légal. Cette classification est spécifique à chaque pays et évolue constamment dans le temps, au fur et à mesure que de nouvelles substances apparaissent et sont contrôlées.

Finalement, les NSP peuvent être classées selon leurs effets psychopharmacologiques. Cette classification est moins catégorique que d'autres, notamment parce que les effets d'une substance peuvent varier en fonction de l'individu, de la dose absorbée, du mode de consommation, de la présence d'autres substances et du contexte dans lequel elle est consommée. Cependant, elle permet d'avoir une compréhension générale des effets recherchés, des potentiels effets secondaires et des risques associés à sa consommation. Les principales classes sont les stimulants, les agonistes synthétiques des récepteurs cannabinoïdes, les hallucinogènes, les opioïdes, les dissociatifs, les sédatifs et les hypnotiques (ONU DC, 2019a, 2019b, 2020a).

Tableau 1.1 Classification des nouvelles substances psychoactives.

Classifications	Classes	Exemples
Structure chimique	Phénéthylamine	4-FMA, 2-CB-Fly
	Tryptamine	5-MeO-DIPT, 5-MeO-AMT
	Pipérazine	BZP, TFMPP, MBZP
	Phencyclidine	3-MeO-PCE, 4-MeO-PCP
	Aminoindane	MDAI, 5-IAI, 2-AI
Source	Naturelle	Kratom, Salvia, Kava,
	Semi-synthétique	Desomorphine
	Synthétique	Analogues de fentanyl
Statut légal (au Canada)	Contrôlé	Flualprazolam, Étizolam, Flubromazolam
	Non-contrôlé	Kratom
Effets psychopharmacologiques	Stimulant	MDAI, 5-IAI, 2-AI, 4-FMA, 2-CB-Fly, BZP, TFMPP
	Agoniste synthétique des récepteurs cannabinoïdes	JWH-018, AB-PINACA
	Hallucinogène	5-MeO-DIPT, 5-MeO-AMT
	Opioïde	Analogues de fentanyl
	Dissociatif	3-MeO-PCE, 4-MeO-PCP
	Sédatif et hypnotique	Flubromazolam, étizolam, flualprazolam

Dans les dernières années, l'expansion du phénomène des NSP, leur définition très large ainsi que les multiples méthodes de classement ont contribué à une certaine confusion (Measham et Newcombe, 2016). Comme exemple, le GHB, ajouté aux conventions internationales en 2001 et utilisé en abus depuis les années 1990, est techniquement une NSP. Cependant, sa grande prévalence comme drogue récréative depuis plusieurs années dans certaines régions (ex. province de Québec) fait qu'il n'est pas considéré comme tel à ces endroits. Measham et Newcombe (2016) proposent donc une classification multidimensionnelle qui tient compte à la fois des effets psychopharmacologiques, de la structure chimique et de leur niveau de contrôle. Bien que peu utilisée par des organismes réglementaires comme l'ONUJDC et l'EMCDDA, cette classification a le mérite d'être claire, structurée, évolutive et adaptable à la région d'intérêt discutée.

Tableau 1.2 Exemple de classification multidimensionnelle de certains NSP de classe dépresseur au Canada (adaptée de Measham et Newcombe (2016)).

Effets psychopharmacologiques		Structure chimiques		Contrôle au Canada
Classe	Famille	Groupe	NSP	
Dépresseurs	Sédatif	Benzodiazépines	Flualprazolam	Annexe IV
			Étizolam	Annexe IV
			Flubromazolam	Annexe IV
	Sédatif	GHB et analogue	GHB GBL	Annexe I
				Annexe VI
	Analgésique	Kavalactones	Méthysticine Kavain	Non contrôlé
				Non contrôlé
Analgésique	Opioïdes – Analogue de fentanyl	Acétylfentanyl 3-méthylfentanyl Para-fluorofentanyl	Annexe I	
			Annexe I	
			Annexe I	
Analgésique	Opioïdes – Benzamides	U-47700 U-51754 U-48800	Annexe I	
			Annexe I	
			Annexe I	
Analgésique	Opioïdes – Benzimidazoles	Isotonitazène Étonitazène	Annexe I	
			Annexe I	
Analgésique	Autres opioïdes	MT-45 AH-7921	Annexe I	
			Annexe I	
Analgésique	Composés actifs du Kratom	Mitragynine 7-hydroxymitragynine	Non contrôlé	
			Non contrôlé	

1.3 PRÉVALENCE ET UTILISATION DANS LE MONDE

L'élaboration d'un portrait de la prévalence des NSP à l'échelle mondiale est complexe, notamment parce que la collecte de données n'est ni uniforme, ni complète. En effet, les substances incluses dans les méthodes de dépistage et la capacité de procéder à un dépistage systématique varient grandement d'un laboratoire à l'autre selon la portée de leur mission, leur financement et les dossiers qui leur sont soumis. En l'absence de données fiables sur leur détection

à la source par les laboratoires, le phénomène des NSP est donc extrêmement difficile à cerner. Néanmoins, l'agrégation des données sur les saisies de NSP ainsi que leur prévalence dans les cas cliniques et toxicologiques permet de dégager des constats globaux qui permettent de mieux comprendre la situation.

Depuis la première saisie de NSP signalée à l'ONU DC en 2001, les quantités de saisies ont augmenté d'un facteur 400 (ONU DC, 2019b). En 2014, l'organisme a déclaré que le phénomène était maintenant répandu sur l'entièreté du globe (ONU DC, 2014). Toutefois, pour l'année 2016-2017, les NSP ne représentaient seulement que 3% du nombre total de saisies de drogues rapportées, réparties de la façon suivante dans les différentes classes psychopharmacologiques (ONU DC, 2019b).

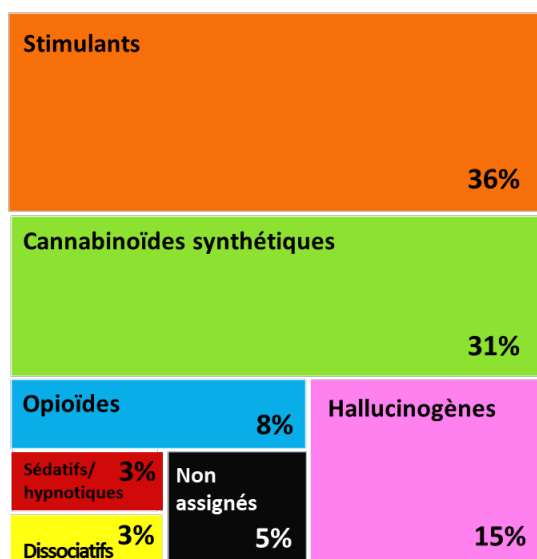


Figure 1.2 Répartition des saisies de NSP rapportées par l'UNODC de 2009 à 2019 selon la catégorie psychopharmacologique (adaptée de ONU DC (2019b)).

Depuis peu, les organismes de surveillance rapportent une stabilisation ou même une diminution des NSP rapportées et saisies (EMCDDA, 2019; ONU DC, 2019b,

2020b). À partir de 2009 le nombre de NSP différentes rapportées à l'UNODC ont augmenté de manière fulgurante d'année en année. Cependant, ce nombre plafonne maintenant à un peu plus de 500 par année depuis 2015 (ONUDC, 2020b). Les données européennes brossent un portrait similaire : un sommet de 101 NSP rapportées pour la première fois à l'EMCDDA a été atteint en 2014, mais était près de deux fois plus bas en 2018. Toutefois, même si le phénomène n'est plus en grande expansion à l'échelle mondiale, il est tout de même en constante évolution. Cela se traduit par la diversification des composés rapportés et la croissance de classes de NSP jusqu'ici plutôt marginales, telles que les opioïdes synthétiques et les benzodiazépines (EMCDDA, 2019).

D'autres études sur des cas cliniques (intoxications nécessitant des soins hospitaliers) tendent à confirmer les tendances observées au niveau des saisies. En Europe, l'EMCDDA rapportait en 2017 qu'à travers son réseau d'hôpitaux « sentinelles », 4% des intoxications traitées impliquaient des NSP. De son côté, le projet STRIDA en Suède, l'un des plus développés dans la lutte contre les NSP au niveau national, a procédé aux analyses de 2 626 cas suspectés d'intoxication à une NSP entre 2010 et 2016 (Helander *et al.*, 2020). Le nombre d'intoxications avérées à une NSP ainsi que le nombre de NSP distinctes détectées chaque année ont atteint un sommet en 2014-2015 avec une plus grande proportion de stimulants et d'agonistes synthétiques des récepteurs cannabinoïdes. De plus, une constante évolution des substances détectées est observée, souvent reliée à leur contrôle légal au pays (Helander et Bäckberg, 2017; Helander *et al.*, 2020; Helander *et al.*, 2013). Le nombre d'intoxications non mortelles et les NSP impliquées semblent donc refléter le portrait dressé par les saisies dans les dernières années.

La surveillance de ces substances dans les cas analysés en toxicologie est essentielle dans la lutte aux NSP et la compréhension du phénomène. Pourtant, elle est inégale et comprend peu d'études systématiques (EMCDDA, 2019). La

diffusion des connaissances prend plutôt la forme de multiples rapports de cas dans la littérature scientifique, ceux-ci parfois résumés dans des revues (Kraemer *et al.*, 2019; Logan *et al.*, 2017; Zawilska et Wojcieszak, 2019). Des quelques études systématiques recensées, une étude effectuée de 2010 à 2012 au Royaume-Uni a recensé 203 cas positifs sur tous les dossiers post-mortem analysés avec une nette augmentation de la prévalence annuelle au cours de l'étude (Elliott et Evans, 2014). Quant à eux, Vaiano, Fabio *et al.* (2019) rapportent 5,4% de cas positifs à au moins une NSP sur 111 cas d'intoxication étudiés depuis 2016. Du côté des dossiers de conduite avec les facultés affaiblies par la drogue, une étude systématique en Belgique en 2015 révèle un taux de positivité aux NSP de 7% dans les échantillons de sang et de 11 % dans les échantillons de liquide buccal (Wille *et al.*, 2018). Globalement, un constat commun aux cas cliniques et toxicologiques positifs pour des NSP est la forte concomitance de plusieurs substances (traditionnelles ou NSP) dans les matrices biologiques analysées.

En Amérique du Nord, aucun organisme n'a le mandat est de colliger et publier les données concernant les drogues d'abus pour tout le territoire comme l'EMCDDA le fait pour l'Union européenne. De plus, les NSP ne sont généralement pas traitées séparément des autres drogues d'abus. L'information est donc dispersée à travers les publications des différents organismes reliés au contrôle, la surveillance et la détection des NSP.

Aux États-Unis, *The Center for Forensic Science Research and Education* (CFSRE) collabore avec certaines agences d'application de la loi, la santé et la sécurité publique pour identifier et rapporter rapidement l'émergence de NSP associée avec des intoxications. Précédemment, les données rapportées se concentraient principalement sur les NOS et les agonistes synthétiques des récepteurs cannabinoïdes. Pour l'année 2019, respectivement 877 et 680 détections de ces substances ont été rapportées avec des changements marqués de prévalence d'un trimestre à l'autre (CFSRE, 2020). En 2020, la majorité des

détections rapportées par le CFSRE sont des NSP de type benzodiazépine (59% au deuxième trimestre). Environ un quart des dossiers traités rapporte la présence d'agonistes synthétiques des récepteurs cannabinoïdes. Une minorité de cas seulement rapporte des NSP de type stimulant, hallucinogène et opioïde (CFSRE, 2020).

Au Canada et dans la province de Québec, les données relatives aux NSP sont fragmentaires et proviennent presque exclusivement du Service d'analyse des drogues (SAD) de Santé Canada. Cet organisme est chargé de l'analyse des drogues saisies dans le pays, excluant celles faites aux frontières par l'Agence des services frontaliers du Canada dont les données ne sont pas publiées. Cette limitation des données disponibles est due au fait que très peu de laboratoires canadiens ont la capacité de détecter les NSP dans les matrices biologiques et publient leurs résultats. Malgré le fait que le SAD ne publie pas de données sur les NSP spécifiquement, le carfentanil est la NSP la plus saisie, installée en dixième place des principales substances contrôlées identifiées en 2018 (Canada, 2019). Cela n'est pas étranger à la crise des opioïdes qui sévit au pays depuis plusieurs années et qui a causé le décès de plus de 14 700 personnes depuis 2016 (Comité consultatif spécial sur l'épidémie de surdose d'opioïdes, 2020). Dans ce contexte, le SAD publie des données spécifiquement sur les nouveaux opioïdes de synthèse (NOS), des NSP qui ont exacerbé l'épidémie. Ceux-ci sont bien présents au Canada, notamment le cyclopropyl fentanyl, le furanyl fentanyl, l'U-47700 et le méthoxyacétyl fentanyl qui font partie des dix opioïdes les plus saisis en 2018. L'isotonitazène représente la dernière émergence d'un NOS rapporté. Ce NOS de type benzimidazole a été détecté pour la première fois mondialement en mars 2019 en Alberta et pour la première fois au Québec en janvier 2020.

La deuxième grande catégorie de NSP la plus détectée au Canada est les nouvelles benzodiazépines de synthèse. Leur présence a été remarquée,

principalement depuis 2018 dans la province de Québec où le flubromazolam prenait le 8^e rang des drogues les plus souvent saisies (Canada, 2019). Souvent commercialisé sous la forme de Xanax®, dont le véritable ingrédient actif est l'alprazolam, le flubromazolam a fait l'objet d'appel à la vigilance après plusieurs intoxications, la plupart chez des adolescents ou de jeunes adultes (Lampron-Goulet et Sainton, 2019).

Le portrait du phénomène des NSP dans une région dépend des données de différentes sources : les saisies de matériel ainsi que les données de cas cliniques et toxicologiques. C'est donc dire que le portrait des NSP au Canada et dans la province de Québec est incomplet, puisque seulement les données du SAD sur les saisies sont publiées périodiquement. Malgré cela, la situation canadienne et québécoise semble bien différente de ce qui est rapporté ailleurs dans le monde, où les stimulants et les agonistes des récepteurs cannabinoïdes sont les plus prévalents. Cette situation démontre les grandes différences régionales qui peuvent exister dans la disponibilité et la consommation des NSP. Pour remédier à ce manque de données, une détection efficace, complète et uniforme des NSP dans les laboratoires cliniques et toxicologiques canadiens est nécessaire.

1.4 LES MÉTHODES ANALYTIQUES COURAMMENT UTILISÉES EN TOXICOLOGIE

La pratique de la toxicologie nécessite la détection et la quantification d'une grande variété de composés différents (drogues, médicaments, composés organiques volatils, poisons, pesticides, etc.). Pour ce faire, une panoplie de techniques analytiques avancées ont été développées depuis le milieu du XX^e siècle. Néanmoins, la majorité des techniques utilisées en toxicologie aujourd'hui sont des méthodes immunologiques ou chromatographiques, ces dernières étant le plus souvent couplées à un spectromètre de masse (Drummer, 2010; Flanagan *et al.*, 2020).

Les méthodes immunologiques sont basées sur l'affinité entre un antigène (la drogue d'intérêt) et un anticorps (Flanagan *et al.*, 2020). Étant une méthode généralement non spécifique, les méthodes immunologiques sont principalement utilisées en toxicologie comme dépistage général afin d'orienter les analyses et doivent être confirmées par une deuxième technique plus spécifique (Drummer, 2010; Flanagan *et al.*, 2020).

Les méthodes qui combinent la chromatographie et la spectrométrie de masse sont maintenant largement utilisées dans la plupart des laboratoires toxicologiques (Drummer, 2010). La chromatographie permet la séparation des constituants d'un échantillon sur la base des interactions chimiques et physiques entre l'analyte, la phase stationnaire de la colonne chromatographique et la phase mobile gazeuse ou liquide (Skoog *et al.*, 2015). Un spectromètre de masse seul ou en tandem, couplé à la chromatographie, transforme l'effluent de la colonne chromatographique, incluant les analytes, en ions. Ces derniers sont ensuite séparés sur la base de leur ratio masse/charge puis détectés (Skoog *et al.*, 2015). Bien que la chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) ait longtemps été la plus populaire, la chromatographie liquide, spécialement celle couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS), est maintenant aussi largement utilisée (Drummer, 2010).

Le GC-MS avec ionisation par impact électronique doit sa popularité à sa capacité d'effectuer un dépistage général non ciblé. En effet, utilisé dans des conditions standardisées (ex. ionisation à 70 eV), il produit des spectres de masse extrêmement reproductibles permettant la recherche dans des bibliothèques de spectres centralisées. Cependant, un grand nombre de molécules thermiquement instables ou peu volatiles doivent être dérivatisées afin de permettre leur passage à l'état gazeux, ce qui complexifie la préparation des échantillons. Le LC-MS/MS, quant à lui, est plutôt utilisé pour des analyses ciblées et quantitatives. L'interface du spectromètre de masse avec la chromatographie liquide plutôt que gazeuse

permet la simplification des méthodes de préparation en évitant le recours à la dérivation. La détection de composé par spectromètre de masse en tandem est basée sur l'utilisation de deux quadripôles encadrant une cellule de collision dans laquelle un potentiel est appliqué afin de fragmenter de manière reproductible et spécifique le composé analysé. Il peut être utilisé en mode par balayage (spectre d'ions produits, spectre d'ion précurseur et spectre de perte neutre) ou en mode MRM (« multiple reaction monitoring »). Le mode MRM est celui qui permet d'atteindre la spécificité et sensibilité nécessaire à l'analyse des NSP. En effet, l'utilisation d'un premier quadripôle pour sélectionner la masse du composé attendu et du second pour sélectionner la masse de son fragment permet l'élimination de la plupart des interférences et du bruit de fond (Skoog *et al.*, 2015).

L'une des dernières avancées technologiques est le spectromètre de masse à haute résolution (HRMS) (souvent couplé à une chromatographie liquide). Ses avantages comprennent un dépistage général non ciblé, l'identification de composés basée sur leur masse exacte et l'analyse rétrospective de données. Cependant, sa sensibilité et sa capacité de traitement moindre que les LC-MS/MS en mode MRM, l'expertise pointue nécessaire couplée à son coût prohibitif en rend l'utilisation extrêmement complexe. Ainsi, malgré les grands avantages que procure cette technique, elle n'est toujours pas utilisée de manière étendue dans les laboratoires de toxicologie.

Les méthodes d'analyse chromatographique nécessitent la préparation des échantillons avant leur analyse. Les méthodes de préparation des échantillons les plus souvent utilisées sont l'extraction liquide-liquide (ELL) et l'extraction sur phase solide (ESP) (Moffat *et al.*, 2011; Labat, 2012). Elles utilisent les propriétés physicochimiques connues des intoxicants dans le but de les séparer de la matrice biologique complexe qui les contient. Certains prétraitements comme la

précipitation des protéines (PPT) ou l'élimination des phospholipides peuvent être ajoutés avant l'extraction ou être même utilisés seuls (Labat, 2012).

Les différentes méthodes analytiques présentées précédemment doivent ensuite être utilisées dans un algorithme d'analyse efficace et efficient. L'organisation la plus répandue en toxicologie consiste en un dépistage général non ciblé (plus souvent GC-MS ou méthodes immunochimiques), suivi de plusieurs méthodes quantitatives pour les différentes classes de substances détectées (GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS ou LC-MS/MS) (Drummer, 2010). Cependant, plusieurs méthodes ciblant et quantifiant plusieurs dizaines, voire centaines de composés, ont été publiées et tendent à remplacer l'utilisation de plusieurs méthodes restreintes. (Remane *et al.*, 2016). Les méthodes et algorithmes analytiques présentés doivent être utilisés judicieusement pour répondre à la problématique des NSP sur le plan toxicologique. En effet, elles sont l'une des pierres angulaires de la lutte aux NSP puisque sans détection rapide des substances émergentes, aucune action ne peut être prise pour les contrer.

1.5 SCHÉMA D'ANALYSE AU LABORATOIRE DE SCIENCES JUDICIAIRES ET DE MÉDECINE LÉGALE (LSJML)

Au Québec, le laboratoire de sciences judiciaires et de médecine légale (LSJML) réalise toutes les expertises d'analyse de drogues, d'alcool et d'autres toxiques dans des cas de morts suspectes ou inexplicables, de conduite avec les facultés affaiblies ou d'agressions sexuelles dans la province de Québec. Son schéma analytique (Figure 1.3) des drogues et des médicaments repose sur une précipitation des protéines (PPT) suivie d'une analyse ciblée par LC-MS/MS. Cette analyse à haute capacité permet l'analyse qualitative et quantitative de 144 xénobiotiques les plus couramment rencontrés principalement dans des matrices sanguines ou urinaires. Un dépistage non ciblé par GC-MS est réalisé au besoin selon les circonstances et le type de dossier.

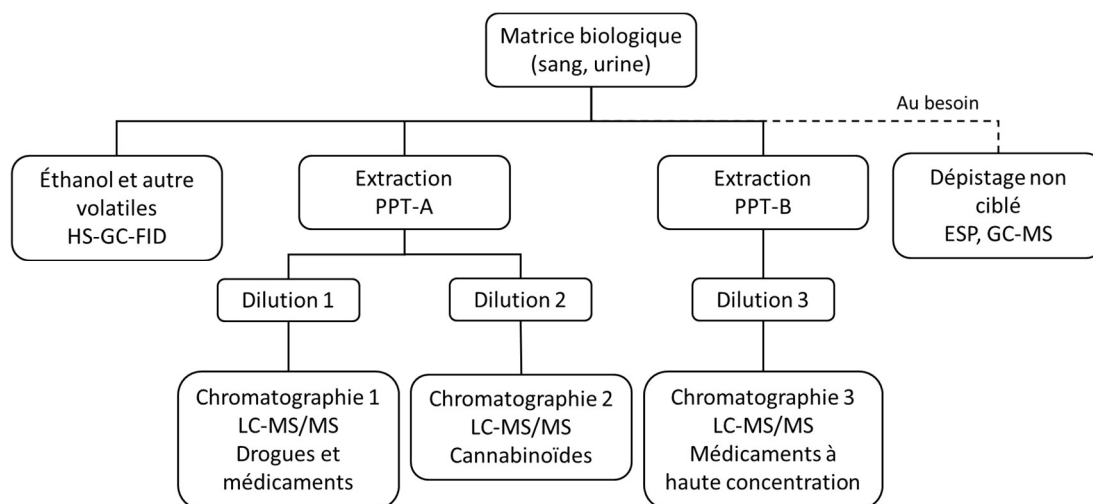


Figure 1.3 Schéma analytique utilisé au LSJML.

Brièvement, les extractions PPT-A et PPT-B sont réalisées dans une plaque de 96 puits et nécessite 100 μL de sang ou d'urine auquel on ajoute 10 μL d'une solution contenant 36 (PPT-A) ou 9 (PPT-B) standards internes deutérés dans du méthanol. Un volume de 100 μL d'une solution de méthanol et d'eau acide formique 0.2% 50:50 (v:v) est ajouté à chaque échantillon. Cette dilution permet une précipitation efficace, homogène et reproductible, peu importe la qualité de l'échantillon en prévenant la formation de caillots. La précipitation des protéines est réalisée avec l'ajout de 400 μL d'une solution d'acétonitrile et d'acétone 70:30 (v:v). Les dilutions 1, 2 et 3 sont effectuées en transférant 25 μL , 200 μL et 20 μL respectivement dans 180 μL d'une solution aqueuse d'acide formique 0,2%, 50 μL d'une solution aqueuse d'acide formique 1,5% et 200 μL d'une solution méthanol et d'acide formique 0,2% 10 :90 (v:v) (Côté *et al.*, 2017). Les extraits dilués sont ensuite injectés en mode MRM sur des systèmes chromatographiques Agilent (série 1200 ou 1260) couplé à un spectromètre de masse de marque Sciex MS/MS 5500 QTrap. Chacune des méthodes instrumentales a fait l'objet d'optimisation des paramètres chromatographiques et de détection selon les analytes ciblés et a été validée et accréditée selon la norme ISO 17025 (Côté *et al.*, 2017).

1.6 PROBLÉMATIQUES ET DÉFIS LIÉS AUX NSP

L'émergence rapide de nouvelles drogues au XXI^e siècle, regroupées sous le terme NSP, a rapidement mis au défi les approches traditionnelles en matière de surveillance, de contrôle législatif, de santé publique et de détection analytique (Brandt *et al.*, 2014). Plusieurs caractéristiques des NSP entraînent des problématiques et des défis différents de ceux posés par les drogues dites traditionnelles : leur nouveauté, le manque de connaissance sur leur toxicité, leur pharmacodynamique et leur pharmacocinétique, leur cycle de vie très court, leur grand nombre, les multiples analogues structurels possibles, leur diversité et hétérogénéité.

Plus particulièrement, les systèmes législatifs ont des difficultés à atteindre la flexibilité et la rapidité requise pour s'attaquer à la problématique des NSP (EMCDDA - Eurojust, 2016; Griffiths *et al.*, 2013; King, 2013; Measham, 2013). En effet, le système de contrôle international a deux principaux défauts : le contrôle basé sur la structure chimique précise d'un composé et la nécessité de démontrer le risque qu'il pose pour les individus et la société. Le fait de devoir nommer précisément la structure chimique du composé à contrôler tend à rendre les législations internationales réactives et crée un « jeu de chat et de souris ». Les analogues non contrôlés, ayant des propriétés psychoactives semblables à leur penchant contrôlé, se succèdent à un rythme effréné (Brandt *et al.*, 2014). Dès lors, la capacité de contrôle international est excédée puisque les connaissances sur les NSP restent fragmentaires, ce qui empêche l'évaluation rapide du risque qu'ils posent (King, 2013; Measham, 2013). Évidemment, plusieurs lois et règlements nationaux ont été ratifiés au cours des années et s'attaquent à ces aspects. Les stratégies développées sont principalement la mise en place de lois de contrôle général, dites interdictions parapluie (« blanket bans »), de législations basées sur les analogues ou de mesures de contrôle temporaires. Malgré l'adoption de ces lois plus flexibles que les lois

internationales, l'impact sur le marché des NSP est encore mitigé (Brandt *et al.*, 2014; King, 2013; Measham et Newcombe, 2016; Peacock *et al.*, 2019).

Au niveau de la santé publique, les défis sont aussi très grands. D'une part, les usagers de NSP sont particulièrement à risque de réactions indésirables et d'intoxications. En effet, la puissance et la toxicité de ces substances, les dosages et les formulations vendues ainsi que leurs effets seuls ou combinés à d'autres drogues sont souvent inconnus (Brandt *et al.*, 2014). D'ailleurs, les NSP sont souvent utilisées comme adultérant de drogues traditionnelles ou en combinaison avec d'autres NSP, parfois à l'insu de l'utilisateur, ce qui augmente les risques (Brandt *et al.*, 2014). Plus globalement, les connaissances limitées sur la pharmacologie des NSP et la rapidité de l'évolution du marché rend difficiles les actions de prévention, la surveillance continue et la réponse en cas d'écllosion d'intoxications dans une région. La communication entre les différents acteurs (usagers, professionnels de la santé, corps policier, organismes communautaires, laboratoires de détection, etc.) se doit donc d'être forte, rapide et continue.

La capacité à s'engager dans la lutte aux NSP au niveau des lois et de la santé publique repose premièrement sur la capacité d'identification et de détection continue des NSP. Les laboratoires de toxicologie clinique et judiciaire ont donc un rôle clé. Leur travail auprès des hôpitaux, des corps policiers, des coroners et des organismes de santé publique est primordial : ils doivent s'attaquer à l'identification de ces substances dans les cas d'intoxications mortelles ou non, de conduite avec les capacités affaiblies, d'agressions sexuelles, de saisies de matériels de consommation, etc. (Brandt *et al.*, 2014). De fait, l'EMCDDA évoque clairement le besoin d'obtenir des données toxicologiques complètes afin de mieux comprendre les tendances en matière de drogues et éviter d'ignorer de nouvelles menaces sanitaires (EMCDDA, 2019). Cependant, les différents laboratoires rencontrent de multiples défis liés à la détection des NSP et les données nécessaires ne sont généralement pas disponibles ou fragmentaires.

D'abord, la majorité des laboratoires sont incapables de détecter les substances moins prévalentes telles que les NSP (EMCDDA, 2019) puisqu'elles ne sont pas incluses dans les schémas d'analyse les plus répandus. Elles sont plutôt ciblées par des méthodes distinctes seulement lorsque les résultats sont négatifs pour les substances les plus communes ou incohérents avec les circonstances rapportées (Morrow *et al.*, 2018). Étant donné le haut niveau de concomitance de plusieurs substances rapportées dans des cas impliquant des NSP, une telle pratique risque de sous-évaluer la prévalence des NSP. Deuxièmement, les laboratoires de toxicologie doivent développer des méthodologies qui répondent à de multiples exigences analytiques et opérationnelles pour faire face adéquatement aux NSP.

La méthodologie choisie doit idéalement pouvoir :

- 1) être dynamique et s'ajuster aux différentes modifications rapides du marché des NSP dans leur région – certaines sont remplacées en aussi peu que trois à six mois (Papsun, 2019), au contraire des drogues et médicaments traditionnels qui resteront sur le marché pour des dizaines d'années ;
- 2) être appliquée systématiquement à tous les cas traités pour éviter une sous-évaluation de la prévalence des NSP et dépeindre un portrait précis et juste de la situation ;
- 3) être suffisamment sensible pour détecter les faibles concentrations biologiques des NSP - puisque plusieurs NSP sont plus puissantes que les drogues traditionnelles qu'elles remplacent, une faible concentration peut suffire à générer un effet ;
- 4) être suffisamment spécifique pour éviter les erreurs d'identification de composés analogues semblables structurellement, situation très fréquente dans le cas des NSP ;

- 5) utiliser des instruments accessibles dans la majorité des laboratoires de toxicologie, tels les LC-MS/MS ;
- 6) être accréditée selon des normes de qualité internationale, telle la norme ISO 17025, un objectif souvent laissé de côté face aux grandes exigences des organismes d'accréditation combinées à l'évolution rapide de la situation des NSP.

Les principales méthodes analytiques citées à la Section 1.4 utilisées seules ne peuvent pas répondre adéquatement à toutes les exigences listées ci-haut. D'abord, malgré leur grande efficacité et leur dépistage très large, les méthodes immunochimiques et le GC-MS ne démontrent généralement pas une sensibilité et une spécificité suffisante pour l'analyse des NSP (Favretto *et al.*, 2013). Ensuite, les HRMS offrent des avantages non négligeables : dépistage non ciblé avec une masse exacte jusqu'à quatre décimales, possibilité d'analyse rétrospective des données, grande versatilité grâce au couplage à la chromatographie liquide, etc. (Favretto *et al.*, 2013). Cependant, leur sensibilité plus faible en mode non ciblé, leur utilisation moins répandue dans les laboratoires de toxicologie et leur fonctionnement complexe qui requiert une expertise spécialisée empêchent leur recommandation comme instrument à privilégier dans la détection des NSP (Huestis *et al.*, 2017).

En opposition à ces méthodes non ciblées, le LC-MS/MS est la méthode la plus simple, sensible, spécifique, versatile et permet un rendement très élevé (Favretto *et al.*, 2013). Son utilisation en mode MRM (« multiple reaction monitoring ») sur une plateforme quadripôle est beaucoup plus spécifique et sensible que le mode par balayage (spectre d'ions produits, spectre d'ion précurseur et spectre de perte neutre) et atteint des limites de détection sous 1 ng/mL. En revanche, cette méthode constitue un dépistage ciblé, c'est-à-dire que le composé à analyser doit être connu préalablement. C'est donc dire que les méthodes de ce genre ne peuvent adéquatement détecter une nouvelle substance émergente lorsqu'elles

sont utilisées seules (Huestis *et al.*, 2017). Malgré cela, le LC-MS/MS en mode MRM est retenu comme méthode de choix pour l'analyse des NSP par plusieurs laboratoires qui ont publié leurs méthodes au cours des dernières années (Fogarty *et al.*, 2018; Graziano *et al.*, 2019; Kahl *et al.*, 2018; Strickland *et al.*, 2018; Vaiano *et al.*, 2016). Cependant, ces méthodes manquent fondamentalement de dynamisme et ne sont souvent pas accréditées par les organismes réglementaires (ex. l'Organisation internationale de normalisation ou ISO). De plus, elles ne sont généralement pas conçues pour être intégrées au schéma d'analyse déjà en place, ce qui résulte en leur utilisation non systématique.

En somme, les problématiques et défis engendrés par les NSP au niveau des lois, de la santé publique et de la détection analytique sont centrés sur deux principaux aspects : la quasi-absence de données à leur sujet et la rapidité à laquelle le marché évolue. La détection des NSP étant à la base du reste des actions au niveau législatif et de la santé publique, elle se doit d'être dynamique, complète, systématique, sensible, spécifique, accessible et fiable. Alors qu'aucune méthode analytique en elle-même n'est parfaite, développer un processus d'analyse au sens plus large pour éviter une sous-évaluation de la prévalence des NSP est nécessaire. L'approche à adopter pour la détection de ces substances dans les laboratoires de toxicologies exige donc un changement de paradigme afin d'obtenir un portrait de qualité, clair et précis de la situation.

1.7 OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

Le présent projet de recherche vise à développer une approche analytique adaptée au phénomène des NSP qui répond aux six exigences décrites à la Section 1.6 et permet de fournir un portrait précis de la présence des NSP sur un territoire. Il est conduit en partenariat avec la Direction de la toxicologie du Laboratoire de sciences judiciaires et de médecine légale (LSJML).

Le Chapitre II présente les nombreux défis reliés à l'analyse des NSP dans les laboratoires de toxicologie avec les méthodes analytiques couramment utilisées. Les cas présentés constituent le premier contact LSJML et de la province de Québec avec les NSP et sont le point de départ des réflexions sur la détection analytique efficace de ces substances.

Le Chapitre III présente le processus analytique mis en place à la Direction de la toxicologie du LSJML. Une méthode de détection sensible, spécifique et exhaustive des NSP par LC-MS/MS est développée et validée selon les lignes directrices de l'*American Academy of Forensic Sciences Standards Board* (ASB). Cette méthode est basée sur les techniques déjà en place au LSJML et est complètement intégrée au schéma d'analyse déjà mis en place (voir section 1.5). Afin de conserver l'efficacité des analyses, les extraits des échantillons utilisés pour l'analyse des cannabinoïdes sont ensuite réutilisés afin de réaliser le dépistage de 57 NSP et métabolites (32 NOS, 22 métabolites de NOS et 3 benzodiazépines de synthèse).

Comme ce type de méthode LC-MS/MS ciblée est mal outillé pour répondre à l'ensemble des défis posés par les NSP lorsqu'utilisé seul, un système de surveillance et d'alerte précoce est nécessaire. Ce mécanisme de surveillance permet de détecter de nouvelles NSP en circulation et les changements dans les tendances de consommation dans la province de Québec. Cette vigie est complétée par un processus d'ajout et de retrait rapide de composé à la méthode LC-MS/MS qui permet d'être dynamique, agile et de suivre les tendances.

Finalement, cette approche analytique propose une solution équilibrée et adaptée au phénomène des NSP et est appliquée de routine dans tous les dossiers traités par la Direction de la toxicologie du LSJML. Le portrait issu de ces analyses est présenté pour la première année complète d'analyse et permet pour la première fois l'évaluation tangible de la prévalence des NSP au Québec. Ces données

posent le socle sur lequel pourra maintenant s'appuyer des politiques de santé et de sécurité publique informées et adaptées à la situation particulière de la province.

CHAPITRE II

DÉFIS RELIÉS À TROIS CAS D'INTOXICATIONS FATALES IMPLIQUANT PLUSIEURS NOUVEAUX OPIOÏDES DE SYNTÈSE

2.1 PRÉAMBULE

Ce chapitre traite des défis associés à trois cas d'intoxications fatales impliquant plusieurs nouveaux opioïdes de synthèse (NOS) traités par le LSJML. Ces cas, tous détectés au début de l'année 2018, ont été un élément déclencheur pour le développement de la méthode d'analyse présentée au Chapitre 3 (p. 56). Au cours des deux dernières décennies, une importante augmentation du nombre d'intoxications mortelles lié à des opioïdes a été enregistrée en Amérique du Nord. Le phénomène, principalement lié au mésusage des opioïdes de prescription, a été surnommé la « crise des opioïdes ». Dans les dernières années, l'arrivée sur le marché des NOS a exacerbé cette problématique. Les NOS sont une sous-catégorie des NSP qui ciblent les récepteurs opioïdes. Ils peuvent être catégorisés en plusieurs classes selon leur structures chimiques : les analogues du fentanyl, les benzamides ou les benzimidazoles (voir Tableau 2.1). Les NOS entraînent les défis suivants pour les laboratoires de toxicologie judiciaire : une augmentation du nombre de cas de décès par intoxication, un grand nombre de nouveaux composés structurellement similaires à ajouter aux méthodes analytiques, de faibles concentrations biologiques à détecter, puis finalement la difficulté d'interpréter les résultats en raison du peu de littérature scientifique sur ces composés.

Tableau 2.1 Structures chimiques génériques des différents groupes de NOS.

Groupe	Structure chimique générique	Exemples	
Analogues de fentanyl		<p>Furanyl fentanyl</p>	<p>Acétylfentanyl</p>
Benzamides		<p>U-47700</p>	<p>U-48800</p>
Benzimidazoles		<p>Isotonitazène</p>	<p>Étonitazène</p>

Dans ce chapitre, les circonstances, les résultats des autopsies médico-légales ainsi que les résultats toxicologiques complets dans le sang fémoral, le sang cardiaque et l'urine sont présentés pour trois cas de décès impliquant des NOS. Un dépistage général et des analyses quantitatives ont été effectués sur les matrices biologiques disponibles. Dans le premier et le second cas, du furanylfentanyl, de l'U-47700 et du 4-anilino-N-phenethylpiperidine (4-ANPP) ont été détectés à des concentrations similaires dans le sang cardiaque (sang fémoral disponible en trop faible quantité). Dans le troisième cas, dix-sept NOS différents ont été détectés. Une version en développement de la méthode LC-MS/MS présentée au Chapitre 3 (p. 56) a été utilisée afin de résoudre l'identification de certains NOS et démontre la nécessité de ce type de méthode sensible, spécifique, complète et efficace.

Les trois cas d'intoxication mortelle présentés dans ce chapitre illustrent les défis engendrés par les NOS et qui peuvent également être transposés aux NSP en général. Ce chapitre présente donc les premières pistes de réflexion dans le cheminement d'une méthode de détection par LC-MS/MS pour des composés à faibles concentrations biologiques, vers un processus complet d'analyse des NSP qui répond aux exigences listées à la section 1.5. L'article présenté a été publié dans la revue *Journal of Analytical Toxicology* avec révision par comité de pairs (Garneau *et al.*, 2019). Des modifications mineures ont été effectuées à l'article pour sa présentation dans ce mémoire, notamment pour corriger des erreurs typographiques et adapter le format au présent document.

2.2 ARTICLE SCIENTIFIQUE (FULL PAPER)

**Challenges related to three cases of fatal intoxication
to multiple novel synthetic opioids**

Béatrice Garneau^{1,2*}, Brigitte Desharnais^{1,3}, Audrey Beauchamp-Doré¹,
Catherine Lavallée¹, Pascal Mireault¹, André Lajeunesse^{2,4}

¹ Laboratoire de sciences judiciaires et de médecine légale, Direction de la Toxicologie, 1701 rue Parthenais, Montréal, Québec, Canada, H2K 3S7

² Université du Québec à Trois-Rivières, Département de chimie, biochimie et physiques, 3351 boul. Des Forges, Trois-Rivières, Québec, G9A 5H7

³ Université Concordia, Département de chimie et biochimie, 7141 rue Sherbrooke Ouest, Montréal, Québec, Canada, H4B 1R6

⁴ Université du Québec à Trois-Rivières, Laboratoire de recherche en criminalistique, 3351 boul. des Forges, Trois-Rivières, Québec, G9A 5H7

Journal of Analytical Toxicology, 2020, 44 (1), pp. 86-91.

DOI : 10.1093/jat/bkz018

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

Béatrice Garneau : auteure principale, conceptualisation, investigation, méthodologie, validation, visualisation

Brigitte Desharnais : conceptualisation, méthodologie, supervision, visualisation

Audrey Beauchamp-Doré : investigation initiale des cas

Catherine Lavallée : investigation initiale des cas

Pascal Mireault : supervision, administration du projet

André Lajeunesse : supervision, administration du projet

2.2.1 ABSTRACT

In the last two decades, a large increase in opioid overdose death rates has been recorded in North America. This phenomenon, related to the misuse of prescription opioids, has been dubbed an “opioid crisis”. Recent years have seen the entrance of novel synthetic opioids (NSO) on the market, compounding the fatal intoxications issue. This brings several challenges for forensic toxicology laboratories: an increased number of cases, a large number of novel structurally similar compounds to include in screening analytical methods, the low concentration of drugs in biological fluids, and the challenging interpretation in the absence of sufficient literature. Three cases of fatal intoxication highlighting those challenges are presented, complete with post-mortem concentrations in cardiac blood, femoral blood and urine. Toxicological screening and quantitative analyses were performed on the biological specimens. In the first and second cases, furanylfentanyl, U-47700 and 4-anilino-N-phenethylpiperidine (4-ANPP) were detected at similar concentrations in cardiac blood. In the third case, a total of seventeen different NSO were detected. All intoxications showed a combination of NSO and other drugs. These three cases appear to be the harbinger of an increased NSO prevalence in the province of Québec, Canada.

2.2.2 INTRODUCTION

In recent years, North America has experienced a considerable growth in mortality related to misuse of prescribed opioids (Lucyk et Nelson, 2017; Comité consultatif spécial sur l'épidémie de surdoses d'opioïdes, 2018; Seth *et al.*, 2018) that has been dubbed an “opioids crisis”. However, the number of deaths resulting from commonly prescribed opioids has been stable since 2012 in the United States and Canada (Canadian Institute of Health Information, 2017; Dart *et al.*, 2015; Seth *et al.*, 2018). The increase of fatal opioid overdoses observed since then can be tied

to the appearance of novel synthetic opioids (NSO) on the market, alone or in combination with other drugs, mainly heroin (Seth *et al.*, 2018). These new psychoactive substances (NPS) are derivatives of well-known prescribed opioids, failed pharmaceuticals or medicinal products (Brandt *et al.*, 2014). Amongst the reasons for NPS' production is the will to generate substances that are not controlled by national or international regulations, but still generate psychoactive effects for the user (Brandt *et al.*, 2014).

NSO are generally categorized as fentanyl analogs (e.g. acetylfentanyl, butyrylfentanyl, furanylfentanyl) or as non-fentanyl compounds (e.g. U-47700, AH-7921, mitragynine) (Lucyk et Nelson, 2017). Even though some non-pharmaceutical fentanyls (e.g. alpha-methylfentanyl, 3-methylfentanyl) were seen on the market as early as 1979 (Henderson, 1988; Hibbs *et al.*, 1991), the recent diversification of NSO intertwined with the opioids epidemic has resulted in a major public health concern in North America. In Canada, 2978 deaths were related to opioids during 2016. Of these, 55% were related to fentanyl and NSO specifically. One year later, in 2017, the number of deaths had increased by 34% to 3987, and NSO and fentanyl were involved in 72% of cases (Comité consultatif spécial sur l'épidémie de surdoses d'opioïdes, 2018). The crisis shows no sign of slowing down in the United States either. Between 2015 and 2016, the death rate from synthetic opioids and fentanyl (excluding methadone) doubled, bringing the percentage of drug overdose deaths involving opioids to 66% (Seth *et al.*, 2018).

For forensic toxicology laboratories, NPS and NSO bring major challenges. NSO's structural similarity demands highly specific analytical methods, and their low biological concentrations call for high sensitivity (ONU DC, 2017a; Shoff *et al.*, 2017; Wang et Bernert, 2006). In addition, new NSO compounds regularly appear on the market (ONU DC, 2017a), requiring an adjustment in analytical methods and rapid production of new certified reference materials (CRMs) (Brandt *et al.*, 2014).

Three cases of intoxication highlighting those challenges are presented therein. These fatal overdoses occurred between January 2018 and February 2018 in the province of Québec, Canada. Detailed results of quantitative analysis of various post-mortem matrices and qualitative analysis of physical evidence collected at the scene are also included.

2.2.3 METHODS

2.2.3.1 SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

A complete autopsy was performed on each victim. Peripheral blood from the femoral vein, cardiac blood pooled from both ventricles, urine, gastric contents and vitreous humor were collected for toxicological analyses. Femoral blood and vitreous humor were stored in a BD Vacutainer storage tube (part number 367001, Franklin Lakes, USA) containing 100 mg of sodium fluoride and 20 mg of potassium oxalate as a preservative. Cardiac blood and urine were stored in 50 mL polypropylene tubes (Sarstedt, part number 62.559.001, Newton, NC, USA). 500 mg of a mixture of sodium fluoride and phosphate oxalate (5:1, wt:wt) was added to cardiac blood as preservative. All samples were stored at 4°C until completion of the toxicological analyses. Since very little is known about the stability of NSO in biological matrices, occurrence of degradation is not precluded and this should be kept in mind when interpreting concentrations.

2.2.3.2 TOXICOLOGICAL ANALYSIS

Blood alcohol content was determined in biological matrices via gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC-FID) (Agilent 6890A and 6890N) method. Briefly, 100 µL of biological matrix is mixed with 1 mL of a tert-butanol solution (5 mg/mL) and heated to equilibrium in a sealed vial; 1 mL of the headspace is injected. Other common volatile substances (isopropanol, acetone, methanol and n-propanol) were also screened for.

Femoral blood, cardiac blood and urine samples extracts were submitted to high throughput liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) screening and quantification assay covering 144 xenobiotics (Côté *et al.*, 2017) including the NSO butyrylfentanyl, furanylfentanyl and carfentanil. 100 µL of biological matrix was mixed with 10 µL of an internal standard solution in methanol comprising 36 deuterated compounds and precipitated with 400 µL of a 7:3 (v:v) acetonitrile:acetone mixture. 25 µL of supernatant was diluted in 180 µL of 0.2% formic acid prior to the injection of a 5 µL aliquot on an Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 column (2.1 mm x 100 mm, 3.5 µm). This method was carried out on an Agilent 1200 HPLC coupled to a Sciex 5500 QTrap operated in positive electrospray ionization mode with multiple reaction monitoring (MRM).

General unknown screening was carried out using a solid phase extraction preparation (Oasis HLB cartridges, Waters, part number WAT094226, Mississauga, ON, Canada) of 0,5 mL to 2 mL according to the sample volume. Briefly, after cartridges conditioning, the samples are eluted at approximately 1 mL/min, then washed with 1 mL MeOH:H₂O 5:95 (v:v) and eluted with pure MeOH. The extracts are evaporated, reconstitute in an external standard solution 0.01 mg/mL (SKF-525, proadifen). A 1 µL volume of the extracts are injected at 280°C and analyzed by a 34 min gas chromatography on a HP05MS Agilent column (0.25 mm x 15 m, 0.25 µm) with helium as vector gas. Detection is performed by mass spectrometry and nitrogen-phosphorus detectors (GC-MS/NPD) analysis (Agilent 7890/5975 MSD). National Institute of Standards and Technology (NIST), Cayman Chemical and local spectrum libraries were mined for possible matches.

All quantitative methods were validated according to the Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) guidelines (SWGDRUG, 2013), and were accredited under ISO 17025:2005 and CAN-P 1578 standards.

2.2.3.3 QUANTIFICATION OF NSO

Confirmation and quantification of NSO was performed via LC-MS/MS by NMS Labs (Willow Grove, PA, USA) (NMS Labs, 2018), with an extended method heavily based on Kacinko et Homan (2019).

2.2.4 RESULTS

2.2.4.1 CASE 1

A 46-year-old woman, known alcoholic, was found dead in her unsanitary apartment. Putrefactive changes were apparent on the body, such as a large green stain across her abdomen. The woman was 158 cm tall and weighed 55 kg. A complete autopsy and histological examination of the heart, liver, kidneys and endometrium tissues were performed. Overall, no traumatic or pre-existing lesions could be considered as the cause of death.

Toxicological analysis was performed on urine as well as cardiac and femoral blood. Results, shown in Table 2.2, highlight the consumption of methamphetamine, cocaine, methadone at recreational levels and the NSO furanylfentanyl and U-47700. 4-ANPP, a metabolite and precursor of fentanyl related NSO (Goromaru *et al.*, 1984; Watanabe *et al.*, 2017), was also detected. The cause of death was determined to be drug polyintoxication.

2.2.4.2 CASE 2

A 30-year-old man was found in cardiorespiratory arrest in his father's kitchen. Resuscitation attempts were unsuccessful. The victim had a history of drug and alcohol addiction. He had been in jail a few weeks before the incident and had reported being dependent to oxycodone since. The man had a record of active prescriptions for pregabalin, methylphenidate and clonazepam. At the time of the incident, about 10 clonazepam tablets were reported missing. The man was 172 cm tall and weighed 84 kg. Six broken ribs observed in autopsy were

attributed to the reanimation procedures. Furthermore, the coronary artery presented moderate to severe atherosclerosis which was confirmed by histological examinations of the tissue. No other traumatic lesions were found.

Toxicological analysis was performed on urine as well as cardiac and femoral blood. Results (Table 2.2) reveal the presence of several prescription drugs and drugs of abuse, including the NSO furanylfentanyl, 4-ANPP and U-47700. Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), clonazepam, pregabalin and methylphenidate were found at therapeutic/recreational levels, whereas diazepam, naproxen and nortriptyline were present in trace amounts. A program for free access to naloxone in drugstores was in place at the time of the events. Nevertheless, there is no toxicological evidence of naloxone administration in this case. The cause of death was declared to be a polyintoxication with the likely contribution of coronary atherosclerosis.

Interestingly, deceased individuals in cases 1 and 2 were both found in the same city, and had similar blood concentrations of furanylfentanyl and U-47700. This suggests the two cases might be related (e.g. victims knew each other or had the same drug dealer), but this possibility was not further investigated by law enforcement.

2.2.4.3 CASE 3

A 29-year-old man was found dead with a syringe in his hand and empty bottles of steroid nearby. Large putrefactive changes were apparent on the body. The victim had a history of drug consumption but had undergone a drug addiction rehabilitation program. The man was 172 cm tall and weighed 89 kg. No traumatic or pre-existing lesions were noted during autopsy.

In the initial toxicological analysis, femoral and cardiac blood as well as urine were analyzed using the high throughput LC-MS/MS screening and quantification

method. General unknown GC-MS screening was also performed on femoral blood and urine. These analyses revealed alprazolam, quetiapine and gabapentin at therapeutic levels (Table 2.2), as well as the presence of duloxetine. Three weeks later, evidence collected on the scene was sent to the forensic laboratory by police investigators for chemical analysis. The general unknown GC-MS assay of this white powder and syringe using the newly updated Cayman Chemical GC-MS Library revealed the presence of several NSO, all listed in Table 2.2.

These new results changed the outlook on the case, and prompted a retrospective analysis of femoral blood GC-MS chromatograms with the newly updated Cayman Chemical GC-MS library. This new data mining revealed the presence of para-fluoro(iso)butyrylfentanyl, methoxyacetylfentanyl, and 4-ANPP. The two first were also identified in urine, along with p-fluorofentanyl, U-47700, isobutyrylfentanyl, butyrylfentanyl and valerylfentanyl. These biological matrices were therefore sent for confirmation and quantitative analysis at NMS Labs. Complete results are reported in Table 2.2.

A later analysis with an LC-MS/MS NSO screening method under development revealed several additional NSO both in the white powder and the biological matrices (Table 2.2). Although butyrylfentanyl was initially identified in the white powder by the high throughput LC-MS/MS assay, further investigation using an LC-MS/MS method in development revealed that isobutyrylfentanyl was actually present in the sample (Figure 2.1). Similarly, U-51754 identified by GC-MS was revealed to actually be U-48800.

Para-fluoro(iso)butyrylfentanyl, cyclopropylfentanyl/crotonylfentanyl, despropionyl para-fluorofentanyl and N-methyl U-47931 E were identified as the main components of the white powder, with a proportion exceeding 10% (w:w). All other NSO can be considered to be present at trace levels in the powder, although it should be noted that a quantitative evaluation was not possible for

methoxyacetylfentanyl due to the lack of available standard at the moment of analysis. Cause of death was determined to be a polyintoxication.

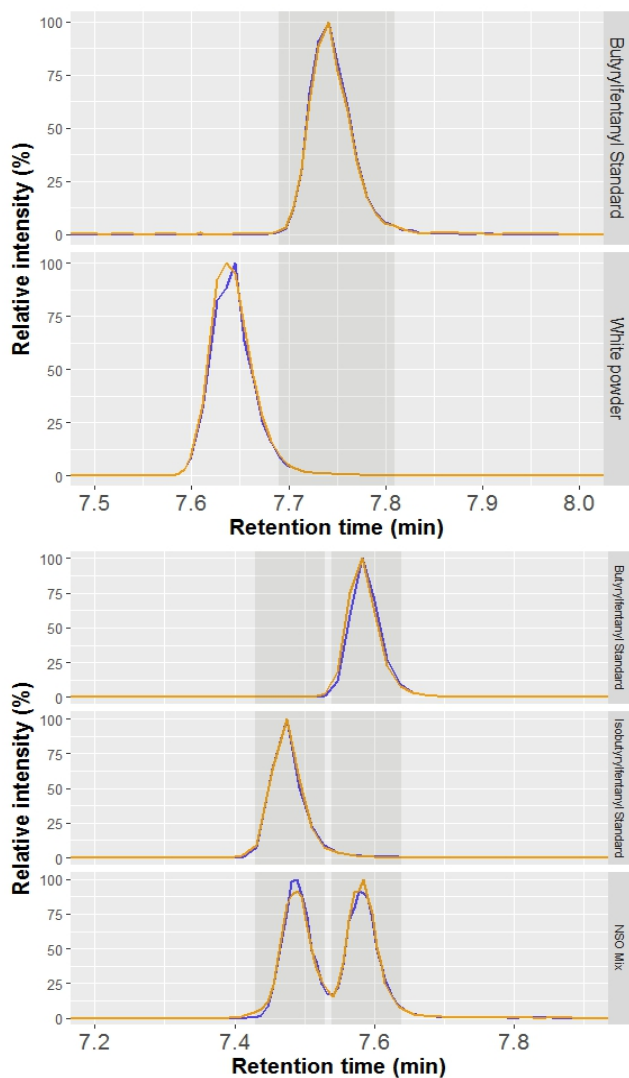


Figure 2.1 Case 3 powder analysis.

(A) LC-MS/MS Chromatograms of the selected MRM transitions (m/z 351.2 to 188.0 and m/z 351.2 to 105.0) for the butyrylfentanyl reference standard and the white powder exhibit under the high throughput LC-MS/MS screening.

(B) LC-MS/MS Chromatograms of the selected MRM transitions for the butyrylfentanyl (m/z 351.2 to 188.0 and m/z 351.2 to 105.0) and isobutyrylfentanyl (m/z 351.2 to 188.0 and m/z 351.2 to 105.0) reference standards analyzed individually, and together as part of an NSO mix under the targeted NSO LC-MS/MS analysis method currently in development.

Table 2.2 Analytical findings in each fatality.

Case	Analyte	Cardiac blood (ng/mL)	Femoral blood (ng/mL)	UM* (± %)	Urine
1	Methamphetamine	664	198	16	+
	Amphetamine	103	31	14	+
	Cocaine	12	15	15	+
	Benzoyllecgonine	840	725	15	+
	Methadone	154	75	17	+
	EDDP**	27	10	22	+
	4-ANPP**	33	NA***	NA	+
	Furanylfentanyl	14	NA***	NA	+
	U-47700	54	NA***	NA	+
Case	Analyte	Cardiac blood (ng/mL)	Femoral blood (ng/mL)	UM* (± %)	Urine
2	Clonazepam	126	94	18	+
	Methylphenidate	19	15	14	+
	Pregabalin	5 201	5 571	10	+
	THC**	17	18	16	-
	THC-OH**	7.7	3.3	14	-
	THC-COOH**	199	32	14	+
	Naproxen	3 633	2 118	12	+
	Nortriptyline	42	14	16	+
	Diazepam	14	11	13	-
	Oxazepam-glucuronide	-	-	-	+
	Temazepam-glucuronide	-	-	-	+
	Benzoyllecgonine	-	-	-	+
	Naproxen O-desmethyl	-	-	-	+
	4-ANPP**	32	18	NA	+
	Furanylfentanyl	2.4	0.89	NA	+
	U-47700	45	26	NA	+

Case	Analyte	Cardiac blood (ng/mL)	Femoral blood (ng/mL)	UM* (± %)	Urine	Syringe	White powder
3	Alprazolam	20 ^(B)	12 ^(B)	17	+ ^(A, B)	-	+ ^(B)
	Quetiapine	940 ^(B)	58 ^(B)	15	+ ^(A, B)	-	-
	Gabapentin	+ ^(B)	15 000 ^(A, B)	11	+ ^(A, B)	-	-
	Duloxetine	+ ^(B)	+ ^(B)	-	+ ^(B)	-	-
	4-ANPP**	5.1 ^(C, D)	9.7 ^(A, C, D)	NA	+ ^(C, D)	-	+ ^(D)
	p-fluoro(iso)butyrylfentanyl	31 ^(C, D)	27 ^(A, C, D)	NA	+ ^(A, C, D)	+ ^(A)	+ ^(A, C, D)
	Methoxyacetylfentanyl	70 ^(C)	14 ^(A, C)	NA	+ ^(A, C)	+ ^(A)	+ ^(A, C)
	Cyclopropylfentanyl/crotonylfentanyl	0.15 ^(C, D)	0.10 ^(C, D)	NA	+ ^(C, D)	-	+ ^(D)
	Cyclopropyl norfentanyl/crotonyl norfentanyl	-	-	-	+ ^(D)	-	-
	U-47700	+ ^(D)	+ ^(D)	-	+ ^(C, D)	-	+ ^(A, D)
	Acetylfentanyl	+ ^(D)	+ ^(D)	-	+ ^(D)	-	+ ^(B, D)
	Despropionyl fluorofentanyl	+ ^(D)	+ ^(D)	-	+ ^(D)	-	+ ^(A, D)
	N-methyl U-47931 E	+ ^(D)	-	-	+ ^(D)	-	+ ^(D)
	U-47931 E	-	-	-	+ ^(D)	-	+ ^(A, D)
	Isobutyrylfentanyl	-	-	-	+ ^(C, D)	+ ^(B)	+ ^(A, B, D)
	p-fluorofentanyl	-	-	-	+ ^(C)	-	+ ^(D)
	Valerylfentanyl	-	-	-	+ ^(C)	-	-
	Furanylfentanyl	-	-	-	-	-	+ ^(B, D)
	U-49900	-	-	-	-	-	+ ^(A, D)
	U-48800	-	-	-	-	-	+ ^(A, D)

* UM: Uncertainty of measurement

** EDDP: 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine, 4-ANPP: 4-anilino-N-phenethylpiperidine, THC: Δ 9-tetrahydrocannabinol, THC-OH: 11-hydroxy-Δ9-tetrahydrocannabinol, THC-COOH: 11-nor-9-carboxy- Δ 9-tetrahydrocannabinol.

*** Not enough sample to conduct analysis

A : Detected by a general unknown GC-MS screening

B : Detected by a LC-MS/MS screening and quantification method

C : Detected by LC-MS/MS by NMS Labs

D : Detected by a LC-MS/MS NSO screening method in development

2.2.5 DISCUSSION

The arrival of NSO on the recreational market is an unprecedented phenomenon that generates several challenges for forensic laboratories. Forensic toxicologists have to deal with an increasing number of cases, often presenting several analytical and interpretation challenges.

In the United States, the misuse and addiction to opioids has spread throughout the country, although certain regions are much more impacted than others (National Institute on Drugs of Abuse, 2018). In Canada, the opioids crisis unfurled west to east, beginning its route in British Columbia and then the prairies (Alberta, Saskatchewan, Manitoba) (Belzak et Halverson, 2018). The province of Ontario reported in 2017 a sudden increase in opioid related deaths (Belzak et Halverson, 2018). Until now, it seemed like the province of Québec was spared. Opioid related death rates were relatively stable (Comité consultatif spécial sur l'épidémie de surdoses d'opioïdes, 2018), while the prevalence of opioids in driving under the influence cases was significantly lower than in other provinces (Viel et Mireault, 2015). Furthermore, opioid related hospitalizations rate is still the lowest in the country (Canadian Institute of Health Information, 2017). Even though the number of opioids prescription per capita remains similar to other provinces, the quantity prescribed is lower, yielding the lowest country-wide defined daily doses (Canadian Institute of Health Information, 2017). NSO have been detected in several cases (drug seizures, driving under the influence of drugs and overdoses) in Canada since 2011 (Belzak et Halverson, 2018). However, their appearance has mostly mirrored the development of the opioid's epidemic. In that sense, the three cases presented therein might be a harbinger of the crisis to come in the province of Québec.

In addition to an increasing number of cases, the diversification of NSO can also bring supplemental analytical challenges due to their structural similarity. The third case presented here is a good example of this problematic aspect. Two misidentifications occurred in the first analysis of the white powder: isobutyrylfentanyl, which was not initially in the LC-MS/MS method scope, was mistaken for the targeted butyrylfentanyl (Figure 2.1) and U-48800 was erroneously identified as U-51754 by GC-MS spectrum database comparison. Analysis by an LC-MS/MS NSO screening method under development allowed discrimination of the compounds. This type of confusion is likely to be observed with many pairs of NSO isomers, such as para-fluorobutyrylfentanyl and para-fluoroisobutyrylfentanyl, or cyclopropylfentanyl and crotonylfentanyl. This can potentially lead to misidentification of NSO, with serious issues in terms of interpretation and accuracy of published data.

The third case also emphasises the importance of maintaining and updating GC-MS spectral libraries to keep up with the pace of NSO apparition on the market. Initially, GC-MS appears like a method of choice for screening illicit drugs in this constantly evolving market, due to the ability to compare results to worldwide shared spectra libraries. However, GC-MS limits of detection for analysis targeting NSO are typically between 1 and 10 ng/mL (ONU DC, 2017b). A similar situation arises with high resolution mass spectrometers (HRMS) (e.g. time of flight mass spectrometers (Q-TOF-MS)) which proved their reliability in doing non-targeted and retrospective analysis. Despite that, like GC-MS, HRMS instruments are known to be less sensitive than triple quadrupole systems in target mode analysis (Chindarkar *et al.*, 2015). As numerous sources reported concentrations under 2 ng/mL for both postmortem (Andeason *et al.*, 2018; Krotulski *et al.*, 2017; Swanson *et al.*, 2017; Yong *et al.*, 2018) or antemortem (Bäckberg *et al.*, 2015; Miller *et al.*, 2018) cases, LC-MS/MS analyses remain relevant to detect biological concentrations of most potent NSO like carfentanil.

Even when laboratories do have the technology and the capability to monitor NSO in circulation, interpretation challenges still need to be addressed. Biological concentrations reported here are similar to those found in other publications. For example, Mohr *et al.* reported on 5 polyintoxication cases positive for both furanylfentanyl (2.5 – 76 ng/mL, mean 26 ng/mL) and U-47700 (17 – 490 ng/mL, mean 253 ng/mL) (Mohr *et al.*, 2016), akin to what was found in cases 1 and 2 here. Martucci *et al.* also reported a case with furanylfentanyl at concentrations of 1.9 ng/mL in peripheral blood and 2.8 ng/mL in cardiac blood (Martucci *et al.*, 2018). But the contribution of an NSO in an intoxication fatality is difficult to assess and could not reliably be done here, mainly because only a handful of studies containing post-mortem concentrations have been reported yet for human subjects (Armenian *et al.*, 2017; Prekupec *et al.*, 2017; Comité consultatif spécial sur l'épidémie de surdoses d'opioïdes, 2018). Therefore, suspected effects and concentrations have to be inferred from animal studies. Nonetheless, these substances are reputed to easily cross the blood brain barrier and interact with opioid receptors. Like traditionally prescribed opioids, they can cause the classical opioid toxidrome including respiratory depression, miosis and altered mental state (Armenian *et al.*, 2017; ONUDC, 2017b; Prekupec *et al.*, 2017; Suzuki *et al.*, 2017).

Beyond their individual psychoactive effects, the combined action of NSO between themselves or with other drugs remains to be elucidated. This is an important topic to consider since NSO can be used as adulterant in counterfeit opioids (Armenian *et al.*, 2017). Furthermore, the mixture of several NSO is a common theme in the three cases presented here. In the third case, an impressive number of 17 different NSO were detected. To the best knowledge of the authors, this is the first case reported in literature involving as many different NSO. Since the beginning of 2018, analysis of pieces of evidence and biological specimens in our laboratory routinely reveal NSO combinations.

2.2.6 CONCLUSIONS

This paper presents the concentration values in postmortem cases (femoral blood, cardiac blood and urine) for the NSO 4-ANPP, furanylfentanyl, U-47700, p-fluoro(iso)butyrylfentanyl, methoxyacetylfentanyl and cyclopropylfentanyl (Table 2.2), which will contribute to build a comprehensive database for toxicological interpretation.

The unprecedented spread of NPS and NSO across the world brings several challenges to the forensic toxicology community. The increasing number of cases, potential for misidentification and low biological concentrations require sensitive, specific, extensive and high throughput LC-MS/MS methods. These reliable analyses will be crucial in providing relevant toxicological results to help sort out forensic cases involving NSO. Additionally, they can be used as an investigation tool to better understand the trends of the recreational markets.

2.2.7 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the forensic pathologists who have worked on these cases, Dr. André Bourgault and Dr. Yann Dazé.

CHAPITRE III

UN PROCESSUS ANALYTIQUE COMPLET, DE LA DÉTECTION D'UNE NPS À SON DÉPISTAGE SYSTÉMATIQUE : VALIDATION DE MÉTHODE ET ÉTUDE DE PRÉVALENCE

3.1 PRÉAMBULE

Ce chapitre traite du développement, de la validation et de l'application d'un processus complet de détection des NSP, de l'identification de l'émergence d'une NSP jusqu'à son intégration dans une méthode de dépistage.

Avant de s'intéresser aux NSP en général, l'arrivée des NOS sur le territoire québécois était une préoccupation pour le LSJML, la santé publique et leurs collaborateurs. Comme mentionné dans la section 1.5, la plupart des laboratoires de toxicologie n'effectuent pas de dépistage systématique de ces substances. En 2018, le LSJML ne faisait pas exception et les bibliothèques de spectres GC-MS constituaient la manière presque exclusive de les détecter. Cette approche conventionnelle n'était pas bien adaptée aux défis posés par les NOS : leur prévalence de consommation au Québec était probablement sous-évaluée et certains cas d'intoxication risquaient de passer inaperçus.

La Direction de la toxicologie du LSJML et le groupe de recherche du Pr Lajeunesse ont donc priorisé le développement d'une méthode de détection

des NOS par LC-MS/MS. Le développement, la validation et l'application de cette méthode sensible, spécifique, complète, systématique, efficiente et intégrée au schéma d'analyse déjà en place représentait le but initial de ce projet de maîtrise.

À la fin de l'année 2018, des informations de certains partenaires externes, notamment les corps policiers et le Service d'analyse des drogues de Santé Canada, soulignaient la présence de nouvelles benzodiazépines de synthèse au Québec, soit le flubromazolam et l'étizolam. Ces NSP analogues aux benzodiazépines de prescription sont souvent vendues sous la forme de comprimés contrefaits de Xanax®, dont l'ingrédient actif est normalement l'alprazolam. Ces NSP avaient déjà été détectées par GC-MS dans quelques spécimens d'urine (dossiers de conduite avec les capacités affaiblies) et dans des comprimés analysés auparavant au LSJML. Mais rapidement, il a été constaté que la sensibilité du GC-MS n'était pas suffisante pour les faibles concentrations sanguines. Ces substances ont donc été ajoutées à la méthode en développement ciblant les NOS, la transformant en une méthode ciblant des NSP.

Cependant, il devenait évident qu'une méthode de détection ciblée et fixe des NSP par LC-MS/MS n'est pas suffisante pour s'attaquer à la problématique des NSP. En effet, les NOS et les nouvelles benzodiazépines de synthèse représentent une minorité des NSP détectées mondialement et de nombreuses NSP différentes font leur apparition sur le marché noir de la drogue chaque année. Certaines technologies sont mieux adaptées pour faire face à ce problème (ex. LC-HRMS), mais les laboratoires ayant des moyens instrumentaux et financiers limités doivent s'attaquer autrement à ce défi. En fait, cela posait plusieurs questions analytiques et opérationnelles :

- Comment assurer la détection efficace des nouvelles tendances en matière de NSP?

- Comment conserver une méthode LC-MS/MS ciblée d'actualité face à un phénomène aussi changeant que celui des NSP?
- Comment ajouter ou retirer des composés à la méthode LC-MS/MS tout en respectant les plus hautes exigences en matière de validation de méthode et de normes réglementaires?

Il y avait donc un besoin de développer une méthodologie élargie qui peut s'appliquer à l'émergence de nouvelles substances, sans sacrifier la qualité de la validation et de l'accréditation. Cet article présente une solution à cette problématique, soit un processus complet accrédité selon la norme ISO17025:2017 qui comprend :

- Une méthode LC-MS/MS sensible, spécifique, complète, intégrée au schéma d'analyse déjà en place et capable de gérer un haut débit d'échantillon à analyser
- Un système de vigie incluant un partenariat avec des organismes externes (ex. corps policiers, Santé Canada, santé publique provinciale, etc.) et des méthodes non ciblées utilisées au LSJML (GC-MS)
- Un processus d'ajout et de retrait rapide de composés à la méthode LC-MS/MS

Comme les trois facettes du processus sont accréditées, l'ajout d'une NSP (conditionnellement à la réussite des tests de validation préétablis), est considéré comme accrédité automatiquement par les organismes réglementaires et ne nécessite pas de nouvel audit.

La méthode LC-MS/MS initiale incluait 55 NSP et métabolites (53 NOS et 2 nouvelles benzodiazépines de synthèse). Après leur identification comme menace régionale par le système de vigie mis en place, le flualprazolam et l'isotonitazène ont été rapidement validés et ajoutés à ce contingent. Entre mars 2019 et mars 2020, 5 079 dossiers ont été systématiquement dépistés pour les NSP dans la province de Québec. De ceux-ci, 3,4% se sont révélés positifs à au moins une NSP. Les benzodiazépines de synthèse et les NOS étaient impliqués dans respectivement 94% et 5% de ces cas. Le 1% restant concerne des dossiers où les deux classes de NSP ont été détectées. Ce processus combinant haute efficacité, instrumentation simple, accréditation selon la norme ISO 17025 et réponse rapide aux nouvelles tendances en matière de NSP a eu pour résultat d'augmenter d'un facteur quatre les instances de détection des NSP. L'article présenté a été publié dans la revue *Forensic Science International* avec révision par comité de pairs (Garneau, B. *et al.*, 2020). Des modifications mineures ont été effectuées à l'article pour sa présentation dans ce mémoire, notamment pour corriger des erreurs typographiques et adapter le format au présent document.

3.2 ARTICLE SCIENTIFIQUE (FULL PAPER)

A comprehensive analytical process, from NPS threat identification to systematic screening: method validation and one-year prevalence study

Béatrice Garneau^{1,2,3}, Brigitte Desharnais¹, Julie Laquerre¹, Cynthia Côté¹,
Marie-Pierre Taillon¹, Pierre-Yves Martin¹, Gabrielle Daignault¹, Pascal Mireault¹,
André Lajeunesse^{2,3}

¹ Laboratoire de sciences judiciaires et de médecine légale, Direction de la toxicologie, 1701 rue Parthenais, Montréal, Québec, Canada, H2K 3S7

² Université du Québec à Trois-Rivières, Département de chimie, biochimie et physique, 3351 boul. Des Forges, Trois-Rivières, Québec, G9A 5H7

³ Université du Québec à Trois-Rivières, Laboratoire de recherche en criminalistique, 3351 boul. des Forges, Trois-Rivières, Québec, G9A 5H7

Forensic Science International, 2021, 318 (110595).

DOI : 10.1016/j.forsciint.2020.110595

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

Béatrice Garneau : auteure principale, développement de la méthode, conceptualisation, méthodologie, investigation, validation, visualisation

Brigitte Desharnais : conceptualisation, méthodologie, validation, supervision

Julie Laquerre : conceptualisation, méthodologie, investigation

Cynthia Côté : conceptualisation, méthodologie

Marie-Pierre Taillon : validation

Pierre-Yves Martin : validation, logiciel

Gabrielle Daigneault : logiciel

Pascal Mireault : supervision, administration du projet

André Lajeunesse : supervision, administration du projet

3.2.1 ABSTRACT

Several New Psychoactive Substances (NPS) enter the illicit drug market each year. This constant evolution of compounds to screen is challenging to law enforcement and drug chemists, and even more so to forensic toxicologists, who need to detect such compounds which might be at low concentrations in complex biological matrices. While some technological solutions are better suited than others to address such a challenge (e.g., high resolution mass spectrometer), laboratories with limited instrumental and financial resources are faced with a complex task: systematically screening for a rapidly evolving NPS panel using an accredited method run on standard equipment (e.g., liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)). This work presents a solution to this challenge: a complete workflow from the detection of a regional NPS threat to its implementation in a method accredited under the ISO 17025:2017 norm. Initial LC-MS/MS method included 55 NPS and metabolites (31 Novel Synthetic Opioids (NSO), 22 NSO metabolites and 2 designer benzodiazepines). Following their identification as relevant territorial threats, flualprazolam, then isotonitazene, were added to the contingent. By relying on development aiming for maximal integration to the current analysis workflow, systematic NPS screening using this method was easily implemented. Between March 2019 and March 2020, the 5 079 cases treated in the province of Québec (Canada) revealed a NPS positivity rate of 3.4%. While 94% involved designer benzodiazepines, 5% involved NSO. This process, combining high efficiency, simple detection technology, ISO accreditation and rapid response to new threats resulted in a four-fold increase in NPS detection.

3.2.2 INTRODUCTION

New Psychoactive Substances (NPS), defined as compounds not regulated under the Single Convention on Narcotic Drugs of 1961 and the Convention on

Psychotropic Substances in 1971, refer to new compounds used, or compounds newly used, for recreational purposes (King et Kicman, 2011; Measham et Newcombe, 2016). Also referred to as “designer drugs” or “legal highs”, these compounds can be derivatives of known drugs or drugs of abuse, failed pharmaceuticals, plant extracts, etc. (2)

NPS have been a fixture of the drug market of the new millenium. From a dramatic increase in importance starting in the mid 2000s, the NPS situation seems to have stabilized in the past years (EMCDDA, 2019; ONUDC, 2019b; Vaiano *et al.*, 2019). Before 2010, a little more than 100 distinct NPS were detected per year worldwide and reported to the United Nation Office on Drugs and Crime’s (UNODC) Early Warning System (EWS); this number grew to reach a plateau of 400 to 500 since 2013 (ONUDC, 2020a). Coincidentally, the number of NPS reported for the first time to the European Union EWS fell from its 2014 peak of 101 to twice lower (EMCDDA, 2019).

However, that “stabilization” label should not mask the market’s constant evolution. New compounds are still appearing worldwide, and regional markets may suffer even more drastic modifications (compounds known and seen in other parts of the world appearing for the first time in a region). Indeed, NPS have short life cycles, with compounds being replaced in as fast as three to nine months (Papsun, 2019). Synthetic cathinones and synthetic cannabinoids receptor agonists (SCRAs) represented the vast majority of the NPS reported before 2015. From that time on, other NPS categories such as opioids and benzodiazepines (ONUDC, 2020a) rapidly grew in importance, leading to more numerous categories and greater analog diversification.

Drug chemists and forensic toxicologists are on the front line to identify emerging NPS trends as they collaborate with law enforcement, coroners and public health safety officials to identify drugs in cases of intoxication, drug possession, driving

under the influence of drugs (DUID), unexplained deaths, sexual assaults, etc. Clinical, human performance and post-mortem toxicology laboratories therefore have the duty to tackle the rapidly evolving NPS situation. This means detecting and potentially quantifying different categories of NPS in biological matrices: novel synthetic opioids (Garneau *et al.*, 2019; Kraemer *et al.*, 2019), new synthetic benzodiazepines (Chan *et al.*, 2019; Heide *et al.*, 2020; Kraemer *et al.*, 2019; Rohrig *et al.*, 2020), cathinones (Kraemer *et al.*, 2019; Margasińska-Olejak *et al.*, 2019) synthetic cannabinoids (Chan *et al.*, 2019; Kraemer *et al.*, 2019).

This is a tall order for all laboratories. Some have turned towards liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (LC-HRMS), which has considerable advantages in this situation. The addition of exact mass as an identification point, library search with *in silico* fragmentation prediction and retrospective data mining are indeed extremely useful tools in the NPS context. However, compared to the more standard tandem mass spectrometers (LC-MS/MS), such instruments are more expensive, less sensitive, and generally not as high throughput.

This last point is an important one if one aims to curb underreporting of NPS and achieve systematic screening. As panels targeting NPS are often used as a “last resort” method only, (Morrow *et al.*, 2018), NPS occurrences are bound to be missed. Indeed, 2019 UNODC data shows that at least more than half of the post-mortem NPS cases had concomitant use of more than four substances (UNODC, 2019a). This means that cases in which other “standard” xenobiotics are detected are susceptible to never be screened for NPS.

This depicts an even more complex picture of the challenge faced by laboratories, which need to develop and use NPS screening methodology which: 1) keeps pace with emerging NPS trends in their region; 2) is applied to all cases treated by the laboratory, i.e., systematic screening; 3) is sensitive enough to detect the low

concentration of NPS in biological matrices – compounds sometimes hundreds of times more potent than the traditional drugs; 4) is specific enough to avoid misidentification of structural isomers – common occurrences in NPS; 5) uses instrumentation available to the vast majority of forensic toxicology laboratories, such as triple quadrupole LC-MS/MS; 6) can be accredited under standard norms, such as ISO 17025?

This is an intricate problem, and thus far, answers found in the literature make large compromises on several of these requirements. Multiple LC-MS/MS methods targeting NPS in multiple biological matrices have been published (Fogarty *et al.*, 2018; Graziano *et al.*, 2019; Kahl *et al.*, 2018; Strickland *et al.*, 2018; Vaiano *et al.*, 2016). Whereas these are sensitive, specific, use standard instrumentation, are mostly quantitative, can be used for systematic screening and are sometimes accredited, they fundamentally lack dynamism, with panels fixed at the moment of validation. Adding a new compound to screen for requires major re-validation, a time and resource intensive process, especially when the method is a fully quantitative one. This type of method does not allow to keep pace with emerging NPS trend, a serious compromise when dealing with such substances. Multiplying these panels often means dropping systematic screening, yet another problematic compromise. Given this large list of requirements, it is likely impossible to achieve perfection on all points in creating an NPS screening method. However, a paradigm shift could allow to reach better equilibrium and less overall compromising on all items.

This work presents a more rounded solution to the issue of NPS screening in typical forensic toxicology laboratories. The core of this NPS workflow is an LC-MS/MS screening method run on all forensic cases analyzed in the Province of Québec (Canada). This is a dynamic method, allowing rapid addition/removal of compounds with minimal and efficient validation. An initial contingent of 55 NPS and metabolites (31 Novel Synthetic Opioids (NSO), 22 NSO metabolites and 2

designer benzodiazepines) were included in the panel. As flualprazolam, and then isotonitazene, emerged as new threats in the province, these were swiftly added to the panel. Because the process as a whole was accredited under ISO 17025:2017 guidelines, these additions to the method are considered as accredited when the validation is completed, without any further intervention from an accrediting body. This workflow, including the screening method, achieves a more balanced answer to the six intricate NPS screening requirements stated above. This is demonstrated by a one-year study (March 2019 to March 2020) of casework, which shows that its implementation resulted in a four-fold increase in NPS detection.

3.2.3 MATERIALS AND METHODS

3.2.3.1 REFERENCE STANDARDS AND REAGENTS

Certified reference materials (CRM) were purchased in solution when available from either Cerilliant (Round Rock, Texas, USA) or Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA). In the event a CRM solution was not available, powders were obtained (exact weight when available) and were dissolved in methanol to reach a concentration of 1 mg/mL. Acetonitrile and methanol were obtained from EMD Millipore Corporation (Gibbstown, New Jersey, USA). Acetone and formic acid were obtained from Fisher Chemicals (Ottawa, Ontario, Canada) and ammonium formate from Sigma Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). For all reagents above, MS grade or equivalent was used.

Blank human ante-mortem blood and urine were respectively obtained from UTAK (Valencia, California, USA) and from employees through an anonymous donation program. Post-mortem blood and urine specimens used for method validation experiments were obtained from anonymized negative casework which tested negative for more than 200 common drugs and drugs of abuse (targeted screen) and gas chromatography – mass spectrometry general unknown screening. Ante-

mortem and post-mortem blood were supplemented upon collection with the preservative sodium fluoride (NaF) and the anticoagulant potassium oxalate. No additives were used for urine samples. Blank human ante-mortem blood was stored at -20°C until use. Urine samples and post-mortem blood were kept at 4°C.

3.2.3.2 EXTRACTION AND LC-MS/MS ANALYSIS

Biological samples underwent a protein precipitation extraction. In a 96-well plate (2 mL polypropylene deepwell (AB-0932), Thermo Scientific), a volume of 100 µL of blood or urine is mixed with 10 µL of internal standard (IS) solution. This IS solution contained 36 deuterated compounds of which fentanyl-D₅ (F-001, 0.1 mg/mL, Cerilliant) alone was monitored in this NPS screening method. The other deuterated IS' were used for the standard general screening of cases, as detailed in the Discussion. Dilution was then performed with 100 µL of methanol:0.2% formic acid 50:50 (v:v), followed by precipitation with 400 µL of a 70:30 (v:v) acetonitrile:acetone solution. In a second 96-well plate (1 mL polypropylene round bottom wells (RT96PPRWU1ML), Canadian Life Science), 200 µL of supernatant was diluted in 50 µL of 1.5% formic acid and vortexed (Côté *et al.*, 2017).

A 6 µL aliquot of the extract was injected at a 650 µL/min flow rate on an Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 column (2.1 mm x 100 mm, 3.5 µm) held at 50°C. The autosampler was held at a constant temperature of 4°C. Aqueous mobile phase (A) was methanol:10 mM ammonium formate in water (2:98 v:v), with pH adjusted to 3.0 with formic acid. Organic mobile phase (B) was pure acetonitrile. A total chromatography elution time of 12.5 minutes was applied (Figure 3.1): 0 min: 100% A, 2 min: 95% A, 3 min: 82% A, 6 to 8 min : 73% A, 9.5 min: 55 % A, 9.6 to 10.6 min: 0% A (column wash), 10.7 to 12.4 min: 100% A (re-equilibration). This analysis was carried out on one of the four LC-MS/MS platforms available in the laboratory: Agilent HPLC 1200 series or 1260 Infinity coupled to a Sciex MS/MS 5500 QTrap. While not exactly identical in hardware, these systems were

confirmed to perform indistinguishably from one another for the purposes of this method. The mass spectrometer was operated in positive electrospray ionization mode with multiple reaction monitoring (MRM). General mass spectrometer parameters were as follows: MRM detection window of 45 sec, target scan time of 0.6 sec, pause time of 3.00 msec, curtain gas (CUR) of 30, collision gas (CAD) of 10, ion spray voltage (IS) of 3 500 V, source heater temperature of 750 °C, ion source nebulizer gas (GS1) of 50, heater gas (GS2) of 75, entrance potential (EP) of 10V. Retention times, Q1/Q3 transitions and compound specific MS parameters are presented in Table 3.1. Neat standards were infused to select transitions for each analyte. Cycle time was 0.6 sec; with a maximum number of 12 MRM transitions analyzed simultaneously, the number of points per peak varied between 15 and 69 and the resulting dwell time between 0.006 and 0.010 sec. Data was acquired using Analyst® 1.6.2 build 8489 software and analyzed with Multiquant® 3.0.1 (version 3.0.6256.0).

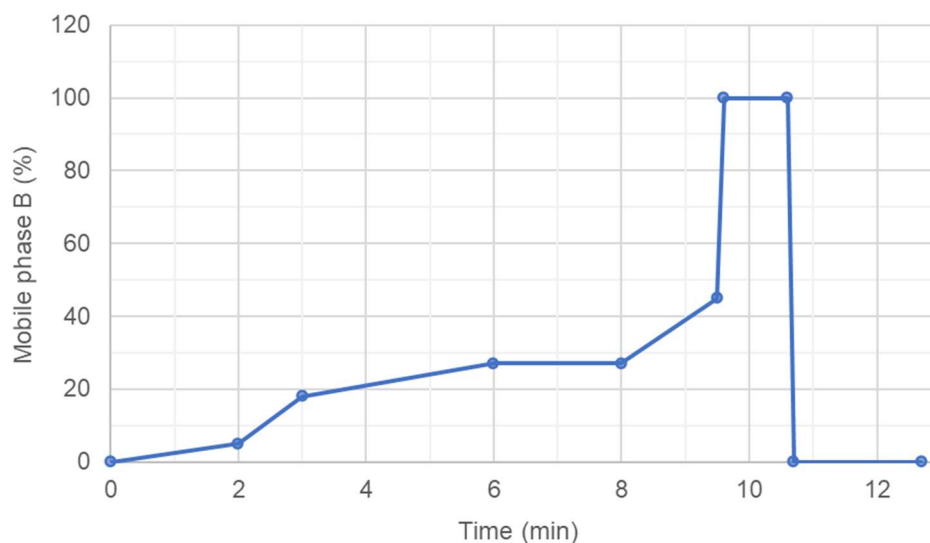


Figure 3.1 Chromatographic gradient (Mobile Phase A: methanol:10 mM ammonium formate in water (2:98 v:v), with pH adjusted to 3.0 with formic acid; Mobile Phase B: pure acetonitrile).

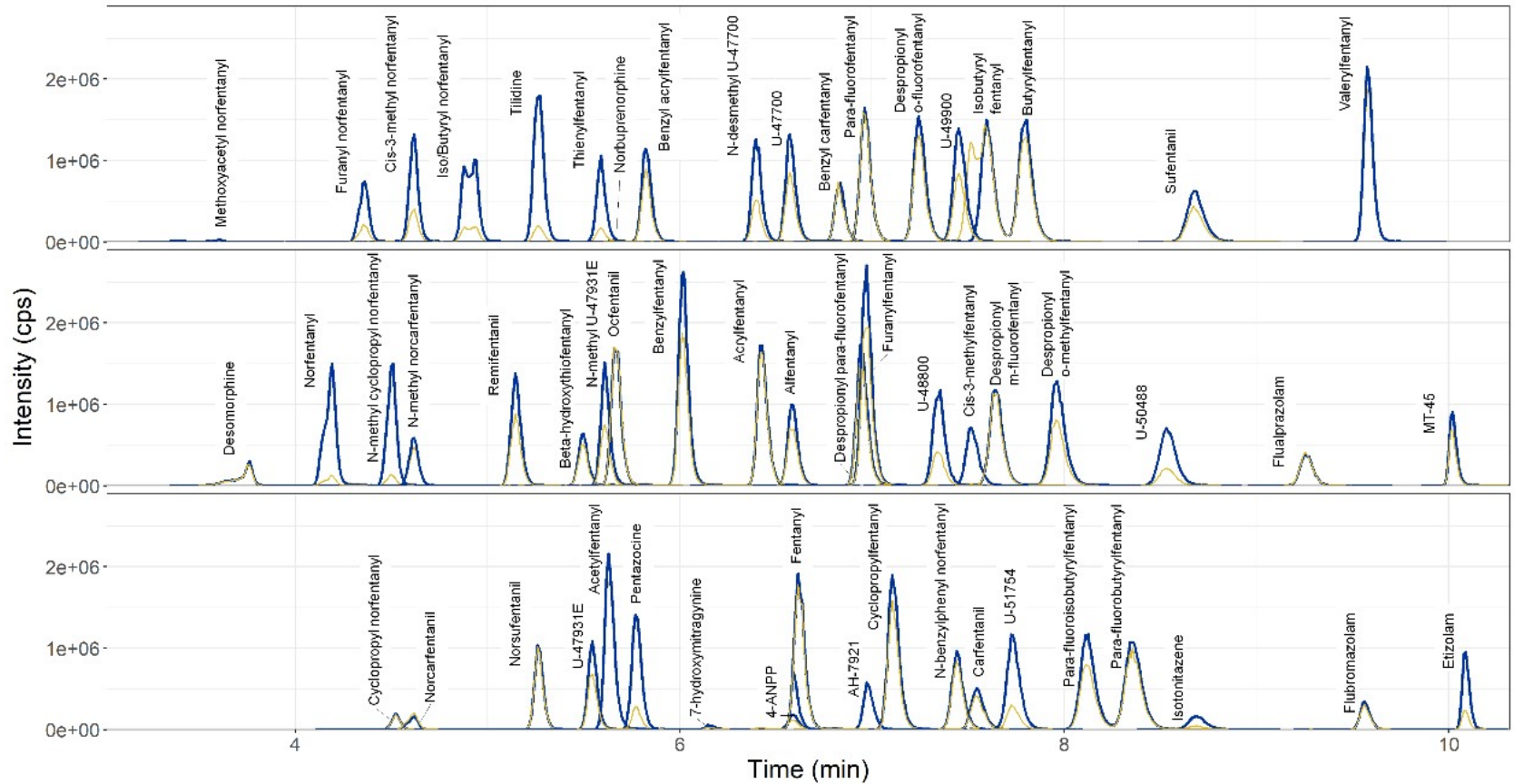


Figure 3.2 Overlaid chromatograms for a 20 ng/mL reference sample in blood (except for remifentanyl at 30 ng/mL). Peaks are separated in three distinct panels for clarity but constitute a single analysis.

Table 3.1 Mass spectrometry parameters for individual analytes.

Analyte	Retention time (min)	Q1 Parent (m/z)	Declustering potential (V)	Q3 fragment (m/z)	Collision energy (V)	Cell exit potential (V)
4-ANPP	6.53	281	60	105	25	13
				188	45	13
7-hydroxymitragynine	6.14	415	135	190	40	17
				175	60	15
Acetylfentanyl	5.60	323	100	105	55	12
				188	33	14
Acrylfentanyl	6.42	335	40	105	51	14
				188	31	6
AH-7921	6.96	329	120	173	48	10
				284	48	10
Alfentanyl	6.56	417	60	197	35	20
				268	20	20
Benzyl acrylfentanyl	5.8	321	110	91	70	13
				174	30	11
Benzyl carfentanyl	6.83	381	120	91	65	13
				321	25	14
Benzylfentanyl	6.00	323	120	91	65	10
				174	30	9
Beta-hydroxythiofentanyl	5.46	359	100	192	30	11
				340	20	20
Butyrylfentanyl	7.82	351	40	188	32	15
				105	56	10
Carfentanil	7.57	395	60	113	50	20
				246	35	20

Analyte	Retention time (min)	Q1 Parent (m/z)	Declustering potential (V)	Q3 fragment (m/z)	Collision energy (V)	Cell exit potential (V)
Cis-3-methyl norfentanyl	4.57	247	90	98	25	12
				69	45	15
Cis-3-methylfentanyl	7.53	351	105	202	35	7
				295	30	18
Cyclopropyl norfentanyl	4.48	245	70	69	50	11
				177	25	13
Cyclopropylfentanyl	7.11	349	105	188	35	11
				104	55	16
Desomorphine	3.71	272	130	152	70	9
				195	41	11
Despropionyl meta-fluorofentanyl	7.63	299	95	188	25	10
				105	55	14
Despropionyl ortho-fluorofentanyl	7.23	299	110	188	25	11
				104	55	15
Despropionyl ortho-methylfentanyl	7.96	295	120	105	45	16
				188	30	12
Despropionyl para-fluorofentanyl	6.91	299	95	105	50	11
				188	30	9
Etizolam	10.13	343	140	314	35	8
				259	50	14
Fentanyl	6.61	337	110	188	34	17
				105	55	14
Flualprazolam	9.33	327	140	223	60	23
				299	40	11
Flubromazolam	9.57	371	140	343	40	17
				292	35	15

Analyte	Retention time (min)	Q1 Parent (m/z)	Declustering potential (V)	Q3 fragment (m/z)	Collision energy (V)	Cell exit potential (V)
Furanyl norfentanyl	4.32	271	90	84	25	13
				56	50	9
Furanylfentanyl	6.97	375	100	188	32	10
				105	60	10
Iso/Butyryl norfentanyl	4.89	247	75	84	25	14
				56	45	6
Isobutyrylfentanyl	7.62	351	100	188	30	10
				105	55	16
Isotonitazène	8.75	411	80	72	65	11
				107	75	15
Methoxyacetyl norfentanyl	3.56	249	70	106	35	17
				166	25	10
MT-45	10.03	349	60	103	50	20
				181	52	13
N-benzylphenyl norfentanyl	7.44	371	105	91	75	15
				174	30	10
N-desmethyl U-47700	6.37	315	85	284	25	18
				173	35	10
N-methyl cyclopropyl norfentanyl	4.46	259	100	98	30	13
				191	25	12
N-methyl norcarfentanyl	4.58	305	75	113	35	13
				189	25	12
N-methyl U-47931E	5.57	339	85	294	25	13
				182	50	10
Norbuprenorphine	5.62	414	240	115	135	14
				152	150	8

Analyte	Retention time (min)	Q1 Parent (m/z)	Declustering potential (V)	Q3 fragment (m/z)	Collision energy (V)	Cell exit potential (V)
Norcarfentanil	4.58	291	85	113	35	12
				259	15	13
Norfentanyl	4.20	233	60	84	26	10
				150	25	13
Norsufentanil	5.22	277	65	96	30	12
				128	20	20
Ocfentanil	5.64	371	85	188	30	13
				105	60	13
Para-fluorobutyrylfentanyl	8.40	369	80	188	35	13
				105	60	13
Para-fluorofentanyl	6.96	355	125	105	55	17
				188	30	12
Para-fluoroisobutyrylfentanyl	8.16	369	95	188	35	10
				105	70	16
Pentazocine	5.74	286	110	218	30	10
				173	40	11
Remifentanil	5.11	377	125	113	40	10
				228	30	11
Sufentanil	8.75	387	60	111	50	20
				238	20	20
Thienylfentanyl	5.55	329	90	96	65	13
				53	95	8
Tilidine	5.22	274	80	229	15	11
				155	30	9
U-47700	6.55	329	95	283	25	17
				173	50	9

Analyte	Retention time (min)	Q1 Parent (m/z)	Declustering potential (V)	Q3 fragment (m/z)	Collision energy (V)	Cell exit potential (V)
U-47931E	5.51	325	90	182	45	15
				154	75	8
U-48800	7.33	343	95	297	25	15
				217	40	11
U-49900	7.45	357	80	284	25	12
				173	46	12
U-50488	8.55	369	115	298	25	15
				218	40	12
U-51754	7.72	343	95	297	25	16
				217	40	13
Valeryl fentanyl	9.61	365	120	105	48	10
				188	30	14

A reference sample was extracted and analyzed within each batch. This ante-mortem blood sample spiked at 20 ng/mL with all targeted analytes, was used to set target retention time and ion ratio (MRM ratio) for analytes in the current sequence.

3.2.3.3 VALIDATION

The NPS screening process, including validation of the LC-MS/MS method, was accredited under ISO 17025:2017 (ISO/IEC, 2017) standard. Several method validation guidelines were taken into account in establishing this atypical method validation process (Toxicology Consensus Body, Academy Standards Board (ASB), 2019; Camirand Lemyre *et al.*, 2020; Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2009; U.S Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER) and Center for Veterinary Medicine (CVM), 2018).

Validation parameters included limit of detection, sample extract stability, interferences, carryover, extraction recovery and process efficiency (Toxicology Consensus Body, Academy Standards Board (ASB), 2019). Detection criteria were as follows: 1) retention time (RT) within 0.1 min of the reference sample analyzed in the current batch; 2) two MRM transitions are present with a peak-to-peak signal-to-noise (S/N) > 3:1; 3) ion ratio (MRM ratio, i.e. (peak area for transition 1/peak area for transition 2)*100) within 30% of the ion ratio (Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2009) of the reference sample analyzed in the current batch.

Limit of detection (LOD)

The LOD was evaluated by respectively spiking three blood and three urine matrices (2 ante-mortem, 1 post-mortem in each case) at decreasing concentrations (20, 4.0, 1.0, 0.50, 0.25, 0.10, 0.050 and 0.010 ng/mL) and

analyzing the extracts using three different LC-MS/MS platforms. The concentration achieving detection based on above mentioned parameters of S/N and ion ratios for all blood/urine samples on all instruments was determined to be the LOD for blood/urine.

Sample extract stability

Extract stability was evaluated after 24, 48 and 72 hours by reanalyzing extracts used for LOD determination. One exception was isotonitazene, which was evaluated for stability at 144 hours (6 days) only, due to instrumental issues. Extracts were kept in the autosampler at 4°C for the duration of the experiment. An analyte was deemed stable if detection at its determined LOD could still be achieved after the storage delay.

Interferences

Interferences from the matrix were first assessed by analyzing seven blank blood and seven blank urine samples (in each case, 3 ante-mortem, 3 post-mortem and 1 post-mortem with putrefaction). An interference was considered to be present if the analyte peak area was greater than 25% of the LOD peak area, for either transitions; 80% of the blood/urine matrices had to be free of interferences for a compound to be validated.

NSO's family are subject to cross interferences because of the high number of isomer pairs and general structural similarities. Thus, interferences on one another were evaluated by analyzing individual 200 ng/mL solutions. This done, interferences on/from benzodiazepine type NPS and isotonitazene were then assessed by analyzing blood spiked at 200 ng/mL for both groups. Interferences from commonly encountered analytes were evaluated by analyzing blood spiked at high concentration of 144 drugs and drugs of abuse (400 to 5 000 ng/mL).

Constituting the routine screening and quantification panel, these compounds are part of the benzodiazepines, amphetamines, cocaine, antidepressants, antihistamines, antipsychotics, cannabinoids, hallucinogens, anti-inflammatory, anticonvulsants, hydroxybutyric acids (BHB/GHB) families and their metabolites (Côté *et al.*, 2017). Interferences from the 36 deuterated internal standards present in this method's IS solution were evaluated by analyzing said IS solution. An interference was considered to be present if the analyte peak area was greater than 25% of the LOD peak area, for either transitions.

Although not strictly part of the NPS screening validation, interferences from NPS on other analytes routinely screened or quantified were also evaluated by analyzing solutions of all targeted NPS at 200 ng/mL with other routine targeted methods. This informs limitations of the other methods already in place.

Carryover

Carryover was evaluated separately for blood and urine matrices. Ante-mortem matrix samples were spiked with all NPS at a 200 ng/mL concentration (except for remifentanil, which was spiked at 300 ng/mL). In the blank matrix analyzed immediately after, peak area must be lower than 25% of the LOD peak area, for either transitions, in order for carryover to be considered non-significant.

Extraction recovery and process efficiency

Extraction recovery was evaluated by spiking one ante-mortem blood and one ante-mortem urine pre- and post-extraction at the reference sample concentration (20 ng/mL for all analytes, except for remifentanil at 30 ng/mL). Recovery was calculated as the (pre-extraction peak area) / (post-extraction peak area)*100. Ionization suppression/enhancement was calculated as the (post-extraction peak area) / (in solution peak area)*100. Process efficiency, which bundles together

losses due to recovery and ionization suppression, was evaluated by analyzing one additional sample, spiked in solution. Process efficiency was calculated as the (pre-extraction peak area) / (in solution peak area)*100. There were no acceptance criteria for these two items; results were for information purposes only.

3.2.3.4 IDENTIFICATION OF NEW TRENDS AND ADDITION OF COMPOUNDS TO THE LC-MS/MS METHOD

While an initial contingent of 55 NPS and metabolites was validated as described above, the overarching goal was always to achieve a process allowing for rapid addition/removal of targeted compounds from the LC-MS/MS method. This idea of a dynamic analytical method is further expanded in the Discussion.

Compounds were earmarked for addition to the NPS screening by an internal early warning system monitoring different types of detection events:

- Seized material at the borders;
- Seized material in diverse incidents (intoxication, driving under the influence of drugs, possession, etc.);
- Detection in biological matrices from laboratory casework.

These detection events were reported by different sources:

- Drug Analysis Service (DAS) of Health Canada (laboratory analyzing all seized drug material in the country);
- Institut national de santé publique du Québec, the provincial public health institute;
- Police corps;
- Toxicovigilance groups across the country;
- Within laboratory gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) general unknown screening (GUS) method, relying on different regularly updated libraries (SWGDRUG, Cayman, NIST, DAS).

There was no fixed criteria leading to automatic addition of a compound to the method (e.g., four detection events in the province by two different sources). Rather, detection event(s) were evaluated against the backdrop of details about the case(s), prevalence and increase/decrease trends in other Canadian provinces and worldwide, GC-MS GUS detection ability, as well as requests from clients (police corps, coroners). For example, flualprazolam was earmarked for addition to the method following 3 detections in casework using the GC-MS GUS method and 15 detections in material seized by DAS; on the other hand, isotonitazene was selected for addition following 11 detections in materials seized by DAS and 3 requests from clients (coroner or police investigator).

Once selected for addition to the method, compounds underwent validation according to the criteria laid out previously. Validation of one additional compound required 82 samples, thus the extraction of one 96-well plate only was necessary, and a total of 500 injections on three instrument platforms. Table 3.2 describes the sample set-up for the validation of an additional compound to the method in place. This sample setup can be analyzed in a single injection sequence. If several instrument platforms are available, the LOD portion should be analyzed on all of them. The stability experiment will require analyses in different injection sequences. Whereas strictly speaking, samples at the LOD alone need to be injected, practically speaking, data analysis is often not completed by the time the first stability point (24 hours) is reached. One solution is to reinject all LOD samples – the determined LOD will then undoubtedly be covered. The aim is obviously a swift validation and integration to the LC-MS/MS production in a restricted time frame.

Table 3.2 Sample set-up for the validation of the addition of a new compound to the method.

LOD		Interferences from matrix	Interferences from internal standards
<ul style="list-style-type: none"> •PMB#1, 0.01 ng/mL •PMB#1, 0.05 ng/mL •PMB#1, 0.10 ng/mL •PMB#1, 0.25 ng/mL •PMB#1, 0.50 ng/mL •PMB#1, 1.00 ng/mL •PMB#1, 4.00 ng/mL •PMB#1, 20.0 ng/mL •AMB#1, 0.01 ng/mL •AMB#1, 0.05 ng/mL •AMB#1, 0.10 ng/mL •AMB#1, 0.25 ng/mL •AMB#1, 0.50 ng/mL •AMB#1, 1.00 ng/mL •AMB#1, 4.00 ng/mL •AMB#1, 20.0 ng/mL •AMB#2, 0.01 ng/mL •AMB#2, 0.05 ng/mL •AMB#2, 0.10 ng/mL •AMB#2, 0.25 ng/mL •AMB#2, 0.50 ng/mL •AMB#2, 1.00 ng/mL •AMB#2, 4.00 ng/mL •AMB#2, 20.0 ng/mL •REF, Blood 20 ng/mL 	<ul style="list-style-type: none"> •PMU#1, 0.01 ng/mL •PMU#1, 0.05 ng/mL •PMU#1, 0.10 ng/mL •PMU#1, 0.25 ng/mL •PMU#1, 0.50 ng/mL •PMU#1, 1.00 ng/mL •PMU#1, 4.00 ng/mL •PMU#1, 20.0 ng/mL •AMU#1, 0.01 ng/mL •AMU#1, 0.05 ng/mL •AMU#1, 0.10 ng/mL •AMU#1, 0.25 ng/mL •AMU#1, 0.50 ng/mL •AMU#1, 1.00 ng/mL •AMU#1, 4.00 ng/mL •AMU#1, 20.0 ng/mL •AMU#2, 0.01 ng/mL •AMU#2, 0.05 ng/mL •AMU#2, 0.10 ng/mL •AMU#2, 0.25 ng/mL •AMU#2, 0.50 ng/mL •AMU#2, 1.00 ng/mL •AMU#2, 4.00 ng/mL •AMU#2, 20.0 ng/mL •REF, Urine 20 ng/mL 	<ul style="list-style-type: none"> •AMB#1, blank •AMB#2, blank •AMB#3, blank •PMB#1, blank •PMB#2, blank •PMB#3, blank •PMB#4, putrefied, blank •LOD Blood •AMU#1, blank •AMU#2, blank •AMU#3, blank •PMU#1, blank •PMU#2, blank •PMU#3, blank •PMU#4, putrefied, blank •LOD Urine 	<ul style="list-style-type: none"> •Blood 0 ng/mL, with all ISs •LOD Blood <hr/> <p>Stability</p> <p>At 24, 48 and 72 hours:</p> <ul style="list-style-type: none"> •PMB#1, LOD •AMB#1, LOD •AMB#2, LOD •PMU#1, LOD •AMU#1, LOD •AMU#2, LOD
		Carryover	
		<ul style="list-style-type: none"> •Blood 0 ng/mL, with all ISs •Blood 200 ng/mL of NPS targeted for validation •Blood 0 ng/mL, with all ISs •LOD Blood •Urine 0 ng/mL, with all ISs •Urine 200 ng/mL of NPS targeted for validation •Urine 0 ng/mL, with all ISs •LOD Blood 	

Interferences from commonly encountered analytes	Interferences from new NPS on other analytes routinely screened (including other NPS)	
<ul style="list-style-type: none"> •ULQ Blood, Dilution 1, common drugs and drugs of abuse (PPT-A¹) •ULQ Blood, Dilution 2, common drugs and drugs of abuse (PPT-A¹) •ULQ Blood, high concentration drugs (PPT-B¹) •NPS 200 ng/mL Blood (does not include NPS targeted for validation) •<i>LOD Blood</i> 	<ul style="list-style-type: none"> •Blood 200 ng/mL of NPS targeted for validation •LLQ Blood, Dilution 1, common drugs and drugs of abuse (PPT-A¹) •CO Blood, Dilution 1, common drugs and drugs of abuse (PPT-A¹) •LLQ Blood, Dilution 2, common drugs and drugs of abuse (PPT-A¹) •CO Blood, Dilution 2, common drugs and drugs of abuse (PPT-A¹) •LLQ Blood, high concentration drugs (PPT-B¹) •NPS LOD Blood (does not include NPS targeted for validation) 	
Extraction recovery	Ionization suppression/enhancement	Process efficiency
<ul style="list-style-type: none"> •<i>REF, Blood 20 ng/mL</i> •REF, Blood 20 ng/mL spiked post-extraction •<i>REF, Urine 20 ng/mL</i> •REF, Urine 20 ng/mL spiked post-extraction 	<ul style="list-style-type: none"> •<i>REF, Blood 20 ng/mL spiked post-extraction</i> •<i>REF, Urine 20 ng/mL spiked post-extraction</i> •REF, Solution 20 ng/mL 	<ul style="list-style-type: none"> •<i>REF, Blood 20 ng/mL</i> •<i>REF, Urine 20 ng/mL</i> •REF, Solution 20 ng/mL

PMB: post-mortem blood, AMB: ante-mortem blood, PMU: post-mortem urine, AMU: ante-mortem urine, blank: not fortified with analytes nor IS, ULQ: upper limit of quantification, LLQ: lower limit of quantification, CO: cutoff (for qualitative analytes), REF: reference sample (generally set at 20 ng/mL). Samples in grey italics are repeated samples; while they are necessary for calculations and evaluation of validation criteria, or might require re-injection (e.g., stability experiments), they have been extracted as part of other experiments. ¹ See Figure 3.3

Compounds could also be earmarked for withdrawal of the LC-MS/MS method. The main criteria would be absence of any detection event within the past year (or longer), although several considerations would play in such a decision (see Discussion).

Since the process as a whole (and not the method alone) was accredited under ISO 17025:2017 standards, addition and withdrawal of compounds from the LC-MS/MS screening method are pre-approved by the accrediting body, insofar as validation criteria stated in the process documentation are met.

3.2.3.5 NPS DETECTION IN CASEWORK OVER A ONE-YEAR PERIOD

All cases handled from March 2019 to March 2020 underwent NPS screening with the method presented above. Flualprazolam was added at the end of October 2019 (5 months of data), whereas isotonitazene was added in April 2020 and is therefore not included in the prevalence statistics presented for this one-year portrait.

Both blood and urine samples were analyzed when available. A signal-to-noise (S/N, peak-to-peak) reportability threshold of 20:1 was used. A detection had to be confirmed by repeated analysis of the sample or another available matrix. Positive cases were anonymized and compiled in an in-house database, including age, gender and detailed toxicological results. All cases fitting requirements were also submitted to the UNODC Early Warning Advisory Tox-Portal.

All procedures performed in this study involving human biological samples were performed in accordance with the ethical standards of the national research committees (Canadian Institute of Health Research (CIHR), Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC), Social Sciences and Humanities Research Council (SSHRC), 2018) and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

3.2.4 RESULTS AND DISCUSSION

3.2.4.1 DEVELOPMENT OF THE COMPREHENSIVE NPS PROCESS

Historically, our laboratory detected the presence of NPS in casework via a general unknown screening (GUS) GC-MS method relying on research in libraries such as SWGDRUG (SWGDRUG, 2020) and Cayman Chemicals (Cayman Chemical, 2020).

The impetus to develop a more specialized method for NPS detection came with the unfurling of the opioid epidemic in Canada. Higher occurrences of novel synthetic opioids (NSO) were reported from other Canadian provinces, prompting the question as to whether cases were missed in Québec due to the low GC-MS sensitivity. The initial aim was therefore to develop an analytical method for opioids not covered in the standard screening, including a large number of NPS. This explains a number of peculiar features of the final presented method, for example why some non-NPS opioids such as remifentanyl and alfentanil are also screened by this method. The chromatographic gradient was developed with the goal of separating the NSO isomers butyrylfentanyl/isobutyrylfentanyl/cis-3-methylfentanyl, isobutyryl norfentanyl/butyryl norfentanyl, U-47700/AH-7921, U-48800/U-51754, para-fluoroisobutyrylfentanyl/para-fluorobutyrylfentanyl and despropionyl ortho/meta/para-fluorofentanyl, rather than being a generic gradient for all NPS. However, reflections carried out in developing this method, along with increasing detection rates of benzodiazepine-type NPS, led to a re-orientation of method development and project aims to achieve a global response to the NPS problem which would be suitable and sustainable for the laboratory.

As discussed in the introduction, a rounded NPS screening methodology should address the multiple challenges of dynamism, systematic application, sensitivity, specificity, use of basic instrumentation and accreditation. A method or process

achieving perfection on all accounts being impossible, the question of how to achieve an optimal balance, without large compromises on any points, remained open. This is what the process presented here strives to accomplish.

Figure 3.3 shows the global analytical process in place in the laboratory for common drugs and drugs of abuse, and the parts added to execute NPS screening. A first protein precipitation (PPT-A) preparation undergoes a first dilution to be analyzed by LC-MS/MS for common drugs and drugs of abuse (amphetamines, opioids, benzodiazepines, cocaine and metabolites, antidepressants, antipsychotics, etc.). This same protein precipitation (PPT-A) then undergoes a different dilution to be analyzed for cannabinoids and metabolites. A second protein precipitation (PPT-B) is diluted and analyzed for high therapeutic concentration compounds (OTC medications, anti-inflammatory, hydroxybutyric acids, antiepileptics, etc.). Altogether, 201 compounds are quantified or detected based on these two protein precipitation extractions (Côté *et al.*, 2017). A need-based GUS GC-MS method is also present, to be used to detect compounds not already covered by the other methods (for example, if no impairing substance has been detected in a DUID case).

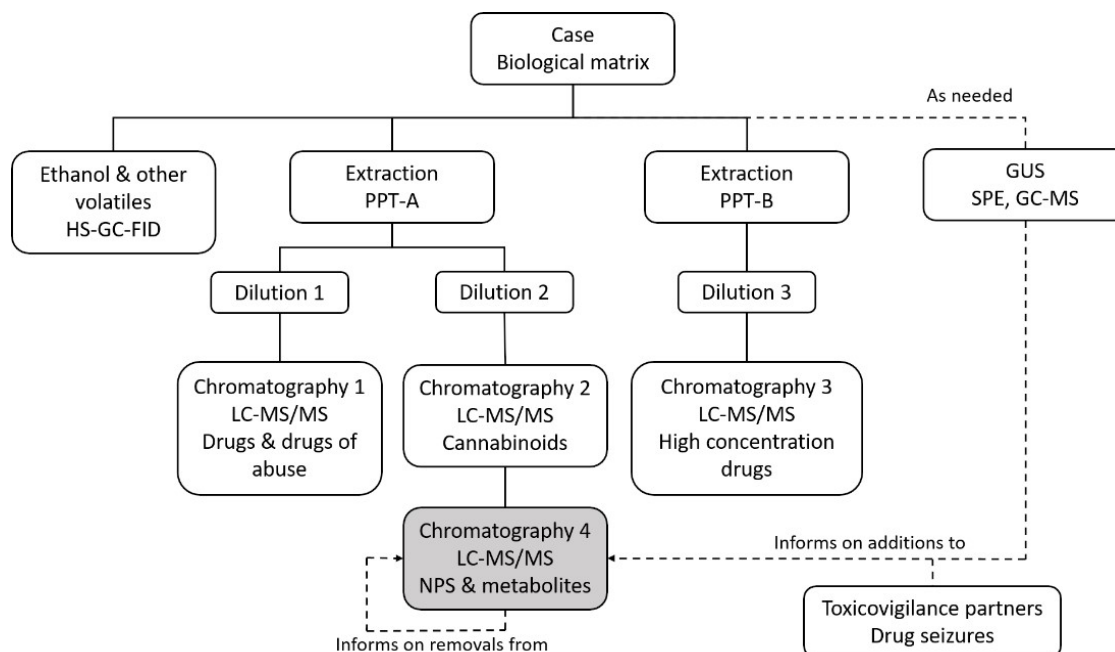


Figure 3.3 Common drugs and drugs of abuse analytical process. Methods used as needed and not included in this figure: biochemical parameters, carboxyhemoglobin, cyanide, volatile organic compounds.

The NPS screening process added to this infrastructure is shown in grey in Figure 3.3. The second dilution from the PPT-A extraction is used for a second chromatography, screening for NPS compounds by LC-MS/MS. This is a fully qualitative identification method, yielding a “present” or “not present” result. Compounds can be added or removed from this chromatographic method following a rapid 82-sample validation. Compound additions are prompted by detection events, inside the laboratory (via the GUS GC-MS method) or outside of it (via toxicovigilance partners such as Health Canada). The goal is to complete compound addition in 1 month or less. Compound removals are prompted by absence of detection in casework for a year or more. The whole NPS process is accredited under ISO 17025:2017 (International Organization for Standardization (ISO) and International Electrotechnical Commission (IEC), 2017) norm, which

means that any compound addition or removal, insofar as validation criteria are met, is automatically approved. Therefore, no extension audit is required.

It is important to note that the exact form taken by an optimally balanced answer to the six-fold NPS challenge will vary from one laboratory to the other. In some laboratories, an SPE may already be used, and this extract could be re-purposed for NPS screening. In other laboratories, a GC-MS(/MS) method could also be used, although absent derivatization and/or more specific extraction, this might mean compromising on the sensitivity. Laboratories should aim to find the optimal balance within their workflow. Obviously, this balance is as strong as the early warning system in place, and notably relies on communication with toxicovigilance partners in the region. Organizations performing analyses of drug seizures can identify new NPS trends from more concentrated and relatively pure material (compared to drugs in biological matrices). It is therefore logical for forensic toxicology laboratories to rely in part on their knowledge. This type of process will work best if one or more individuals in the laboratory have the clear mandate of collecting information on NPS and their emerging trends and suggesting additions/removals to the NPS screening method.

Validation process and results

The validation process used is a trimmed down version of the procedures typically presented in the literature and guidelines (Toxicology Consensus Body, Academy Standards Board (ASB), 2019; Camirand Lemyre *et al.*, 2020; Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2009; U.S Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER) and Center for Veterinary Medicine (CVM), 2018). Every standard validation experiment was examined to determine whether it was relevant for this specific application (NPS systematic screening) and whether its size could be reduced. For example, if analyses are performed for information purposes only,

which is the case for recovery, ionization suppression/enhancement and process efficiency, concentration levels and replicates are dropped in favour of expediency. Stability of NPS in matrix is not analyzed, since it would bring no information susceptible to influence procedures or interpretation. Indeed, even if an analyte was discovered to be unstable, turnaround time for cases could not be shortened more than it already is, nor would it mean that a detection event would not be mentioned in the final report. Stability of NPS in solution was not evaluated, since it also would bring no information susceptible to influence procedures or interpretation, and is moreover prohibitive in terms of time and energy required. An unstable analyte in solution would have little impact on the method besides shortening the expiration date of the mix used to spike reference samples with each batch. While guidelines such as the ASB (24) might require the use of 10 or more matrices to evaluate interferences from the matrices, the procedure presented here uses 7 blood and 7 urine matrices, for a total of 14. This is also part of trimming down the validation process. In the end, this reduction in the number of samples and parameters analyzed was part of a risk analysis process, a concept at the forefront of ISO 17025:2017 (ISO/IEC, 2017). There is a risk inherent to shrinking the validation process; but in the NPS context, there is also a risk inherent to delaying a validation process, or making it so complex that method dynamism becomes impossible (i.e., a risk of missing cases). While the laboratory's accreditation organisation endorsed this risk analysis and its conclusions, other laboratories or other accreditation organisation might come to different conclusions and wish to increase the number of samples, replicates, concentration levels, or validation parameters analyzed, or might wish to tighten validation criteria. This would also be a valid approach. Results of the validation process, as presented in "Materials and Methods", are detailed in the following sections.

Limit of detection (LOD)

Demonstrated limits of detection in blood and urine for each analyte can be found in Table 3.3. LODs vary from 0.01 ng/mL to 20 ng/mL, but most analytes (46 out of 57, 81%) achieve a sub-1 ng/mL LOD in both blood and urine. In general, LODs are lower in blood than in urine.

Sample extract stability

Sample extract stability in blood and urine are detailed in Table 3.3. Stability varies between less than 24 hours (N-methyl U-47931E in blood; cyclopropylfentanyl, norcarfentanyl and tilidine in urine) to 72 hours or more (50/57 compounds in blood, 44/57 compounds in urine).

Table 3.3 Summary of the validation results.

Analyte	Specificity blood (%)	Specificity urine (%)	LOD blood (ng/mL)	LOD urine (ng/mL)	Blood extract stability (h)	Urine extract stability (h)	Recovery blood (%)	Recovery urine (%)	Process efficiency blood (%)	Process efficiency urine (%)
4-ANPP	100	100	0.5	0.5	72	72	86	104	115	112
7-hydroxymitragynine	100	100	4	20	72	72	200	98	312	149
Acetylfentanyl	100	100	0.1	0.05	72	72	103	102	112	89
Acrylfentanyl	93	100	0.05	0.25	72	72	105	106	125	111
AH-7921	100	100	20	20	72	72	86	103	11	127
Alfentanyl	100	100	0.1	0.1	72	72	105	103	139	113
Benzyl acrylfentanyl	93	87	20	4	72	48	102	102	115	105
Benzyl carfentanyl	100	100	0.1	0.25	72	72	102	104	142	135
Benzylfentanyl	100	93	0.05	0.1	72	72	103	100	121	104
Beta-hydroxythiofentanyl	100	100	0.5	4	72	72	108	107	118	116
Butyrylfentanyl	100	100	0.05	0.1	72	72	105	100	162	147
Carfentanil	100	100	0.25	0.25	48	72	103	101	149	145
Cis-3-methyl norfentanyl	93	100	0.25	1	72	72	92	101	90	84
Cis-3-methylfentanyl	100	100	1	1	48	72	100	105	145	150
Cyclopropyl norfentanyl	100	100	0.25	4	72	72	98	100	103	101
Cyclopropylfentanyl	100	93	0.05	0.25	72	< 24	100	106	136	130
Desomorphine	100	80	0.1	0.5	72	72	93	104	89	54
Despropionyl meta-fluorofentanyl	100	100	0.05	0.25	48	72	90	99	126	136

Analyte	Specificity blood (%)	Specificity urine (%)	LOD blood (ng/mL)	LOD urine (ng/mL)	Blood extract stability (h)	Urine extract stability (h)	Recovery blood (%)	Recovery urine (%)	Process efficiency blood (%)	Process efficiency urine (%)
Despropionyl ortho-fluorofentanyl	100	100	0.1	0.25	72	24	95	101	117	120
Despropionyl ortho-methylfentanyl	100	100	0.05	0.05	72	48	85	103	136	157
Despropionyl para-fluorofentanyl	100	93	0.05	0.25	72	48	85	102	131	136
Etizolam	100	100	0.05	0.05	72	72	107	99	112	113
Fentanyl	100	93	0.05	0.05	72	72	102	108	126	113
Flualprazolam	86	100	0.01	0.01	72	72	104	104	112	119
Flubromazolam	100	100	0.05	0.05	72	72	103	105	116	132
Furanyl norfentanyl	100	100	0.25	0.5	72	72	100	106	112	123
Furanylfentanyl	100	93	0.05	0.25	72	72	102	104	148	131
Iso/Butyryl norfentanyl	100	100	0.1	0.25	72	72	101	106	106	114
Isobutyrylfentanyl	100	93	0.05	0.25	48	72	101	101	151	143
Isotonitazene	100	100	0.25	0.5	144	144	51	27	149	96
Methoxyacetyl norfentanyl	93	93	4	20	72	72	93	101	111	98
MT-45	100	100	0.05	0.05	72	72	98	94	242	210
N-benzylphenyl norfentanyl	100	100	0.1	0.25	72	72	104	100	173	168
N-desmethyl U-47700	100	100	0.05	0.1	48	24	94	105	117	120
N-methyl cyclopropyl norfentanyl	100	85	0.1	1	72	72	106	106	102	87
N-methyl norcarfentanyl	100	100	0.25	0.1	72	48	105	104	106	90

Analyte	Specificity blood (%)	Specificity urine (%)	LOD blood (ng/mL)	LOD urine (ng/mL)	Blood extract stability (h)	Urine extract stability (h)	Recovery blood (%)	Recovery urine (%)	Process efficiency blood (%)	Process efficiency urine (%)
N-methyl U-47931E	100	100	0.05	0.05	< 24	72	104	105	108	86
Norbuprenorphine	100	100	4	4	72	24	60	110	92	104
Norcarfentanyl	100	100	0.25	0.25	72	< 24	101	105	112	196
Norfentanyl	100	100	0.25	0.5	72	72	99	106	104	101
Norsufentanil	100	100	0.1	0.05	72	48	99	104	99	99
Ocfentanil	100	100	0.05	0.1	72	48	107	107	118	93
Para-fluorobutyrylfentanyl	100	100	0.1	0.05	48	48	99	100	191	159
Para-fluorofentanyl	100	93	0.05	1	72	72	104	101	134	114
Para-fluoroisobutyrylfentanyl	100	100	0.05	0.5	72	72	103	101	168	159
Pentazocine	100	100	0.1	0.5	72	72	103	105	117	107
Remifentanil	100	100	0.05	0.5	72	72	91	96	96	85
Sufentanil	100	100	0.05	0.05	72	72	102	103	173	169
Thienylfentanyl	100	100	0.25	1	72	72	106	99	118	95
Tilidine	100	100	0.25	0.25	72	< 24	105	108	97	93
U-47700	100	100	0.1	0.1	72	48	99	105	116	105
U-47931E	100	100	0.25	0.1	72	72	99	105	107	95
U-48800	100	100	0.05	0.05	72	72	101	104	145	132
U-49900	100	100	0.05	0.05	72	72	98	101	122	123
U-50488	100	100	0.05	0.05	72	72	98	105	160	170
U-51754	100	100	0.1	0.25	72	72	102	103	160	155
Valeryl fentanyl	100	100	0.05	0.05	48	72	102	95	261	237

Interferences

As shown in Table 3.3, 80% of the blood/urine matrices were free of interferences from the matrix for all analytes, thus meeting validation criteria. However, in order to do so, the retention time window had to be reduced from ± 0.1 minute of expected retention time to ± 0.05 minute for acetylfentanyl, cis-3-methyl norfentanyl and norcarfentanyl, since these compounds showed resolved interferences from the matrix. Whereas mitragynine and acetyl norfentanyl were initially included in the panel, they were dropped due to the systematic interferences observed from both blood and urine. The criterion requiring 80% of matrices to be free of interference from the matrix means one out of the seven blood or urine sources analyzed can show interference in one of the transitions. Leaving the window open for one matrix to present interferences gives necessary flexibility in the presence of putrefied matrices in the analyzed lot. In any event, the presence of a 20:1 signal-to-noise threshold and ion ratio criteria for reporting reduce significantly the false negative risks.

Interferences from other drugs are hard to avoid entirely in the NPS realm, where there are numerous structural isomers. This method is no exception. Most interferences could be avoided via careful selection of MRM transitions or chromatographically separated. For example, Figure 3.4 shows the chromatographic separation of cis-3-methylfentanyl (A), isobutyrylfentanyl (B) and butyrylfentanyl (C). While separation was achieved for all pairs, albeit not baseline separation, taking advantage of specific MRM transitions allowed to fully distinguish cis-3-methylfentanyl (A, MRM transitions 351 \rightarrow 202 and 351 \rightarrow 295) from isobutyrylfentanyl (B, MRM transitions 351 \rightarrow 105 and 351 \rightarrow 188). Isomer pairs U-47700 and AH-7921, para-fluorobutyrylfentanyl and para-fluoroisobutyrylfentanyl as well as U-51754 and U-48800 were completely chromatographically resolved and did not show any interferences. However, butyryl norfentanyl and isobutyryl norfentanyl completely co-elute under the

method's conditions and could not be differentiated; their set of MRM transitions were thus labeled iso/butyryl norfentanyl to indicate that a detection event could be linked to the presence of either compounds. None of the 144 common drugs and drugs of abuse nor any of the 36 internal standards tested caused any interferences for the targeted analytes. Moreover, the NPS compounds targeted did not create any interference for compounds and internal standards monitored in the other routine targeted methods.

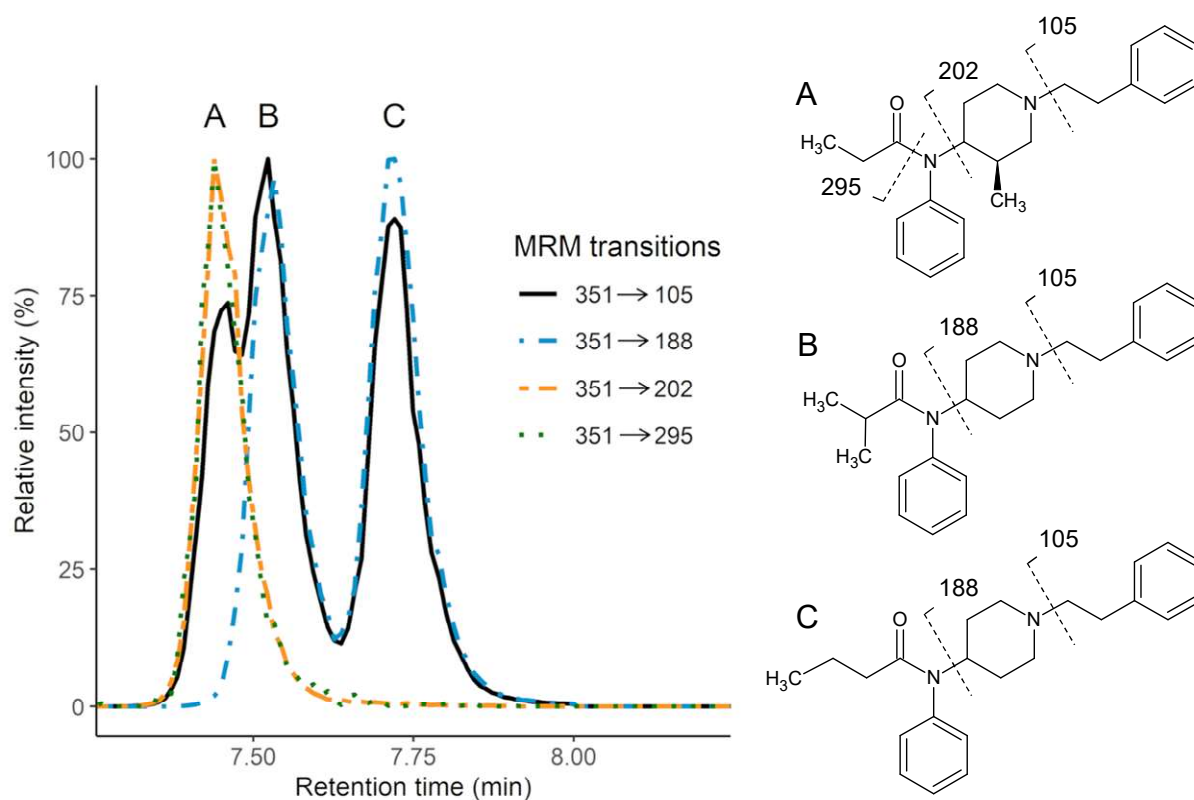


Figure 3.4 Chromatographic separation and fragmentation of cis-3-methylfentanyl (A), isobutyrylfentanyl (B) and butyrylfentanyl (C).

Carryover

Significant carryover following a 200 ng/mL sample was detected for cis-3-methyl norfentanyl (56% and 44% of LOD peak area in blood and urine, respectively) and flualprazolam (65% and 44% of LOD peak area in blood and urine, respectively). No carryover was detected following a 20 ng/mL sample. Although this did not prevent validation, it is a limitation of the method and indicates that samples injected after high concentration samples of cis-3-methyl norfentanyl or flualprazolam should be checked for potential carryover.

Extraction recovery, ionization suppression/enhancement and process efficiency

Extraction recovery and process efficiency results are presented in Table 3.3. Recovery for all but 3 analytes fell within 86% to 108% in blood and 94% to 108% in urine. The outliers were 7-hydroxymitragynine (200% in blood), norbuprenorphine (60% in blood) and isotonitazene (51% in blood and 27% in urine). Process efficiency was generally higher than recovery. Ionization suppression/enhancement results showed enhancement effects by both blood and urine, with a median value of 199% and 236% respectively. No validation criteria were imposed for these figures, which were collected for information purposes only.

Compound removal

The concept of risk analysis is key in the decision to remove a compound from the validated method. While removing a compound introduces the risk of missing an identification, there is a price to pay in keeping it in the method. Reference materials need to be purchased and kept on inventory, more and more complex stock solutions need to be made as compounds are added to the method but never removed. Furthermore, this would mean increasing the number of simultaneous MRM transitions analyzed, reducing the number of points per peak. If the

compound has not been seen in casework nor seized on the territory in several years, the risk analysis might be in favour of removing the compound. Or the MRM transitions might be monitored, without the presence of the compound in the reference sample. The final decision depends on the risk analysis proper to the circumstances of each laboratory. Thus far, no compound removal has been carried out for the presented method.

3.2.4.2 NPS DETECTION IN CASEWORK OVER A ONE-YEAR PERIOD

A total of 5 079 cases were screened for NPS between March 15, 2019 and March 15, 2020 using the validated method (29% DUID, 12% sexual assaults and 59% post-mortem). Of these, 175 cases (3.4%) tested positive for at least one NPS. The vast majority of these cases were DUID (140 cases, 80%), with only 30 post-mortem cases (17%) and 5 sexual assault cases (3%), with a clear overrepresentation of DUID cases compared to the overall breakdown. New synthetic benzodiazepines were detected in 165 cases (94%) and novel synthetic opioids in 8 cases (5%). In the remaining 2 cases (1%), both novel synthetic benzodiazepines and opioids were detected. Figure 3.5 displays the number of cases for each of the 10 most detected NPS.

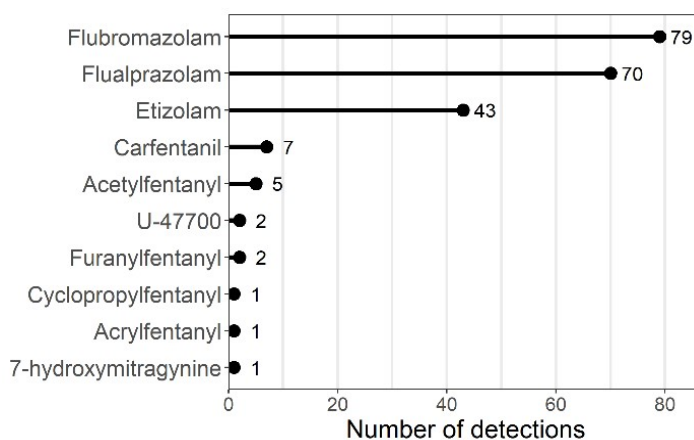


Figure 3.5 Occurrences of the ten most detected NPS.

In 19% of cases, more than one NPS was detected, with a maximum of 6 NPS being detected in the same case. In 7 of these cases, the NPS was the single toxicology finding. In the remainder of the cases, cannabis (57%), methamphetamine (36%) and cocaine (33%) were most often detected in combination with NPS. These numbers roughly match the overall prevalence in the general laboratory casework. Most NPS consumers were men (88%), with an average age of 28 years old (median 24 Y.O., range 24 to 77 Y.O.).

As stated above, most of the compounds included in the initial validation contingent were NSO. However, two benzodiazepines (flubromazolam and etizolam) were also included. Flubromazolam was first detected in late 2017 by GC-MS. This was part of an increasing number of DUID cases where the suspect claimed to have taken Xanax®, but in which alprazolam was not detected – rather, flubromazolam, etizolam, or both, were detected by GC-MS. This observation was confirmed by the emission in early 2019 of public health advisories about the presence of counterfeit Xanax® in the province of Québec (Lampron-Goulet et Sainton, 2019). Given their known increasing prevalence, inclusion in the NPS screening seemed critical – even more so than the NSO compounds initially targeted. Continued strategic monitoring later picked up the presence of flualprazolam in May 2019, after the initial method validation was completed. Detected in three different DUID cases by GC-MS and in drug seizure analyses made by Health Canada, flualprazolam was officially part of the NPS screening method 5 months after a decision was made to add this compound. This was considerably off-target (aim <1 month), due to the concurrent development of paperwork and procedure for validation of an addition to the method. Nevertheless, this allowed the systematic screening of a compound which became the most prevalent NPS in the province of Québec (Figure 3.6). This example is eloquent with regards to the power of the complete process to detect emerging NPS trends and monitor them adequately afterwards.

Indeed, Figure 3.6 shows the lifecycle of 3 benzodiazepine-type NPS, with flubromazolam being replaced with flualprazolam in counterfeit Xanax®.

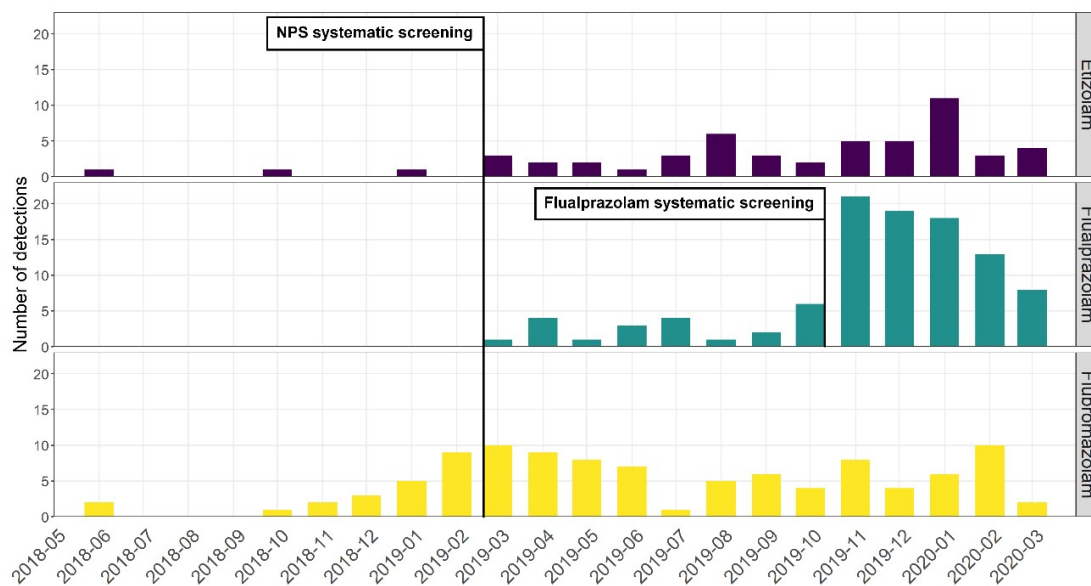


Figure 3.6 Detection occurrences over time for three benzodiazepine-type NPS.

Another subsequent addition was made to the method, this time for the NSO isotonitazene. First detected in Canada in March 2019 (Krotulski *et al.*, 2019), nine months went by until it was detected in the province of Québec in pills seized by Health Canada’s Drug Analysis Service in November 2019. It was not detected in any casework’s biological matrices, but this could be due to the unspecific GC-MS spectrum and low sensitivity of this technique for isotonitazene. Its presence in pills was later discussed in the media, which prompted several requests for analysis by coroners. All of these elements taken together led to the decision to add isotonitazene to the NPS screening method, which was done within one month and half (April 2020). The considerable disruptions in lab staffing brought by the COVID-19 pandemic explain why the one-month target was missed by two weeks. Yet, having the quality assurance documentation and process ready considerably decreased validation time. This experience demonstrates how preparedness and

work on multiple aspects (toxicovigilance, quality documentation, GUS) comes together to allow rapid reaction to the ever changing NPS picture within a validated framework.

Critically, this process focuses on systematic screening for the NPS present on the laboratory's territory. Therefore, NPS classes highly prevalent in other provinces or other continents (e.g., synthetic cannabinoids, synthetic cathinones, hallucinogen-type NPS) are not covered in the method presented here as their detection in biological specimens or in seized drugs is absent or anecdotal in the province of Québec. The specific list of substances targeted would be different for a laboratory covering casework from another territory. However, were the internal early warning system described above to detect an increased prevalence in one of the NPS classes not currently covered, these compounds would be added to the method.

Implementation of this complete and validated analytical process resulted in a drastic reduction of NPS underreporting. In 2018, NPS appeared on only 24 toxicology reports (0.76% case prevalence) following a positive GC-MS GUS or specialized external laboratory result. In the one year following the enactment of this process, NPS were reported in 175 cases (3.4% positivity rate). This four-fold increase in detection could hardly be due exclusively to the increase in NPS presence in the province of Québec. Interestingly, this NPS prevalence is similar to what has been reported in clinical and forensic casework throughout the world. Vaiano et al. reported a 5.4% prevalence in intoxication cases (Vaiano *et al.*, 2019); the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction reported a 4% prevalence in acute intoxications (EMCDDA, 2019); and the Netherlands Forensic Institute reported an average 2.9% incidence rate (Hondebrink *et al.*, 2020).

One major finding of the one-year systematic screening period is the high prevalence of benzodiazepine-type NPS compounds. Similar numbers have been reported in Norway (Heide *et al.*, 2020): from 2016 to 2019, the overall prevalence (2%), type of cases (mostly DUID) and gender distribution (87% men) is similar to what has been observed in this study (3.4% prevalence, 80% DUID and 88% men). However, in contrast with the findings in Québec, diclazepam and phenazepam were the most common findings, with flubromazolam, etizolam and flualprazolam being significantly less prevalent.

Another major finding was the extremely low prevalence of NSO in casework. This is coherent with other provincial data on opioid-related deaths (Garneau, Huynh, et al., 2019; Special Advisory Committee on the Epidemic of Opioid Overdoses, 2020), which shows that Québec is one of the states/provinces least affected by the opioid crisis in North America. However, there is no way of knowing whether NSO were more present prior to the validation of this screening method.

Within the LC-MS/MS screening method, a minority of compounds and metabolites screened generate the detection events. To increase efficiency of the process, a number of compounds will be removed from the method (most likely at the same time the next addition will be performed). Their detection will be relegated to the internal (GC-MS GUS) and external (toxicovigilance partners) EWS, ready to be added anew to the method as needed.

3.2.5 CONCLUSIONS

This complete analytical process, from identification of an NPS threat to its implementation in systematic LC-MS/MS screening, succeeded in achieving a more balanced response to the intricate challenges posed by NPS in forensic toxicology.

1) It keeps pace with emerging NPS trends in the region. Addition of compounds to the method is not instantaneous, but it is fast for a fully accredited and targeted one. The GUS GC-MS method (and LC-QToF, if available) can detect some cases prior to completion of the validation process. A qualitative identification method was preferred over a quantification or a qualitative threshold one, because it allowed to trim down radically validation operations. Quantitation can still be performed for certain cases if needed by an in-house standard addition protocol or by external specialized laboratories.

2) It is applied to all cases treated by the laboratory (i.e., systematic screening). This method achieves minimal disruption of the standard analytical workflow by design: it uses existing extract, column and mobile phases to expand detection capabilities. The only requirement for implementation of this systematic NPS screening was instrument time and data analysis time (which, given the low positivity rate, is greatly reduced compared to standard systematic methods).

3) With sub-0.1 ng/mL LODs for most compounds, it is sensitive enough to detect low concentrations of NPS in biological matrices. Of course, lower LODs could have been achieved by optimizing further the chromatography (including the chromatographic column and mobile phases) and/or by using a more specific extraction, such as solid phase extraction (SPE). However, this would have entailed unacceptable compromises on other elements, most notably on the ability to use this method for systematic screening.

4) Combination of chromatography and careful selection of MRM transitions yields a method specific enough to avoid misidentification of several pairs of structural isomers. Of course, the generic nature of the chromatography used (which will not be modified as additions are made) combined with constantly appearing NPS compounds, means this is one of the challenges with the least complete solution. Chromatography was developed to separate isomers within a reasonable total

time, but whether it does so for a specific pair of isomers later identified and added is luck. However, MRM transitions can be handled to benefit the addition of a new compound. Upon analysis of a certified reference material (CRM), all potential transitions in the higher sensitivity range can be retained for validation experiments. Upon analysis of the interference experiment results, the two most sensitive transitions free of interferences can be kept for addition, while the others are removed.

5) It uses instrumentation available to the vast majority of forensic toxicology laboratories, a triple quadrupole LC-MS/MS. Not only is this instrumentation widely available, it can also easily withstand sustained high throughput operations.

6) By accrediting the method as part of an NPS screening process under the ISO 17025:2017 norm, the method can be dynamic *and* continuously accredited.

The four-fold increase in detection demonstrates the efficiency of the proposed solution. While the exact solution implemented will vary from one laboratory to the other, the general principles guiding the implementation of such process could be used for a similar outcome.

CONCLUSION

Les problématiques et défis apportés par l'émergence fulgurante des nouvelles substances psychoactives (NSP) depuis le début du XXI^e siècle sont imposants. De nombreuses caractéristiques les distinguent des drogues traditionnelles : leur nouveauté, le manque de connaissances sur leur toxicité, leur pharmacodynamique et pharmacocinétique, leur cycle de vie très court, leur grand nombre, les multiples analogues structurels possibles, leur diversité et hétérogénéité, etc. Le présent projet avait pour but de développer, valider et appliquer un nouveau cadre d'analyse des NSP qui répond aux exigences particulières à ces drogues.

Afin de développer des mesures législatives efficaces de santé et de sécurité publique dans la lutte aux NSP, les laboratoires doivent être en mesure de les détecter de manière rapide, efficace et adéquate. Par conséquent, les laboratoires de toxicologie clinique et judiciaire qui doivent détecter les NSP dans des matrices biologiques complexes se heurtent à de multiples exigences analytiques et opérationnelles. Face à celles-ci, les méthodes traditionnelles de dépistage (non ciblées par GC-MS ou ciblées par LC-MS/MS) qui sont utilisées seules ne sont pas suffisantes pour gérer adéquatement l'émergence et la disparition rapide des NSP. Les laboratoires de toxicologie doivent donc développer des méthodes qui sont : dynamiques et peuvent s'ajuster à l'évolution rapide des NSP dans leur région, appliquées systématiquement à tous les cas traités, sensibles, spécifiques, utilisent des instruments accessibles dans la majorité des laboratoires de toxicologie, tels les LC-MS/MS et sont accréditées selon la norme de qualité internationale ISO 17025.

Les stratégies analytiques publiées jusqu'à maintenant, bien que souvent sensibles et spécifiques, manquent fondamentalement du dynamisme, de l'agilité et de l'efficacité nécessaires pour affronter les NSP. Le processus développé dans le cadre de cette étude répond à ces six exigences sous la forme d'une méthode LC-MS/MS validée et accréditée pour la détection de 57 NSP et métabolites dans les matrices biologiques par précipitation des protéines. De plus, cette nouvelle méthode est dotée d'un système de surveillance interne et externe, ainsi que d'un mécanisme accrédité d'ajout et de retrait rapide de composés dans la méthode LC-MS/MS.

La méthodologie développée a été complètement intégrée au schéma analytique déjà en place au LSJML afin d'en augmenter l'efficacité et d'assurer un dépistage systématique de tous les dossiers traités. Outre son intégration spécifique au fonctionnement du LSJML, les grands principes de ce processus peuvent être implantés dans n'importe quel laboratoire utilisant une méthode d'extraction à large spectre (ex : extraction sur phase solide, extraction liquide-liquide, etc.).

En résumé, le processus développé a été utilisé sur 5 079 dossiers traités entre mars 2019 et mars 2020. La prévalence des NSP dans les dossiers examinés au LSJML durant cette année a fait un bond d'un facteur 4 par rapport à l'année précédente, où seule l'analyse par GC-MS était utilisée pour certains cas particuliers. De plus, deux NSP nouvellement présentes au Québec ont été détectées, prouvant ainsi son utilité et son efficacité de dépistage. Bien que les NOS aient créé les premières inquiétudes au pays par leur relation à la crise des opioïdes, leur prévalence au Québec s'est avérée plutôt faible. Par contre, les nouvelles benzodiazépines de synthèse ont été vingt fois plus prévalentes dans les dossiers analysés.

Les perspectives d'avenir pour ce projet sont nombreuses : intégration d'un instrument haute résolution au mécanisme de surveillance interne, passage d'une

méthode LC-MS/MS qualitative simple à une méthode qualitative avec seuil, ajout d'une méthode de quantification par ajout dosé dans le sang pour certains dossiers spécifiques, etc. Cette dernière avenue est déjà entamée au niveau expérimental et permettra de fournir des données cruciales pour l'avancement des connaissances sur les NSP. En effet, l'obtention des concentrations sanguines des NSP dans le cas d'intoxications ou de décès pourrait éventuellement permettre de les interpréter toxicologiquement (concentrations sanguines thérapeutique, toxique ou létale) au même titre que d'autres drogues. Par contre, le temps, l'énergie et le coût investi par les laboratoires pour développer des méthodes quantitatives complètes ciblant les NSP sont grandement supérieurs aux bénéfiques. Les exigences réglementaires plus élevées et le protocole de validation plus coûteux pour des méthodes quantitatives par rapport à la proportion relativement faible de dossiers positifs explique pourquoi cette avenue n'a pas été envisagée. L'utilisation d'une quantification par ajout dosé permet de contourner cela en dopant la courbe de calibration directement dans la matrice sanguine à quantifier. Cela limite la validation expérimentale et permet d'effectuer la procédure seulement sur les dossiers qui le nécessitent réellement.

Le travail présenté dans ce mémoire constitue le premier portrait juste et précis de la prévalence des NSP au Québec. Il sera continuellement mis à jour dans les prochaines années afin de mieux suivre l'évolution de la situation. Une meilleure compréhension du phénomène sur le territoire québécois pourra maintenant servir d'outil d'orientation pour d'éventuelles actions législatives, préventives ou correctives utilisées pour endiguer la progression NSP dans la province.

BIBLIOGRAPHIE

- 2005/387/JAI: *Décision du Conseil du 10 mai 2005 relative à l'échange d'informations, à l'évaluation des risques et au contrôle des nouvelles substances psychoactives.* (2005, 10 mai). JO L 127, 20.5.2005.
- 97/396/JAI: *Action commune du 16 juin 1997 fondée sur l'article K.3 du traité sur l'Union européenne, relative à l'échange d'informations, à l'évaluation des risques et au contrôle des nouvelles drogues de synthèse.* (1997, 16 juin). JO L 167, 25.6.1997.
- Allen, L., O'Connell, A. et Kiermer, V. (2019). How can we ensure visibility and diversity in research contributions? How the Contributor Role Taxonomy (CRediT) is helping the shift from authorship to contributorship. *Learned Publishing*, 32(1), 71-74. doi: 10.1002/leap.1210
- Andeason, M. F., Hardlei, T. F., Rosendal, I., Hedegaard Thomsen, A., Johannsen, M. et Saedder, E. (2018). A Fatal Poisoning Involving 2-fluorofentanyl. Affiche présentée à la 55e rencontre annuelle TIAFT/SOFT 2018, Boca Raton, Floride.
- Armenian, P., Vo, K. T., Barr-Walker, J. et Lynch, K. L. (2017). Fentanyl, fentanyl analogs and novel synthetic opioids: A comprehensive review. *Neuropharmacology*, 134(A), 121-132. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.10.016
- Bäckberg, M., Beck, O., Jönsson, K.-H. et Helander, A. (2015). Opioid intoxications involving butyrfentanyl, 4-fluorobutyrfentanyl, and fentanyl from the Swedish STRIDA project. *Clinical Toxicology*, 53(7), 609-617. doi: 10.3109/15563650.2015.1054505
- Baum, R. M. (1985). New Variety of Street Drugs Poses Growing Problem. *Chemical & Engineering News Archive*, 63(36), 7-16. doi: 10.1021/cen-v063n036.p007

- Belzak, L. et Halverson, J. (2018). The opioid crisis in Canada: a national perspective. *Health promotion and chronic disease prevention in Canada : research, policy and practice*, 38(6), 224-233. doi: 10.24095/hpcdp.38.6.02
- Brandt, S. D., King, L. A. et Evans-Brown, M. (2014). The new drug phenomenon. *Drug Testing and Analysis*, 6(7-8), 587-597. doi: 10.1002/dta.1686
- Camirand Lemyre, F., Desharnais, B., Laquerre, J., Morel, M.-A., Côté, C., Mireault, P. et Skinner, C. D. (2020). Qualitative threshold method validation and uncertainty evaluation: a theoretical framework and application to a 40 analytes LC-MS/MS method. *Drug testing and analysis*. 2020(12), 1287-1297. doi: 10.1002/dta.2867
- Canada. Santé Canada. Service d'analyse des drogues. (2019). *Rapport sommaire des échantillons analysés en 2018*. Dans *Substances contrôlées et précurseurs chimiques*. Récupéré le 24 mai 2020 de <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/preoccupations-liees-sante/substances-controlees-precurseurs-chimiques/service-analyse-drogues/2018-service-analyse-drogues-rapport-sommaire-echantillons-analyses.html>
- Canadian Institute of Health Information (CIHI). (2017). *Pan-Canadian trends in the prescribing of opioids, 2012 to 2016*. Ottawa, Ontario, Canada : l'auteur. Récupéré de <https://www.cihi.ca/sites/default/files/document/pan-canadian-trends-opioid-prescribing-2017-en-web.pdf>
- Canadian Institute of Health Research (CIHR), Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC), Social Sciences and Humanities Research Council (SSHRC). (2018). *Tri-Council Policy Statement - Ethical Conduct for Research Involving Humans*. Ottawa, Ontario, Canada : l'auteur.
- Cayman Chemical. (2020). *Cayman Spectral Library* [Base de données]. Récupéré de <https://www.caymanchem.com/forensics/publications/csl>
- Center for Forensic Science Research and Education. (2019). *Potent Synthetic Opioid – Isotonitazene – Recently Identified in the Midwestern United States*. Public Health Alert. Récupéré de <https://www.npsdiscovery.org/potent-synthetic-opioid-isotonitazene-recently-identified-in-the-midwestern-united-states/>

- Center for Forensic Science, Research and Education (CFSRE). (2020). *NPS Discovery - Trend reports*. Récupéré le 16 juillet 2020 de <https://www.npsdiscovery.org/reports/trend-reports/>
- Chan, S., Wu, J. et Lee, B. (2019). Fatalities related to new psychoactive substances in Singapore—A case series. *Forensic Science International*, 304, 109892. doi: 10.1016/j.forsciint.2019.109892
- Chindarkar, N. S., Park, H.-D., Stone, J. A. et Fitzgerald, R. L. (2015). Comparison of Different Time of Flight-Mass Spectrometry Modes for Small Molecule Quantitative Analysis. *Journal of Analytical Toxicology*, 39(9), 675-685. doi: 10.1093/jat/bkv057
- Comité consultatif spécial sur l'épidémie de surdoses d'opioïdes. (2020). *Méfaits associés aux opioïdes au Canada*. Ottawa: Agence de la santé publique du Canada, mars 2020. Récupéré le 7 mai 2020 de <https://sante-infobase.canada.ca/mefaits-associes-aux-substances/opioides>
- Comité consultatif spécial sur l'épidémie de surdoses d'opioïdes. (2018). *Rapport national : Décès apparemment liés à la consommation d'opioïdes au Canada (de janvier 2016 à septembre 2017)* Ottawa : Agence de la santé publique du Canada, mars 2018. Récupéré de <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/publications/vie-saine/rapport-national-deces-apparemment-lies-consommation-opioides-publie-mars-2018.html>
- Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). (2009). *Guideline on bioanalytical method validation* (EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2). United Kingdom : l'auteur.
- Convention sur les substances psychotropes*. (1971, 21 février). RTNU, vol. 1019, p. 175.
- Convention unique sur les stupéfiants*. (1961, 30 mars). RTNU, vol. 520, p. 151.
- Côté, C., Desharnais, B., Morel, M.-A., Laquerre, J., Taillon, M.-P., Daigneault, G., Skinner, C.D., Mireault, P. (2017). High Throughput Protein Precipitation: Screening and Quantification of 106 Drugs and their metabolites using LC-MS/MS. Communication présentée à la 55e rencontre annuelle TIAFT/SOFT 2018, Boca Raton, Floride.

- Dart, R. C., Surratt, H. L., Cicero, T. J., Parrino, M. W., Severtson, S. G., Bucher-Bartelson, B. et Green, J. L. (2015). Trends in Opioid Analgesic Abuse and Mortality in the United States. *New England Journal of Medicine*, 372(3), 241-248. doi: 10.1056/NEJMsa1406143
- Drummer, O. H. (2010). Forensic toxicology. Dans A. Luch (dir.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Experientia Supplementum*. (vol. 100, p. 579-603). Birkhäuser Basel.
- Elliott, S. et Evans, J. (2014). A 3-year review of new psychoactive substances in casework. *Forensic Sci Int*, 243, 55-60. doi: 10.1016/j.forsciint.2014.04.017
- EMCDDA - Eurojust. (2016). *New psychoactive substances in Europe: Legislation and prosecution - current challenges and solutions*. Luxembourg : Publications Office of the European Union.
- EMCDDA. (2019). *European Drug Report 2019 : Trends and Developments*. Luxembourg : Publications Office of the European Union.
- EMCDDA. (2020). *New Psychoactive Substances (NPS)*. Récupéré le 18 mai 2020 de https://www.emcdda.europa.eu/topics/nps_en
- Favretto, D., Pascali, J. P. et Tagliaro, F. (2013). New challenges and innovation in forensic toxicology: focus on the "New Psychoactive Substances". *J Chromatogr A*, 1287, 84-95. doi: 10.1016/j.chroma.2012.12.049
- Flanagan, R. J., Cuypers, E., Maurer, H. H. et Whelpton, R. (2020). *Fundamentals of Analytical Toxicology: Clinical and Forensic* (2^e éd.). United Kingdom : John Wiley & Sons, Ltd.
- Fogarty, M. F., Papsun, D. M. et Logan, B. K. (2018). Analysis of Fentanyl and 18 Novel Fentanyl Analogs and Metabolites by LC-MS-MS, and report of Fatalities Associated with Methoxyacetylfentanyl and Cyclopropylfentanyl. *J Anal Toxicol*, 42(9), 592-604. doi: 10.1093/jat/bky035
- Garneau, B., Desharnais, B., Beauchamp-Doré, A., Lavallée, C., Mireault, P. et Lajeunesse, A. (2019). Challenges Related to Three Cases of Fatal Intoxication to Multiple Novel Synthetic Opioids. *Journal of Analytical Toxicology*, 44(1), 86-91. doi: 10.1093/jat/bkz018

- Garneau, B., Desharnais, B., Laquerre, J., Côté, C., Taillon, M. P., Martin, P. Y., ... Lajeunesse, A. (2020). A comprehensive analytical process, from NPS threat identification to systematic screening: Method validation and one-year prevalence study. *Forensic Sci Int*, 318, 110595. doi: 10.1016/j.forsciint.2020.110595
- Garneau, B., Huynh, J., Martel, L., Desharnais, B., Mireault, P. et Lajeunesse, A. (2019). When cultural differences breed a separate toxicological ecosystem: the province of Québec (Canada) and the opioids crisis. Affiche présenté à la 57e rencontre annuelle TIAFT 2019, Birmingham, United Kingdom.
- Goromaru, T., Matsuura, H., Yoshimura, N., Miyawaki, T., Sameshima, T., Miyao, J., ... Baba, S. (1984). Identification and quantitative determination of fentanyl metabolites in patients by gas chromatography--mass spectrometry. *Anesthesiology*, 61(1), 73-77.
- Graziano, S., Anzillotti, L., Mannocchi, G., Pichini, S. et Busardò, F. P. (2019). Screening methods for rapid determination of new psychoactive substances (NPS) in conventional and non-conventional biological matrices. *J Pharm Biomed Anal*, 163, 170-179. doi: 10.1016/j.jpba.2018.10.011
- Griffiths, P., Evans-Brown, M. et Sedefov, R. (2013). Getting up to speed with the public health and regulatory challenges posed by new psychoactive substances in the information age. *Addiction*, 108(10), 1700-1703. doi: 10.1111/add.12287
- Heide, G., Høiseth, G., Middelkoop, G. et Øiestad Å, M. L. (2020). Blood concentrations of designer benzodiazepines: Relation to impairment and findings in forensic cases. *J Anal Toxicol*. doi: 10.1093/jat/bkaa043
- Helander, A. et Bäckberg, M. (2017). New Psychoactive Substances (NPS) – the Hydra monster of recreational drugs. *Clinical Toxicology*, 55(1), 1-3. doi: 10.1080/15563650.2016.1217003
- Helander, A., Bäckberg, M. et Beck, O. (2020). Drug trends and harm related to new psychoactive substances (NPS) in Sweden from 2010 to 2016: Experiences from the STRIDA project. *PLOS ONE*, 15(4), e0232038. doi: 10.1371/journal.pone.0232038

- Helander, A., Beck, O., Hägerkvist, R. et Hultén, P. (2013). Identification of novel psychoactive drug use in Sweden based on laboratory analysis--initial experiences from the STRIDA project. *Scand J Clin Lab Invest*, 73(5), 400-406. doi: 10.3109/00365513.2013.793817
- Henderson, G. (1988). Designer Drugs: Past History and Future Prospects. *Journal of Forensic Sciences*, 33(2), 569-575. doi: 10.1520/JFS11976J
- Henderson, G. (1991). Fentanyl-Related Deaths: Demographics, Circumstances, and Toxicology of 112 Cases. *Journal of Forensic Sciences*, 36(2), 422-433. doi: 10.1520/JFS13045J
- Hibbs, J., Perper, J. et Winek, C. L. (1991). An Outbreak of Designer Drug—Related Deaths in Pennsylvania. *JAMA*, 265(8), 1011-1013. doi: 10.1001/jama.1991.03460080081037
- Hondebrink, L., Nugteren-van Lonkhuyzen, J. J., Hunault, C. C., van den Berg, J., van der Gouwe, D. et van Riel, A. J. H. P. (2020). New psychoactive substances (NPS) in the Netherlands: occurrence in forensic drug samples, consumer drug samples and poisons center exposures between 2013 and 2017. *Addiction*, 115(4), 716-725. doi: 10.1111/add.14868
- Huestis, M. A., Brandt, S. D., Rana, S., Auwarter, V. et Baumann, M. H. (2017). Impact of Novel Psychoactive Substances on Clinical and Forensic Toxicology and Global Public Health. *Clin Chem*, 63(10), 1564-1569. doi: 10.1373/clinchem.2017.274662
- International Organization for Standardization (ISO) and International Electrotechnical Commission (IEC). (2017). *ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories* (3rd éd., Vol.). Switzerland.
- Kacinko, S. L. et Homan, J. W. (2019). Quantification of Designer Opioids by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Dans L. J. Langman et C. L. H. Snozek (dir.), *LC-MS in Drug Analysis: Methods and Protocols* (p. 149-163). New York, NY : Springer New York.
- Kahl, J. H., Gonyea, J., Humphrey, S. M., Hime, G. W. et Boland, D. M. (2018). Quantitative Analysis of Fentanyl and Six Fentanyl Analogs in Postmortem Specimens by UHPLC-MS-MS. *J Anal Toxicol*, 42(8), 570-580. doi: 10.1093/jat/bky054

- King, L. A. (2013). Chapter 1 - Legal Classification of Novel Psychoactive Substances: An International Comparison. Dans P. I. Dargan et D. M. Wood (dir.), *Novel Psychoactive Substances* (p. 3-27). Boston : Academic Press.
- King, L. A. et Kicman, A. T. (2011). A brief history of 'new psychoactive substances'. *Drug Testing and Analysis*, 3(7-8), 401-403. doi: 10.1002/dta.319
- Kraemer, M., Boehmer, A., Madea, B. et Maas, A. (2019). Death cases involving certain new psychoactive substances: A review of the literature. *Forensic Science International*, 298, 186-267. doi: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.02.021>
- Kram, T. C., Cooper, D. A. et Allen, A. C. (1981). Behind the Identification of China White. *Analytical Chemistry*, 53(12), 1379A-1386A. doi: 10.1021/ac00235a790
- Krotulski, A. J., Papsun, D. M., Friscia, M., Swartz, J. L., Holsey, B. D. et Logan, B. K. (2017). Fatality Following Ingestion of Tetrahydrofuranylfentanyl, U-49900 and Methoxy-Phencyclidine. *Journal of Analytical Toxicology*, 42(3), e27-e32. doi: 10.1093/jat/bkx092
- Labat, L. (2012). Chapitre 5: Préparation d'échantillons. Dans P. Kintz (dir.), *Traité de toxicologie médico-judiciaire (2^e éd.)* (p.117-138), Paris : Elsevier Masson.
- Lampron-Goulet, É. et Sainton, G. (2019). *Appel à la vigilance : Cas de surdoses sévères liés à l'ingestion de flubromazolam vendu comme du Xanax* Québec : Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux de l'Estrie - Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke. Récupéré de https://ciusssmcq.ca/Content/Client/Librairie/Documents/Soins_et_service_s_-documents/DSPublique_Appel_a_la_vigilance_Flubromazolam_2019-01-24_Md_inf.pdf
- Logan, B. K., Mohr, A. L. A., Friscia, M., Krotulski, A. J., Papsun, D. M., Kacinko, S. L., ... Huestis, M. A. (2017). Reports of Adverse Events Associated with Use of Novel Psychoactive Substances, 2013-2016: A Review. *J Anal Toxicol*, 41(7), 573-610. doi: 10.1093/jat/bkx031

- Lucyk, S. N. et Nelson, L. S. (2017). Novel Synthetic Opioids: An Opioid Epidemic Within an Opioid Epidemic. *Annals of Emergency Medicine*, 69(1), 91-93. doi: <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2016.08.445>
- Margasińska-Olejak, J., Celiński, R., Fischer, A. et Stojko, J. (2019). A fatal case of poisoning of a 19-year-old after taking 3-MMC. *Forensic Science International*, 300, e34-e37. doi: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.02.040>
- Martucci, H. F. H., Ingle, E. A., Hunter, M. D. et Rodda, L. N. (2018). Distribution of furanyl fentanyl and 4-ANPP in an accidental acute death: A case report. *Forensic Science International*, 283, e13-e17. doi: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.12.005>
- Measham, F. (2013). Chapter 5 - Social Issues in the Use of Novel Psychoactive Substances: Differentiated Demand and Ideological Supply. Dans P. I. Dargan et D. M. Wood (dir.), *Novel Psychoactive Substances* (p. 105-127). Boston : Academic Press.
- Measham, F. et Newcombe, R. (2016). Chapter 33: What's So "New" About New Psychoactive Substances? Definitions, Prevalence, Motivations, User Groups and A Proposed New Taxonomy. Dans T. Kolind, B. Thom et G. Hunt (dir.), *The SAGE Handbook of Drug and Alcohol Studies*. 55 City Road, London : SAGE Publications Ltd.
- Miller, A. M., Janis, G. C. et Goggin, M. M. (2018). Anodyne by Design; Detecting Designer Opioids in Pain Management. Affiche présentée à la 55e rencontre annuelle TIAFT/SOFT 2018, Boca Raton, Floride.
- Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B., & Watts, J. (2011). Chapter 29: Extraction. *Clarke's analysis of drugs and poisons: In pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. London: Pharmaceutical Press.
- Mohr, A. L. A., Friscia, M., Papsun, D., Kacinko, S. L., Buzby, D. et Logan, B. K. (2016). Analysis of Novel Synthetic Opioids U-47700, U-50488 and Furanyl Fentanyl by LC–MS/MS in Postmortem Casework. *Journal of Analytical Toxicology*, 40(9), 709-717. doi: 10.1093/jat/bkw086

- Morrow, J. B., Ropero-Miller, J. D., Catlin, M. L., Winokur, A. D., Cadwallader, A. B., Staymates, J. L., ... Goldberger, B. A. (2018). The Opioid Epidemic: Moving Toward an Integrated, Holistic Analytical Response. *Journal of Analytical Toxicology*, 43(1), 1-9. doi: 10.1093/jat/bky049
- National Institute on Drugs of Abuse. (2018). *Opioid summaries by state*. United States : National Institutes of Health. Récupéré de <https://www.drugabuse.gov/drugs-abuse/opioids/opioid-summaries-by-state>
- NMS Labs (2018). *Designer Opioids Blood Test (1480B)*. Récupéré le 19 novembre 2018 de <http://www.nmslabs.com/tests/Designer-Opioids--2018-Scope---Blood/1480B>
- ONUDC. (2014). *Rapport mondial sur les drogues* (E.14.XI.7). Vienne, Autriche : Publications des Nations Unis.
- ONUDC. (2017a). *Rapport mondial sur les drogues* (E.17.XI.7). Vienne, Autriche : Publications des Nations Unis.
- ONUDC. (2017b). *Recommended methods for the identification and analysis of fentanyl and its analogues in biological specimens*. Vienne, Autriche : Publications des Nations Unis.
- ONUDC. (2019a). *Current NPS Threats* (Volume I). Vienne, Autriche. Récupéré de https://www.unodc.org/pdf/opioids-crisis/Current_NPS_Threats_-_Volume_I.pdf
- ONUDC. (2019b). *Rapport mondial sur les drogues* (E.19.XI.8) Vienne, Autriche : Publications des Nations Unis.
- ONUDC. (2020a). *Current NPS Threats* (Volume II). Vienne, Autriche. Récupéré de https://www.unodc.org/documents/scientific/Current_NPS_Threats_Volume_II_Web.pdf
- ONUDC. (2020b). *Rapport mondial sur les drogues* (E.20.XI.6). Vienne, Autriche : Publications des Nations Unis.

- Papsun, D. M. (2019). Retrospective Data-Mining of Toxicology Data as a Tool for NPS Identification. Communication présentée à la 71e rencontre annuelle de l'American Academy of Forensic Sciences, Baltimore, Maryland.
- Peacock, A., Bruno, R., Gisev, N., Degenhardt, L., Hall, W., Sedefov, R., ... Griffiths, P. (2019). New psychoactive substances: challenges for drug surveillance, control, and public health responses. *The Lancet*, 394(10209), 1668-1684. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32231-7
- Prekupec, M. P., Mansky, P. A. et Baumann, M. H. (2017). Misuse of Novel Synthetic Opioids: A Deadly New Trend. *J Addict Med*, 11(4), 256-265. doi: 10.1097/adm.0000000000000324
- Remane, D., Wissenbach, D. K. et Peters, F. T. (2016). Recent advances of liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology — An update. *Clinical Biochemistry*, 49(13), 1051-1071. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.07.010
- Rohrig, T. P., Osawa, K. A., Baird, T. R. et Youso, K. B. (2020). Driving Impairment Cases Involving Etizolam and Flubromazolam. *J Anal Toxicol*. doi: 10.1093/jat/bkaa050
- Seth, P., Scholl, L., Rudd, R. A. et Bacon, S. (2018). Overdose deaths involving opioids, cocaine, and psychostimulants - United States, 2015-2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, 67(12), 349-358. doi: 10.15585/mmwr.mm6712a1
- Shoff, E. N., Zaney, M. E., Kahl, J. H., Hime, G. W. et Boland, D. M. (2017). Qualitative Identification of Fentanyl Analogs and Other Opioids in Postmortem Cases by UHPLC-Ion Trap-MSn. *Journal of Analytical Toxicology*, 41(6), 484-492. doi: 10.1093/jat/bkx041
- Skoog, D. A., West, D. M., Buess-Herman, C. et Dauchot, J. (2015). *Chimie analytique* (3^e éd.). Bruxelles : De Boeck.
- Special Advisory Committee on the Epidemic of Opioid Overdoses. (2020). *Opioid-related Harms in Canada*. Ottawa: Public Health Agency of Canada. Récupéré de <https://health-infobase.canada.ca/substance-related-harms/opioids>

- Strickland, E. C., Cummings, O. T., Mellinger, A. L. et McIntire, G. L. (2018). Development and Validation of a Novel All-Inclusive LC–MS-MS Designer Drug Method. *Journal of Analytical Toxicology*, 43(3), 161-169. doi: 10.1093/jat/bky087
- Suzuki, J. et El-Haddad, S. (2017). A review: Fentanyl and non-pharmaceutical fentanyl. *Drug and Alcohol Dependence*, 171, 107-116. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2016.11.033
- Swanson, D. M., Hair, L. S., Strauch Rivers, S. R., Smyth, B. C., Brogan, S. C., Ventoso, A. D., ... Pearson, J. M. (2017). Fatalities Involving Carfentanil and Fentanyl: Two Case Reports. *Journal of Analytical Toxicology*, 41(6), 498-502. doi: 10.1093/jat/bkx037
- SWGDRUG. (2013). Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, 37(7), 452-474. doi: 10.1093/jat/bkt054
- SWGDRUG. (2020). *SWGDRUG Mass Spectral Library* [Base de données]. Récupéré de <http://www.swgdrug.org/ms.htm>
- Toxicology Consensus Body, Academy Standards Board (ASB). (2019). *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*. Colorado, États-Unis : l'auteur.
- U.S Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER) and Center for Veterinary Medicine (CVM). (2018). *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry* (FDA-2013-D-1020). United States of America.
- UNODC. Early Warning Advisory on New Psychoactive Substances. (2020c). *What are NPS?* Récupéré de <https://www.unodc.org/LSS/Page/NPS>
- Vaiano, F., Busardò, F. P., Palumbo, D., Kyriakou, C., Fioravanti, A., Catalani, V., ... Bertol, E. (2016). A novel screening method for 64 new psychoactive substances and 5 amphetamines in blood by LC-MS/MS and application to real cases. *J Pharm Biomed Anal*, 129, 441-449. doi: 10.1016/j.jpba.2016.07.009

- Vaiano, F., Pascali, J. P. et Bertol, E. (2019). New psychoactive substances: An actual problem or an overestimated phenomenon? *Forensic Science International*, 304, 109941. doi: 10.1016/j.forsciint.2019.109941
- Viel, É. et Mireault, P. (2015). Tracking new drug trends in Quebec: from drug seizures to impaired drivers and program reviews of Canada's drug impaired law. Communication présentée au Drug and Driving Symposium.
- Wang, L. et Bernert, J. T. (2006). Analysis of 13 Fentanils, Including Sufentanil and Carfentanil, in Human Urine by Liquid Chromatography-Atmospheric-Pressure Ionization-Tandem Mass Spectrometry*. *Journal of Analytical Toxicology*, 30(5), 335-341. doi: 10.1093/jat/30.5.335
- Watanabe, S., Vikingsson, S., Roman, M., Green, H., Kronstrand, R. et Wohlfarth, A. (2017). In Vitro and In Vivo Metabolite Identification Studies for the New Synthetic Opioids Acetylfentanyl, Acrylfentanyl, Furanylfentanyl, and 4-Fluoro-Isobutyrylfentanyl. *The AAPS Journal*, 19(4), 1102-1122. doi: 10.1208/s12248-017-0070-z
- Wille, S. M. R., Richeval, C., Nachon-Phanithavong, M., Gaulier, J. M., Di Fazio, V., Humbert, L., ... Allorge, D. (2018). Prevalence of new psychoactive substances and prescription drugs in the Belgian driving under the influence of drugs population. *Drug Test Anal*, 10(3), 539-547. doi: 10.1002/dta.2232
- Yong, H. L., Frost, K. et Harper, C. E. (2018). Non-pharmaceuticals Fentanils Encountered by the Alabama Department of Forensic Sciences. *TIAFT/SOFT 2018*.
- Zawilska, J. B. et Wojcieszak, J. (2019). An expanding world of new psychoactive substances-designer benzodiazepines. *Neurotoxicology*, 73, 8-16. doi: 10.1016/j.neuro.2019.02.015