

5èmes JOURNEES INTERNATIONALES DE TOXICOLOGIE

Liège, les 17 et 18 octobre 2013

Oral communications

Professeur Dr Corinne CHARLIER

Service de Toxicologie Clinique, Médico-Légale,
de l'Environnement et en Entreprise

CHU - Sart Tilman

4000 Liège

NANOTOXICOLOGY: WHERE ARE WE NOW?

Lison D

Louvain centre for Toxicology and applied Pharmacology (LTAP), Brussels, Belgium.

Nanotechnologies exploit unique properties of the matter at the nanoscale (generally between 1 and 100 µm). They impact virtually all industrial activities and are already integrated in consumer goods. Additional developments are foreseen in the coming years, implying investments in research and development at a level of several billions dollars. Some agencies predict a world market of 1000 billion dollars by 2015. The same unique physico-chemical properties that make nanomaterials so technologically attractive may also represent potential challenges to human health and the environment. There is, therefore, an immense demand for nanotoxicology evaluations, and our laboratory has been involved in this effort since early 2000. We will try to review key achievements and gaps in nanotoxicology research, to draw some lessons from these 10 years of research. This will be illustrated by examples from our own work on silica nanoparticles and carbon nanotubes. A critical evaluation of the literature on in vitro toxicology of silica nanoparticles will also be discussed. We will conclude with some personal, more epistemologic, reflections on the programming and steering of research on emerging risks such as nanomaterials.

References

1. Schrurs F, Lison D. Focusing the research efforts. *Nat Nanotechnol* 2012; 7: 546-548.
2. Lison D, Huaux F. In vitro studies: Ups and downs of cellular uptake. *Nat Nanotechnol* 2011; 6: 332-333.
3. Muller J, Huaux F, Moreau N, Misson P, Heilier JF, Delos M, Arras M, Fonseca A, Nagy JB, Lison D. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 207: 221-231.

METFORMIN ASSOCIATED LACTIC ACIDOSIS: IMPACT OF AN EARLY DIAGNOSIS PROCEDURE ON MORTALITY

Semely D¹, Saint-Marcoux F¹, Vallejo C², Nouaille Y¹, Merle L¹, Lachatre G¹, Laroche ML¹

¹Service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance, CHU de Limoges, Limoges, France; ²Département des Urgences, CHU de Limoges, Limoges, France.

Objective

Metformin, a dimethylbiguanide, is an oral antidiabetic agent recommended as the first line treatment of type 2 diabetes mellitus in prevention of cardiovascular morbidity and mortality. Metformin-associated lactic acidosis (MALA) is a rare and serious adverse effect with a mortality rate of up to 50%. The diagnosis of MALA is often delayed as clinical symptoms are not specific and pH, lactate and metformin assay is not part of the initial checklist at emergency admission. After making doctors aware of this problem, a systematic assay of pH, lactate and metformin (intervention) was set up for all patients with metformin as part of their treatment when admitted to the emergency department of the university hospital of Limoges (France). The aim of the study was (i) to assess the impact of a MALA early diagnosis on survival and (ii) to determine death risks factors associated to MALA.

Methods

A before-after study was performed between a series of cases benefiting from the early intervention (8-month period of recruitment) and a similar control series of past cases without intervention (18-month period of recruitment). MALA was defined as pH ≤ 7.35, lactate concentration > 5 mmol/L in patients exposed to metformin, without other common causes of lactic acidosis. An identification was carried out, using the database of the pharmacology and toxicology laboratory and the medical information system program database (PMSI). Data collection was set up using the patients' files. Univariate analysis and multivariate logistic regression analysis were performed to identify death risk factors.

Results

Altogether, 653 patients were admitted with lactic acidosis. MALA was diagnosed in 33 patients of which 11 cases in the intervention group (IG) and 22 cases in the control group (CG). There were no significant differences in the patients' general characteristics. A higher illness severity score in the IG was observed: lactate concentration (13.94 mmol/L for IG vs. 8.8 for CG, $p=0.055$), creatinine concentration (471.9 µmol/L vs. 272.6, $p=0.047$), plasma bicarbonate (7.75 mmol/L vs. 14.34, $p=0.001$). Dialysis was more frequent in the IG (63.6% vs. 18.2%, $p=0.017$). The lactic acidosis diagnosis delay was 29.2 ± 28.8 minutes for IG and 120.0 ± 137.5 minutes for CG. The mortality rate was 36.4% in the IG vs. 45.5% in the CG ($p=0.719$). The only variable significantly associated with mortality in the multivariate model was male gender (OR 7.27; 95%CI 1.51-35.00; $p=0.013$).

Conclusion

We observed an important but not significant decrease in mortality (-20%) after the introduction of an early MALA diagnosis procedure in patients with metformin admitted to an emergency unit. We detected cases earlier and with a higher severity in the intervention group which allowed more rapid and appropriate treatment. In the control group, the patients with a highly serious condition would probably have died before starting any adapted treatment. So, this study suggests a beneficial effect of a MALA early diagnosis.

DÉCÈS IMPUTABLE AU BACLOFÈNE SUITE À UNE INGESTION SUPPOSÉE MASSIVE?

Boels D¹, Queneau AC², Gaulier JM³, Lagarce L⁴, Turcant A⁴

¹Centre antipoison – Toxicovigilance, CHU Angers, ²Service Médecine légale CHU Angers, ³Laboratoire Pharmacologie-Toxicologie CHU Limoges, ⁴Laboratoire Pharmacologie et Toxicologie – Centre de Pharmacovigilance, CHU Angers, France.

Objectifs

Prescrit pour ses propriétés myorelaxantes dans les contractures spastiques, le baclofène (LIORESAL®...), analogue structural du GABA, est depuis plusieurs années utilisé hors AMM à forte dose dans le traitement de l'alcoolodépendance. L'Agence Nationale de Sécurité du Médicament a autorisé, en 2012, 2 essais cliniques pour évaluer le bénéfice-risque dans cette approche thérapeutique et devrait valider très prochainement une recommandation temporaire d'utilisation (RTU) afin d'encadrer et sécuriser ces prescriptions. Un cas médical de décès sous baclofène après dose supposée ingérée massive est rapporté.

Cas clinique

Un patient de 48 ans, alcoolique chronique en cours de sevrage, est hospitalisé pour rechute 3 mois avant les faits. Un traitement par baclofène est initié à posologie croissante jusqu'à 20 mg x 3/j. Il est découvert mort à son domicile 16 jours après le 2^e renouvellement de son ordonnance (6 boîtes). L'état de putréfaction indique que le décès remonte à plusieurs jours. Lors de la «levée de corps» faite par le médecin légiste, 7 boîtes de 30 comprimés (soit 2,1 g) et une plaquette de 20 Seresta®50 (oxazépam) sont découvertes vides ainsi que 4 bouteilles de «Porto». Deux prélèvements sanguin et urinaire sont effectués à la demande de la justice pour recherche des causes de la mort.

Matériel et méthodes

La recherche de stupéfiants sur l'urine est effectuée par immunochimie (FPIA). Une recherche large de médicaments et toxiques a été réalisée par CG-SM (urine) et CL-UV/BD (sang et urine). Une méthode spécifique pour le baclofène est effectuée par CL-UV/BD après extraction liquide-liquide par paires d'ions en milieu alcalin.

Résultats

L'alcool sanguin est égal à 0,2 g/L (urine: 0,24 g/L). Le dépistage des stupéfiants et les recherches de médicaments et toxiques sont négatifs. L'oxazépam n'est pas détecté. Le dépistage de benzodiazépines urinaires est très faiblement positif (seuil 100 µg/L équivalent nordazépam). La concentration de baclofène est égale à 2,7 mg/L (sang) et à 81 mg/L (urine).

Discussion

Les concentrations plasmatiques habituelles sont inférieures à 0,5 mg/L pour des posologies de 30 à 100 mg/j, celles potentiellement toxiques étant supérieures à 1 mg/L. Des concentrations létales sont rapportées dans 3 cas (6, 9,6 et 17 mg/L) (1). Les concentrations sanguines trouvées (2,7 mg/L) sont donc en faveur d'une exposition importante au baclofène et sont comparables à celles retrouvées chez des personnes hospitalisées pour intoxications sévères non mortelles (1,52; 3,2; 5,15 mg/L) ou suite à une insuffisance rénale majeure (2,1 mg/L). Les signes de gravité sont l'apparition d'un coma hypotonique pouvant être profond et prolongé, avec possibles convulsions, détresse respiratoire et perturbations cardiovasculaires notamment des hypotensions artérielles parfois sévères.

Conclusion

Au vu de la littérature et en l'absence d'autre substance identifiée dans les prélèvements, l'imputabilité d'un surdosage en baclofène dans ce décès est probable. La prise importante de baclofène a pu entraîner des troubles majeurs conduisant au décès en l'absence de prise en charge médicale. Il reste cependant des questions concernant l'extrapolation possible des données *in vivo* aux échantillons *post-mortem* notamment en terme de ratio plasma/sang total, de stabilité du principe actif dans les cas de putréfaction ou encore de dose effectivement ingérée (la présence des boîtes sur les lieux n'étant qu'un indice théorique). Une autopsie avec prélèvements complémentaires (sang cardiaque, contenu gastrique, ...) aurait-elle permis de mieux cerner ce cas de décès?

Référence

1. Baselt RC, Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 2011, 141, Biomedical publications 9e éd.

3

DETERMINATION OF RIVAROXABAN IN HUMAN PLASMA BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY –TANDEM MASS SPECTROMETRY AND CORRELATION WITH CHROMOGENIC ASSAY

Tamigniau A¹, Capron A¹, Douxfils J², Dogné JM², Chatelain B³, Wallemacq P¹

¹Laboratory of Clinical Chemistry, Saint-Luc University Hospital, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium; ²Département de Pharmacie, Namur Thrombosis and Hemostasis Center (NTHC), Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS), Université de Namur, Namur, Belgium; ³Hematology Laboratory, NTHC, NARILIS, CHU Mont-Godinne, Université Catholique de Louvain, Mont-Godinne, Belgium.

Background

Rivaroxaban is a new oral anticoagulant used in thromboprophylaxis after major orthopedic surgery and in non valvular atrial fibrillation. Initially, this specific inhibitor of FXa was described as a molecule no monitoring was needed for. However, some clinical conditions are relevant for biological monitoring (observance issue, surgery...). In this study, we developed an HPLC-MS/MS method to determine rivaroxaban in human plasma and we compare it to the chromogenic assay already available on coagulometer.

Methods

Rivaroxaban calibrators were prepared in human plasma, in concentrations ranging from 5 to 500 ng/mL. To 200 µL of plasma sample (or calibrator), 500 µL of methanol containing the linesolid used as internal standard were added. Next, it was vortexed for 10 seconds and centrifuged for 10 minutes at 7305 xg. The supernatant was then injected in the HPLC-MS/MS system (Alliance 2795 from Waters® coupled with a Quattro-micro from Micromass®). Mobile phase consisted of methanol (solvent A) and 10 mM ammonium formate buffer (solvent B). Over 0-1.5 min, solvent A linearly increased from 20 to 100% and remained at 100% for 4 min, before returning to 20% over 1.5 min. Separation was achieved using a Phenomenex® HPLC Kinetex C18 column (2,6u 100A 150x3,0 mm) and mass spectrometry detection was achieved in positive electrospray ionization mode. The compound mass transitions were: 436,01 > 144,9 (rivaroxaban, quantitative ion product), 436,01 > 231,0 (rivaroxaban, qualitative ion product), 338,11 > 296,0 (linesolid, quantitative ion product), 338,11 > 195,1 (linesolid, qualitative ion product). 55 blood samples from patients treated with rivaroxaban were tested on the HPLC-MS/MS system, and Biophen DiXal® (Hyphen Biomed®) coagulation assay on the Sta-R® (Roche®). Only one sample was excluded from our statistical analysis (out of the range of calibration).

Results

The HPLC-MS/MS assay was linear within the concentration range tested (5-500 ng/mL) with intra- and inter-day precision of <9,48% and <8,11%. The limits of quantification and detection were 5 and 3 ng/mL. When comparing LC-MS/MS to Biophen DiXal®, we observe a good correlation between the two methods ($r=0,09471$, $p<0,0001$). The analysis of the Passing Bablok plot reveals a systematic error (bias) of 13,93 ng/mL (IC95 1,22-18,13).

Conclusion

The HPLC-MS/MS method developed in our lab correlate well with the Biophen DiXal® available on coagulometer.

4

HOW TO EXPLAIN HEMATOTOXICITY INDUCED BY GANCICLOVIR IN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS?

Saint-Marcoux E, Billat PA, Marquet P, Picard N

CHU Limoges, Department of Pharmacology and Toxicology; Univ. Limoges; INSERM UMR 850, Faculty of Medicine, France.

Background and objectives

Cytomegalovirus (CMV) infection is a major issue in transplantation being associated with a high morbidity. Prophylactic or pre-emptive therapy based on ganciclovir (GCV) is used in this context, but presents haematological adverse effects (mainly neutropenia). This toxicity leads to premature treatment discontinuation or to the use of lower doses, promoting the emergence of resistance.

Our hypothesis was that the toxicity of GCV could be partially explained by its accumulation into blood cells. Based on it, we aimed at identifying polymorphisms in the genes encoding GCV membrane transporters in a cohort of renal transplant patients.

Methods

Genomic DNA was obtained from 207 patients enrolled in the Epigen study, an on-going cohort of renal transplanted recruited in a 4-year period. The selection of genes and polymorphisms was based on the following criteria: (i) transporter expressed in blood cells, (ii) *in vitro* evidence for purine analogue (ideally GCV) transports, and (iii) clinical evidence for polymorphism functionality. Genotyping was performed using Taqman® assays. Statistical analysis of the association between genotypes, co-treatments, and the evolution of neutrophil counts after GCV introduction was performed using a multivariate process based on linear mixed-effect model in the R program.

Results

14 polymorphisms in 7 genes (*SLC29A1*, *SLC28A3*, *SLC28A2*, *SLC22A1*, *ABCG2*, *ABCC4* and *ABCB1*) were selected. The decrease in neutrophil count was more pronounced in patients carrying *ABCC4* (MRP4) rs11568658 variant allele (n=7) vs. non carriers (n=157) ($p=0,0004$). The impact of this polymorphism on GCV accumulation in blood cells was confirmed in transfected cellular models. No significant association with other polymorphisms ($p>0,10$), co-treatments (i.e., trimethoprim ($p=0,12$) or mycophenolatemofetil ($p=0,30$)) and GCV dose ($p=0,08$) was found.

Conclusion

This study suggests that MRP4 rs11568658 could be associated with a higher risk to develop neutropenia in transplant patients given GCV. This finding is consistent with previous *in vitro* evidence that GCV is substrate for MRP4 (1). The rs11568658 SNP, known to decrease MRP4 activity (2), results in higher GCV accumulation in neutrophils.

References

1. Adachi et coll. *J Biol Chem* 2002.
2. Abba et coll. *J Pharmacol Exp Ther* 2008.

5

DE LA CLINIQUE À LA CONFIRMATION ANALYTIQUE: À PROPOS DE DEUX CAS D'IMPRÉGNATION PAR L'ALUMINIUM

Guillard O¹, Fauconneau B², Pineau A³

¹Université de Poitiers, Poitiers, France; ²Laboratoire de Pharmacologie, Poitiers, France; ³Toxicologie, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Nantes, France.

Objectif

Face à des problèmes cliniques plus ou moins graves, le clinicien est parfois désarmé. Les examens biologiques usuels (biochimie, hématologie et microbiologie) peuvent être normaux. Il faut alors penser à des analyses plus spécifiques permettant d'identifier et quantifier les minéraux.

Méthodes

Ce travail présente deux cas cliniques différents résolus par une exploration rigoureuse et complète. Une femme de 45 ans présente sur la partie extérieure du bras gauche un nodule sous-cutané à vésicules prurigineuses et taches rouges. Un interrogatoire indique que, dans cette région, 12 ans plus tôt, une injection de vaccin anti-hépatite B a été réalisée et 5 ans plus tôt une vaccination diphtérie, tétanos et poliomyélite. Le tableau histologique montre un pseudolymphome cutané. Une coloration de Morin (pentahydroxylavone) avec lecture en microscopie à fluorescence est réalisée sur une première biopsie de la région multivaccinale. Sur une seconde biopsie, l'aluminium est quantifié par SAAEZ après séchage et digestion acide (technique de Van Ginkel modifiée par Guillard).

Le second cas concerne une femme de 43 ans souffrant de fatigue inexplicable et travaillant dans une librairie. Tous les bilans biologiques usuels sont normaux. Après une longue investigation, un interrogatoire minutieux montre l'utilisation, plusieurs fois par jour depuis quatre ans, d'un antitranspirant sur peau rasée. Un dosage d'Al plasmatisque est alors pratiqué, complété par une mesure d'Al urinaire.

Résultats

1^{er} cas: La coloration de Morin est positive, montrant des inclusions cytoplasmiques fluorescentes de dépôt d'aluminium dans les macrophages interfolliculaires. La concentration en Al de la biopsie cutanée est élevée (768,1 ± 18,6 µg/g poids sec versus 9,1 et 5,6 pour deux témoins). Bien que cette patiente ne présente pas de symptômes de fatigue chronique ou de Myofasciite à macrophages (MF), il faut demeurer vigilant devant les risques de neurotoxicité de ce métal (1).

2nd cas: La quantité cumulée d'aluminium métal appliquée sur la peau est supérieure à 157 g. Les dosages d'aluminium fournissent des résultats élevés (plasma: 3,88 µmol/L vs N < 0,3 µmol/L et urine: 1,71 µmol/L vs N < 1,10 µmol/L) (2). L'arrêt de l'utilisation de l'antitranspirant va permettre un retour à la normale des concentrations d'aluminium en 4 mois. Pour compléter cette observation clinique et en expliquer le mécanisme, le passage transcutané de l'aluminium sur peau irritée a été démontré *in vitro* sur peau humaine en utilisant la cellule de Franz conformément à la directive OCDE 428 (2004). Ainsi, avec un stick antitranspirant, la quantité d'aluminium qui pénètre au niveau cutané évolue de 1,81 ± 1,45 µg/cm² sur peau saine à 11,50 ± 8,90 µg/cm² sur peau lésée (3).

Conclusion

L'analyse minérale a permis d'identifier l'agent responsable des problèmes de santé de ces 2 patientes. Devant la nocivité de l'aluminium, il faut encourager les industriels, tant au niveau des vaccins qu'en cosmétologie, à substituer cet élément dommageable pour la santé.

Références

1. Gherardi RK. et coll. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistent of vaccine-derived aluminum hydroxide in muscle. *Brain* 2001; 124(9): 1821-31.
2. Guillard O. et coll. Hyperaluminemia in a woman using an aluminum-containing anti-perspirant for 4 years. *Am J Med* 2004; 117: 956-9.
3. Pineau A. et coll. *In vitro* study of percutaneous absorption of aluminum from antiperspirants through human skin in the Franz diffusion cell. *J Inorg Biochem* 2012; 110: 21-6.

6

PHARMACOCINÉTIQUE DE L'IODE APRÈS L'INJECTION DE PRODUITS DE CONTRASTE: RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

Houzé P¹, Chevillard L², Ceccaldi A³, Soyfer P⁴, Baud FJ³

¹Laboratoire de Biochimie, ²Réanimation Médicale Toxicologique et ³Service d'Imagerie et de Médecine Nucléaire, GH St Louis-Lariboisière - F. Widal, Paris; ⁴INSERM U705; CNRS, UMR 7157; Universités Paris 7 et 5, Hôpital F. Widal, Paris, France.

Objectifs

Coronarographies et examens tomographiques sont largement utilisés pour l'exploration des patients hospitalisés en Réanimation Médicale et Toxicologique (RMT) dans le cadre d'un arrêt cardio-respiratoire, nécessitant l'injection de fortes doses de produit de contraste. Ces composés contiennent de 3 à 6 atomes d'iode liés de façon covalente. Leurs effets secondaires sont attribués à leur viscosité et à leur osmolalité. Leur élimination essentiellement rénale est achevée en 24 heures avec une demi-vie plasmatique inférieure à 2 heures. Le but de ce travail est de décrire la pharmacocinétique des iodures apportés par l'injection de produits de contraste et de la comparer aux données pharmacocinétiques décrites pour ces produits.

Méthodes

Entre décembre 2012 et avril 2013, 10 patients hospitalisés en RMT ayant reçu un bolus iv d'iodoxanol (VisipaqueTM) ou d'ioméprol (IomeronTM) ont été prélevés en artériel toutes les 24 ou 48 heures après l'injection. Après centrifugation, le plasma hépariné a été congelé à -20°C jusqu'au moment des dosages. Les iodures plasmatiques totaux ont été dosés par micro-méthode selon la technique de Sandell-Kolthoff, basée sur la décoloration des ions cérium (IV) par les sels d'arsenic (III). Cette réaction est catalysée par les iodures apportés par les prélèvements minéralisés en milieu acide et à chaud. La méthode est proportionnelle entre 9,5-2300 nmol/L d'iodures (12,5 et 300 µg/L) avec une précision et un biais inférieur à 12%. La limite de quantification est de 9,5 nmol/L (12,5 µg/L). La créatinine a été déterminée par la méthode de Jaffé en cinétique (ModularTM, Roche). Les clairances de la créatinine (moyenne ± SD) ont été estimées par la méthode de Cockcroft. Les paramètres pharmacocinétiques, exprimés en moyenne ± SD, et la modélisation ont été déterminés par le programme Adapt5 (Biomedical Simulations Resource, Los Angeles, 2009).

Résultats

Les patients se répartissaient en 10 hommes (âge médian: 51,3 ans; extrêmes: 36-74 ans) et 2 femmes (âge médian: 71,5 ans; extrêmes: 68-75 ans) ayant reçu une injection d'iodoxanol (n=8) ou d'ioméprol (n=2). Tous patients confondus, la clairance à la créatinine était en moyenne de 100 +/-39 ml/min avec une dose injectée moyenne de 74,2 +/- 54,5 g. Les concentrations en iodures étaient comprises entre 450 000 et 340 000 nmol/L pour des temps de prélèvements inférieurs à 24 heures après l'injection, soient environ 1000 fois supérieures aux valeurs physiologiques (500-1000 nmol/L). Elles restaient supérieures à la normale chez 90% des patients lors du dernier prélèvement. En utilisant un modèle mono-compartimental, après injection du iodoxanol, la demi-vie plasmatique des iodures était de 23 +/- 20 heures (extrêmes: 9,5-29 heures), comparable (8 et 27 heures) chez les patients traités par ioméprol. La demi-vie plasmatique des iodures semble indépendante de la clairance de la créatinine si celle-ci reste supérieure à 60 ml/min.

Conclusion

Cette étude préliminaire semble montrer: i) que la demi-vie plasmatique des iodures est 10 fois plus longue que celles des produits de contraste; ii) quelle est apparemment indépendante de la nature du produit de contraste; iii) qu'il existe une valeur seuil de la clairance à la créatinine au-delà de laquelle l'élimination des iodures est significativement altérée. Une étude sur un plus grand nombre de patients et sur une période de suivi plus longue est à envisager afin de confirmer ses résultats préliminaires et d'introduire la clairance des patients comme une covariable importante dans l'élimination de ces iodures.

ONE FOR ALL, ALL IN ONE: DETERMINATION OF GAMMA-HYDROXYBUTYRIC ACID IN BIOFLUIDS USING "IN-VIAL" DERIVATIZATION AND HEADSPACE-TRAP GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

Ingels AS^{1,3}, Neels H², Lambert W¹, Stove C¹

¹Laboratory of Toxicology, Ghent University, Ghent, Belgium; ²Laboratory of Toxicology, Antwerp University, Antwerp, Belgium; ³Current address: Federal Public Service Justice, National Institute of Criminalistics and Criminology, Brussels, Belgium.

Introduction

Numerous analytical methods are available to detect gamma-hydroxybutyric acid (GHB), a notorious club drug, in biofluids from suspected GHB-intoxicated patients. However, in the majority of methods sample work-up is significant. We wished to develop a method that combines general applicability with sufficient sensitivity, starting from low sample volumes and with minimal hands-on time.

Materials & Methods

A headspace-trap gas chromatography-mass spectrometry method (HS-trap GC-MS) was developed. This method starts from 100 µl biofluid in a HS vial, to which 10 µl 0.25 mg/ml GHB-d6, 100 mg anhydrous Na₂SO₄, 30 µl 5M NaOH and 30 µl DMS are added. After sealing, the vial was placed in the HS autosampler and equilibrated for 30 min at 90 °C. Following vial pressurization (30 psi for 1 min), an aliquot of the HS was transferred to the Tenax trap (50 °C). Water was removed during dry purge (30 psi for 10 min), followed by desorption (30 psi for 2 min) of di-methylated GHB by heating the trap (265 °C). The GC-MS operated in SIM mode for GHB quantification.

Results

Following optimization of HS-trap GC-MS settings, validation was performed. Adequate method selectivity and sensitivity was obtained, with calibration curves for GHB ranging from 5-150, 2-150 and 3.5-200 µg/ml for urine, plasma and whole blood, respectively. Acceptable precision and accuracy (<13% imprecision and bias) were seen for all QC's (LLOQ, low, medium, high), including for supplementary serum- and lyzed blood-based QC's, using calibration curves prepared in plasma and whole blood, respectively. Incurred sample reanalysis demonstrated assay reproducibility, while cross-validation with another GC-MS method demonstrated that our method is a valuable alternative for GHB determination in toxicological samples.

Conclusions

We developed and validated a HS-trap GC-MS method to determine GHB in various biological fluids (urine, plasma, serum, whole blood and lyzed blood). Combining this relatively novel and fully automated headspace technique with "in-vial" methylation of GHB allowed a straightforward "one for all, all in one" approach: one single approach could be used for all biofluids, requiring only 100 µl of sample, with sample preparation merely involving addition of all reagents and sample into one vial.

Reference

Ingels AS et al., Determination of gamma-hydroxybutyric acid in biofluids using a one-step procedure with "in-vial" derivatization and headspace-trap gas chromatography-mass spectrometry. *J Chrom A* 2013; 1296: 84-92.

7

8

L'ATROPINE N'EST PAS UN ANTIDOTE DES INTOXICATIONS AU CHLORMÉQUAT: À PROPOS DE 5 CAS

Nisse P¹, Assez N², Kahn JPH³, Mathieu-Nolf M¹

¹Centre antipoison et toxicovigilance, ²Service d'Aide Médicale Urgente (SAMU), CHRU de Lille, 59037 Lille cedex; ³Réanimation polyvalente, Centre Hospitalier, 62000 Arras, France.

Objectif

L'intoxication volontaire par le Chlorméquat (ou chlorocholine chloride) ressemble cliniquement à celles par ingestion d'un insecticide anticholinestérasique, mais l'administration de fortes doses d'atropine pourrait en augmenter la mortalité.

Cas cliniques

Nous rapportons cinq cas d'intoxication mortelle par le chlorméquat.

Cas 1. Un homme de 46 ans ingère volontairement 150 ml d'une solution de chlorméquat. Il a présenté brutalement un arrêt cardiaque à domicile. Après réanimation par le SMUR, une activité cardiaque a été récupérée et il a pu être admis dans un service de soins intensifs. Rapidement il a développé une défaillance multi-organes aboutissant à son décès 19 heures plus tard.

Cas 2. Un homme de 46 ans ingère volontairement une quantité indéterminée de Contreverse[®], contenant 460 g/L de chlorure de chlorméquat. Trente minutes plus tard, il présente brutalement un arrêt cardiaque. La prise en charge comprend une intubation avec ventilation mécanique et administration intraveineuse d'adrénaline; du fait de la présence d'une bronchorrhée importante, un bolus IV de 2 mg d'atropine lui est administré quand survient un épisode de fibrillation ventriculaire, traité par choc électrique externe. En dépit de la réanimation, il est déclaré décédé une heure plus tard.

Cas 3. Un homme de 59 ans ingère 2 gorgées de Cycocel[®] contenant 460 g/L de chlorure de chlorméquat et 320 g/L de chlorure de choline. Les 1ers symptômes apparaissent 20 minutes plus tard avec sudation et salivation accrues. Trente minutes après l'ingestion, il présente brutalement une asystolie nécessitant un massage cardiaque externe, l'administration intraveineuse d'adrénaline et d'atropine.

Cas 4. Un agriculteur âgé de 39 ans a inhalé accidentellement du Cycocel[®] lors de l'épandage. Douze heures plus tard, il présente un œdème aigu du poumon compliqué d'un arrêt cardiorespiratoire avec asystolie; lors de sa prise en charge par le SMUR, il était intubé et recevait de l'atropine et l'adrénaline en IV. Malgré la réanimation, il est déclaré décédé à domicile.

Cas 5. Un homme de 37 ans ingère volontairement une quantité inconnue de Cycocel[®], contenant 460 g/L de chlorure de chlorméquat et 35 g/L de chlorure de choline. Il présente un arrêt cardiaque soudain et décède malgré les tentatives de réanimation.

Discussion

Tous les patients ont présenté des signes cliniques cholinergiques caractéristiques d'une ingestion de chlorméquat. Si la symptomatologie d'une intoxication par le chlorméquat évoque cliniquement celles aux insecticides organophosphorés (1), le chlorméquat n'est pas un inhibiteur des acétylcholinestérasiques et l'administration de fortes doses d'atropine pourrait augmenter la toxicité et la mortalité de ces intoxications comme cela a été retrouvé en expérimentation animale (2). Le traitement reste symptomatique avec maintien des fonctions vitales; il n'y a aucun antidote spécifique. La mesure de l'activité des cholinestérasiques (acétylcholinestérasiques érythrocytaires et butyrylcholinestérasiques plasmatiques) est normale, ce qui permet d'éliminer une intoxication aux anticholinestérasiques. Le dosage du chlorméquat dans le sang ou dans les urines n'est pas fait en routine et n'est probablement pas indispensable à la prise en charge aux urgences des tentatives de suicides.

Conclusion

Cette série de 5 cas confirme l'extrême gravité des tentatives de suicide par ingestion de chlorméquat avec un engagement précoce du pronostic vital, dans l'heure qui suit. L'appel au centre antipoison permet d'identifier le produit phytopharmaceutique, d'optimiser la prise en charge thérapeutique et de rappeler que l'administration d'atropine semble contre indiquée, en particulier, dans cette intoxication.

Références

- Winek CL et al. Sudden death following accidental ingestion of chlorméquat. *J Anal Toxicol* 1990; 14(4): 257-8.
- Romanowski H. Effect of atropine sulfate on the resorption and excretion of chlorocholine chloride in rats after a single dose. *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska Med* 1981; 36: 31-41.

9

ETAT DES LIEUX SUR LA DISPONIBILITÉ DES ANTIDOTES EN AQUITAINE, FRANCE

Nardon A¹, Chansseau P², Gerbouin O¹, Dondia D², Grellet J¹, Labadie M²

¹Pharmacie Groupe hospitalier Pellegrin, CHU de Bordeaux, France; ²Centre Antipoison et de Toxicovigilance Aquitaine et Poitou-Charentes, CHU de Bordeaux, France

Objectif

La problématique de la disponibilité des antidotes constitue un problème international aux répercussions délétères pour les patients victimes d'une intoxication. Le Centre Antipoison et de toxicovigilance (CAPTV) de Bordeaux a souhaité étudier la disponibilité des antidotes dans les structures d'urgences en Aquitaine et déterminer la conformité des quantités d'antidotes disponibles en se basant sur les dernières recommandations internationales.

Méthodes

En novembre 2010, nous avons adressé un questionnaire, portant sur les réserves d'antidotes, aux pharmacies à usage intérieur des 33 établissements dotés d'une structure d'urgence en Aquitaine. L'élaboration de la liste des 10 antidotes (ou 18 selon les établissements) jugés essentiels et la conformité de leur disponibilité reposaient notamment sur les recommandations publiées en 2009 par *the American College of Emergency Physicians* (1). L'analyse de cette étude de dotation s'est portée sur le nombre d'antidotes détenus par établissement et sur la quantité suffisante pour traiter un patient de 100 kg durant les 8 ou 24 premières heures selon les établissements.

Résultats

27 des 33 structures d'urgences d'Aquitaine (82%) ont répondu au questionnaire. Concernant les 10 antidotes préconisés pour chaque structure et leur quantité adéquate pour le traitement d'un patient de 100 kg sur 8h, 5 établissements les détiennent dont uniquement 1 établissement en quantité suffisante. Le nombre moyen d'antidotes disponibles par établissement est de 7,6 ± 1,7 antidotes (avec un minimum de 5) mais seulement 4,8 ± 2,4 antidotes en quantités suffisantes (avec un minimum de 1). Il est à noter que le statut public d'un établissement ($p < 0,01$) ou un nombre de lits > 250 ($p = 0,0305$) sont des facteurs de meilleure disponibilité des antidotes. 5 antidotes sont disponibles dans les 27 structures: Flumazénil (en quantité suffisante dans 78% des établissements), Glucagon (mais disponible en quantité suffisante uniquement dans 4 structures), Naloxone (en quantité suffisante dans 59% des établissements), Sulfate de Protamine (seul antidote détenu en quantité suffisante par les 27 établissements) et le Gluconate de Calcium (en quantité suffisante dans 74% des établissements). L'Hydroxocobalamine est présent dans 14 établissements et seulement 8 le détiennent en quantité adéquate. En ce qui concerne les Anticorps Antidigitales seulement 5 structures en sont dotées dont 2 en quantité suffisante. Le coût annuel de la trousse des 10 antidotes préconisés pour chaque structure est de 4117 €.

Conclusion

La plupart des établissements d'urgence d'Aquitaine n'ont pas de réserves d'antidotes en quantité suffisante. La méconnaissance des quantités nécessaires à détenir ou le coût d'acquisition de certains antidotes peuvent expliquer cette situation. La mise en place d'un réseau régional d'antidotes, permettrait d'une part une meilleure utilisation des antidotes par l'appui du CAPTV et d'autre part, une coordination régionale de l'approvisionnement en antidotes et une gestion régionale de leur réserve en temps réel afin d'améliorer la prise en charge des intoxiqués par les structures d'urgence en facilitant l'accessibilité à ces traitements de l'urgence.

Références

- Dart RC. et coll. Expert Consensus Guidelines for Stocking of Antidotes in Hospitals That Provide Emergency Care. *Ann Emerg Med* 2009; 54: 386-394.

10

INVESTIGATION OLFACTIVE DE LA MORT

Focant J¹, Stefanuto P-H¹, Brasseur C¹, Dekeirschietter J², Haubruge E², Schotmans E³, Wilson A³, Stadler S⁴, Perrault K⁵, Forbes S⁶

¹CART, Organic and Biological Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Liège, Liège, Belgium, U.F. Focant@ulg.ac.be; ²Department of functional and evolutionary Entomology, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège, Gembloux, Belgium; ³School of Life Sciences, University of Bradford, Bradford, West Yorkshire, UK; ⁴Faculty of Science, University of Ontario Institute of Technology, Oshawa, Ontario, Canada; ⁵Centre for Forensic Science, University of Technology, Sydney, Australia

Objectifs

Les processus de décomposition cadavérique produisent une grande variété de molécules dont la nature et les proportions respectives sont fonction de l'intervalle post-mortem (IPM). Certaines de ces molécules sont volatiles et sont responsables de l'odeur de décomposition. L'analyse exhaustive de ces mélanges de composés organiques volatils (COVs) est souvent limitée par les capacités analytiques. L'élucidation chimique de ces mélanges de COVs est cruciale pour caractériser les étapes de décomposition cadavérique et ainsi permettre une meilleure interprétation des profils olfactifs collectés à proximité d'un cadavre. Une meilleure définition olfactive de la mort permettrait de mieux comprendre et, par exemple, d'améliorer l'entraînement des chiens détecteurs de cadavres (1), mais aussi de développer des outils de détection électronique spécifiques. Une nouvelle approche pourrait ainsi changer la donne et permettre de renforcer les bases des investigations médico-légales ou forensiques de recherche de cadavres.

Méthode

La technique de chromatographie gazeuse exhaustive bidimensionnelle (GCxGC), couplée à la spectrométrie de masse à temps-de-vol (TOFMS), permet de résoudre des mélanges complexes dans un système de séparation tridimensionnel. Si l'échantillonnage reste le même que lors d'analyses GC-MS classiques (capture des COVs sur des adsorbants spécifiques suivie de leur désorption thermique), la combinaison de phases stationnaires orthogonales avec les algorithmes de déconvolutions spectrales modernes permet d'augmenter le pouvoir de séparation et ainsi de générer des listes de composés normalement non-résolus avec les approches classiques. Après extraction des COVs environnementaux « parasites » piégés lors de l'échantillonnage, ces listes peuvent être explorées afin d'en extraire les composés bio-marqueurs spécifiques de la décomposition cadavérique. Des outils statistiques de traitement des données sont utilisés afin de permettre une comparaison rapide de profils de COVs.

Résultats

L'extension des listes de COV spécifiques permet d'améliorer l'exactitude de la détermination de l'IPM. De par l'isolation et l'identification de molécules normalement masquées dans le bruit de fond, il est également possible d'obtenir des informations additionnelles quant à un potentiel changement d'environnement du cadavre (déplacement d'un corps), et de faciliter la recherche de drogues ou de leurs métabolites. Les banques de données internationales comptent près de 400 COVs plus ou moins spécifiques aux odeurs de cadavres. Grâce à cette nouvelle approche il nous a été possible d'identifier plus de 800 composés spécifiques à la décomposition animale (le modèle cochon est utilisé pour ses similitudes avec l'humain) (2,3). Un autre volet de ces avancées concerne la géotaphonomie forensique, c'est-à-dire l'étude de la perturbation potentielle des sols suite à la présence d'un cadavre enterré. Il nous est possible de mettre en évidence une signature olfactive de la présence d'un cadavre par analyse des sols de surface afin de faciliter les opérations lourdes de recherche de tombes. Parmi les milliers de composés séparés lors de l'analyse de ces sols, la présence spécifique d'un plus grand nombre de molécules d'alcane ramifiés méthylés a été mise en évidence (4). Sur cette base, une procédure d'analyse computationnelle des données a été développée afin de permettre un criblage rapide de sols suspects. Cela pourrait, à terme, avec le développement d'une unité mobile d'analyse, faire partie des procédures de routine forensique. Nos travaux en cours se focalisent sur la réplication de ces procédures sur des COV cadavériques humain, afin de valider le modèle cochon.

Conclusions

L'utilisation de techniques analytiques de pointe comme la GCxGC-TOFMS pour l'analyse de mélanges complexes de COVs dans le cadre médico-légal devrait permettre à court terme d'améliorer la qualité des investigations. La meilleure description de ces mélanges permettra également la création de nouvelles générations de solutions d'entraînement pour les chiens cadavres, ainsi que le développement d'outils spécifiques à la mise en évidence de tombes illégitimes.

Références

- Stadler S. et al. Analysis of synthetic canine training aids by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time of flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2012; 1255: 202-206.
- Dekeirschietter J. et al. Enhanced characterization of the smell of death by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GCxGC-TOFMS). *PLoS ONE* 2012; 7: e39005.
- Stadler S. et al. Characterization of volatile organic compounds from human analogue decomposition using thermal desorption coupled to comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 2013; 85: 998-1005.
- Brasseur C. et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the forensic study of cadaveric volatile organic compounds released in soil by buried decaying pig carcasses. *J Chromatogr A* 2012; 1255: 163-170.

11

APPROCHE GLOBALE DE LA REDISTRIBUTION POST-MORTEM DE SUBSTANCES PSYCHOACTIVES: RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

Lemaire E¹, Denooz R², Charlier C², Boxho Ph¹

¹Institut Médico-légal de l'Université de Liège, Liège, ²Laboratoire de Toxicologie Médico-légale, CHU Sart-Tilman, Liège, Belgique

Objectif

La redistribution post-mortem d'une substance concerne les variations de concentrations sanguines (veineuses) de cette substance en fonction du site de prélèvement et du délai post-mortem au moment du prélèvement. Les sites de prélèvement sont divisés en «sites centraux» et «site périphérique» tandis que la redistribution post-mortem d'une substance est évaluée en fonction du résultat du ratio «concentration centrale» / «concentration périphérique». L'objectif de notre étude est l'approche globale du phénomène de redistribution post-mortem par l'étude de l'influence du site de prélèvement, notamment le site poplité jusqu'alors inexploré, et de l'influence du délai post-mortem selon deux méthodes, l'une dite statique et l'autre dite dynamique.

Méthodes

Dans cette étude préliminaire, 23 cas ont été inclus. L'étude de l'influence du site de prélèvement a été réalisée sur deux populations, l'une dite «générale» et l'autre dite «poplitée». Ces populations ont ensuite été subdivisées en sous-populations «prélèvement n° 1» et «prélèvement n° 2», selon qu'un seul ou deux (distincts dans le temps) prélèvement(s) avait(en)t été réalisé(s) sur le même cas.

Afin de mettre en évidence l'occurrence du phénomène de redistribution post-mortem, pour chaque substance, les ratios moyens de concentrations suivants ont été calculés: [sous-clavier]/[fémoral] pour la population «générale» et [sous-clavier]/[fémoral], [sous-clavier]/[poplitée] et [fémoral]/[poplitée] pour la population «poplitée». Pour l'étude de l'influence du délai post-mortem, deux méthodes de calcul, l'une dite «statique» et l'autre dite «dynamique» ont été utilisées.

Résultats

Les substances-cibles suivantes ont été retenues: diazépam et métabolites; méthadone et métabolite; morphine et métabolites. Concernant l'influence du site de prélèvement, dans la population «générale», les ratios moyens de concentrations [sous-clavier]/[fémoral] ont été obtenus pour chaque substance. Concernant l'influence du site de prélèvement, dans la population «poplitée», les ratios moyens de concentrations [sous-clavier]/[fémoral] [sous-clavier]/[poplitée] et [fémoral]/[poplitée] ont été obtenus pour chaque substance. Concernant l'approche statique de l'influence du délai post-mortem, les corrélations entre les ratios de concentrations obtenus et le délai post-mortem théorique ont été obtenues pour chaque substance. Concernant l'approche dynamique de l'influence du délai post-mortem, les corrélations entre les ratios de différences de concentrations (et les différences de concentrations) et délai précis écoulé entre les prélèvements n° 1 et n° 2, ont été obtenus pour chaque substance.

Conclusion

Nos résultats démontrent que la méthadone et la morphine sont soumises au phénomène de redistribution post-mortem dans la population «générale». Jusqu'à ce jour inexploré, le site poplité apparaît être encore moins soumis au phénomène de redistribution post-mortem, selon les ratios obtenus dans la population «poplitée» pour les mêmes substances. L'étude de l'influence du délai post-mortem, selon une approche statique ou dynamique, pour chaque substance cible, n'a pas relevé de différences significatives des ratios de concentrations, ni des ratios de différences de concentrations, ni des concentrations, en fonction du temps, sous réserve d'une population limitée, principalement dans l'approche dynamique.

13

SUIVI DES GAZ POSTMORTEM: AIDE AU DIAGNOSTIC MÉDICO-LÉGAL

Varlet V

Unité de Toxicologie et Chimie Forensiques, Centre Universitaire Romand de Médecine Légale, Lausanne, Suisse

Objectif

De nombreux gaz sont responsables chaque année d'intoxications et d'accidents parfois mortels. De part leur état physique, l'analyse des gaz représentent des challenges analytiques à relever depuis l'échantillonnage à la quantification. La réduction des fuites tout au long du processus analytique ainsi que l'utilisation d'étalons internes isotopiques stables (EIS) doivent permettre d'assurer une quantification précise pour aider au diagnostic médico-légal. Deux applications sont présentées. Premièrement, le screening de gaz d'intérêt forensique et dosage par étalons internes isotopiques stables générés in situ. Deuxièmement, l'investigation de la composition des gaz de putréfaction cadavérique.

Méthodes

Les analyses sont effectuées par HS-GC-MS/MS. Un screening puis un dosage des gaz éventuellement présents sont réalisés grâce à une séparation avec une colonne Select Permanent Gas (tamis moléculaire 5 Å et CP-Parabond montés en parallèle), permettant de maximiser le nombre de gaz détectables en une seule injection. L'acquisition des signaux MS se fait en mode SIM sur les différents ions moléculaires d'intérêt et la quantification se fait grâce à une calibration interne à partir d'étalons internes isotopiques stables générés in situ (EIS). La composition des gaz de putréfaction cadavérique est mesurée par TCD avec une quantification par calibration externe et vérification par détection MS.

Résultats

Différentes méthodes d'analyse de gaz d'intérêt forensique ont été développées et validées sur des échantillons postmortem. L'approche de quantification de gaz par EIS est documentée par des exemples concrets d'applications forensiques. Par exemple, des étalons internes deutérés sont générés pour la quantification des alcanes volatils (méthane, propane, butane) par l'action de l'eau lourde (D₂O) sur le chlorure d'alkyl magnésium (Réactif de Grignard) correspondant. De manière similaire, des étalons internes ¹³C peuvent être générés pour la quantification du monoxyde de carbone² et du dioxyde de carbone et ont été utilisés dans plusieurs cas d'intoxications mortelles. Parallèlement, la technique HS-GC-MS/MS nous a permis d'investiguer la composition des gaz de putréfaction cadavérique en fonction du délai postmortem, de la cause du décès et des conditions environnementales.

Conclusion

Une nouvelle stratégie d'analyse de gaz d'intérêt forensique est présentée, depuis l'échantillonnage jusqu'à l'analyse. L'approche EIS permet un dosage précis des gaz mis en évidence dans les échantillons et devient une aide précieuse pour le diagnostic médico-légal. L'analyse de la composition des gaz de putréfaction cadavérique permet de documenter plus précisément les circonstances du décès sur les corps altérés.

12

INFLUENCE OF THERMAL HAIR STRAIGHTENING ON TETRAHYDROCANNABINOL AND CANNABINOL

Ettlingler J, Yegles M

Laboratoire National de Santé, Toxicologie, Luxembourg

Objective

It has been shown that bleaching and dyeing may decrease THC content in hair. Nowadays hair straightening has become an often daily hair treatment especially for women. So far, no studies exist about the influence of this heat treatment on the cannabis content in hair. The aim of this study was to investigate the effect of thermal hair straightening on the Tetrahydrocannabinol (THC) and Cannabinol (CBN) content in hair.

Methods

17 positive THC and CBN hair samples were treated *in vitro* with a hair straightener during 1 min at 200°C. After washing, incubation with NaOH (1 N), solid-phase extraction and silylation, analyses were performed by GC/MS-EI. THC and CBN contents in straightened hair strands were then compared with those in the corresponding untreated strands.

Results

In 11 of 17 hair samples a decrease of THC content was found ranging from 3.0% to 100% (average 38.6%) whereas in 6 cases an increase was shown ranging from 4.6% to 67.2% (average 21.6%).

In all hair samples CBN concentrations was explicitly higher after straightening. The increase ranges from 72% to 751% (average 223%).

One hypothesis to explain the increase of THC may be that for some hair samples hair matrix is more denaturated by thermal treatment possibly causing a better extraction of THC during incubation with NaOH. The variation of THC results seems to be depending on hair colour because increasing concentrations were only found in dark coloured hair. The decrease of the THC content may be explained by thermic *in vitro* denaturation. One hypothesis to explain the strong increase of CBN content may be the fact that THC is decomposed in presence of oxygen and heat into CBN.

Conclusion

This study indicates that thermal hair straightening has an impact on the contents of THC and CBN in hair. This hair treatment has to be considered for a correct interpretation of hair results.

14

INGESTION ACCIDENTELLE DE CANNABIS CHEZ UN ENFANT: INTÉRÊT DE L'ANALYSE CAPILLAIRE

Besnard T¹, Nicolas M¹, Cheze M², Deveaux M²¹Laboratoire LTB, Narbonne; ²Laboratoire Toxlab, Paris, France

Objectif

Nous rapportons le cas médico-légal d'un jeune enfant de 21 mois emmené aux urgences pédiatriques pour crise convulsive. Au moment de l'hospitalisation, l'enfant est hypotonique et on retrouve lors de l'analyse toxicologique de routine la présence de cannabis dans les urines. A J+3, le père de l'enfant, consommateur chronique de cannabis, décide de porter plainte pour empoisonnement contre son ex-femme, également consommatrice, qui en avait la garde au moment des faits. Une enquête judiciaire est ouverte et une demande d'analyse capillaire segmentaire est ordonnée à J+30. Cependant, lors de la présentation de l'enfant par le père, les cheveux du jeune garçon ont été coupés très courts par ce dernier. Seulement une mèche de 1 cm a pu être analysée.

Méthodes

La mèche de cheveux a été lavée deux fois par du dichlorométhane. Après séchage, elle a été coupée en petits fragments de 1 mm et 20 mg de poudre ont subi une hydrolyse alcaline à 80°C pendant 15 minutes. Ensuite 2 mL d'hexane et 1 mL d'acétate d'éthyle ont été utilisés pour réaliser l'extraction. Après centrifugation, la phase organique a été récupérée et évaporée à froid. Du BSTFA a été ajouté à l'extrait sec et mis en contact pendant 15 minutes à 80 °C. 2 µL de cette solution dérivée ont été injectés dans un chromatographe en phase gazeuse AGILENT® 5890 et analysés par un spectromètre de masse triple quadripôle (TSQ 7000 THERMOFISCHER®). La phase stationnaire de la colonne était constituée de 5% méthyl et 95% diméthylpolysiloxane. L'analyse a été réalisée en mode SIR avec recherche du THC (ions 386,0; 314,7; 371,3), du cannabidiol (ions 390,0; 300,7; 319,3), du cannabinalol (367,0; 294,7; 310,3) et du 11-OH-THC (ions 371,0; 264,7; 289,3). Du THC-D3 et du 11-OH-THC-D3 ont été utilisés comme étalons internes.

Résultats

Du THC a été trouvé à la concentration de 470 pg/mg avec du cannabinalol (145 pg/mg) et du cannabidiol (288 pg/mg). Absence de 11-OH-THC.

Conclusion

L'analyse capillaire a permis de mettre en évidence la présence de THC en quantité importante (470 pg/mg) dans le mois qui a suivi les faits. Cette concentration de THC correspond à celle retrouvée chez un consommateur chronique fumant 1 joint par jour. La contamination passive étant exclue. Étant donné la longueur de la mèche analysée (1 cm), il n'a pas été possible d'établir une possible intoxication chronique au cannabis. L'enquête a conclu à une ingestion accidentelle de THC sous forme de résine par l'enfant. Très peu de cas d'accidents par ingestions de cannabis sont décrits dans la littérature scientifique avec notamment une analyse capillaire pour documenter le cas. Cette intoxication que nous rapportons ici montre tout l'intérêt de l'analyse de cheveux pour confirmer a posteriori une exposition au cannabis lorsque qu'il y a suspicion soit par la symptomatique et/ou par des analyses sanguines et/ou urinaires positives au cannabis.

15

TOXICOKINETICS OF COCAINE AND METABOLITES IN A BODY-PACKER BECOMING SYMPTOMATIC

Hantson P, Capron A, Wallemacq P

¹Louvain Centre for Toxicology and Applied Pharmacology, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium

Background

There are relatively few in vivo data regarding the toxicokinetics of cocaine and its metabolites in body-packers who develop clinical symptoms and require surgical management. We describe here a case with serial determination of plasma concentrations of cocaine and its metabolites.

Methods

A 35-yo body-packer presented in the airport security area with clinical signs of cocaine toxicity. There was evidence of bowel obstruction. The plasma and urine concentration of cocaine, benzoylecgonine (BZE) and ecgonine methyl ester (EME) was determined 1 hour after symptoms onset, during surgery and postoperative period. Quantification was performed with a HPLC-MS/MS system after extraction at pH 8.9 with chloroform/2-propanol. This method is routinely used in our forensic & clinical toxicology laboratory.

Results

The measured plasma peak value at 1h was 594 ng/ml for cocaine, 9423 ng/ml for BZE and 3261 ng/ml for EME. We confirm the following order BZE>EME>cocaine for peak plasma concentrations. A rebound in plasma levels was found during surgery, together with electrocardiographic changes. Based on urine analysis, the cumulated concentrations of all metabolites and parents drug over the 15 h of collection represent a global amount of 0.802 g. It could be assumed that the body-packer has been exposed to a diffuse absorption of >2 g, explaining the clinical symptoms for a non-chronic cocaine user. Unfortunately, no hair analysis has been performed to assess the habit of consumption.

Conclusion

A total of 107 packets was eliminated and the patient survives. No rupture of any packet could be demonstrated, even if leakage is very likely according to clinical signs and toxicological data. Further toxicokinetics analysis is encouraged in body-packers who are symptomatic and survive urgent surgical procedures.

16

SYNDROME ASPHYXIQUE MORTEL APRÈS CONSOMMATION DE RACHACHA

Monteil-Ganerie C¹, Ricard O², Gaulier JM³, Chopineux D⁴, Barrios L², Pineau A¹, Dailly E¹, Clement R²¹Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, CHU, Nantes; ²Service de Médecine Légale, CHU, Nantes; ³Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, CHU, Limoges; ⁴IRCGN, Rosny sous Bois, France

Introduction

Le rachacha est une pâte fabriquée artisanalement à partir d'une décoction de tête de pavots. Ce produit rare, généralement consommé dans un cadre festif, est souvent utilisé pour atténuer les «descentes» difficiles après prise de produits stimulants ou hallucinogènes. Il est considéré par les utilisateurs comme étant sans danger. Nous rapportons 2 cas de décès après ingestion de rachacha.

Méthodes

Au cours d'une soirée, 3 personnes consomment des boissons alcoolisées, du cannabis et, chacune, une boulette de rachacha. La soirée se termine vers 1 h 30. Vers 14 h 30, 2 personnes (1 homme H, 1 femme F) sont découvertes décédées par le 3^{ème} sujet, celui-ci ayant entendu l'homme décédé ronfler à plusieurs reprises au cours de la matinée. Dans la poubelle, les enquêteurs retrouvent une matière résineuse noire qui sera placée sous scellé. A l'autopsie (48 h plus tard), les corps, pourtant conservés à 4 °C, sont dans un état de putréfaction avancée. Un important syndrome asphyxique est observé, jugé responsable des décès. Des prélèvements biologiques sont effectués (sang cardiaque, bile, urine, humeur vitrée, contenu gastrique). Une mèche de cheveux est prélevée.

Résultats

De la morphine et de la codéine ont été identifiées et dosées dans le sang des 2 sujets, ainsi que du clobazam, du desméthylclobazam et du THC-COOH chez l'homme uniquement. La 6-acétylmorphine n'a pas été détectée dans le sang, ni dans l'urine.

	Morphine (µg/L)	Codéine (µg/L)	THC-COOH (µg/L)	Clobazam (µg/L)	DMClobazam (µg/L)
H	313	52	5,2	78	236
F	11181	586	ND	3	11

L'éthanol a été dosé dans les différents milieux analysés: H: sang cardiaque 0,15 g/L, humeur vitrée 0,13 g/L, urine 2,15 g/L; F: sang cardiaque 2,84 g/L, bile 3,31 g/L.

L'analyse de la matière résineuse noire montre la présence de morphine (5,2%), codéine (0,51%), saccharose et glucose. Un dosage de produits stupéfiants dans les cheveux a montré la présence de morphine et de codéine dans tous les segments analysés (1 pour H et 2 pour F (0-2 cm, 2 cm-pointe)), avec des concentrations similaires d'un segment à un autre pour chaque molécule. L'héroïne et la 6-acétylmorphine n'ont pas été détectées.

Conclusion

La présence dans le sang de morphine et de codéine, avec absence de 6-acétylmorphine, est compatible avec la consommation récente de rachacha. Les résultats très élevés pour F peuvent être dus à une redistribution post-mortem. La présence d'éthanol dans l'humeur vitrée est le témoin d'une consommation d'alcool. La période agonique ayant duré chez l'H environ 10 heures, l'alcoolémie en fin de soirée peut être estimée supérieure à 1,0 g/L. La composition et les caractères organoleptiques de la matière résineuse permettent de l'identifier comme étant du rachacha. Du fait de concentrations similaires dans tous les segments, les composés identifiés dans les cheveux peuvent provenir d'une contamination post-mortem par des liquides de putréfaction et/ou de la sueur (1). L'analyse des cheveux ne permet pas, ici, d'affirmer ou d'infirmer une consommation régulière. En résumé, le syndrome asphyxique observé à l'autopsie provient d'une toxicité conjointe des opiacés et de l'éthanol. Ces deux cas montrent que le rachacha n'est pas un produit inoffensif et soulignent la dangerosité des consommations multiples.

Référence

1. Kintz P. Segmental hair analysis can demonstrate external contamination in postmortem cases. *Forensic Sci Int* 2012; 215: 73-76.

17

APPLICATION DE LA RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE (RMN) EN TOXICOLOGIE JUDICIAIRE

Denoz R^{1,2}, Frederich M², Charlier C^{1,2}, De Tullio P²¹Laboratoire de Toxicologie Clinique, Médico-Légale, Environnementale et d'Entreprise, Université de Liège, Liège; ²Centre Interfacultaire de Recherche du Médicament (CIRM), Université de Liège, Liège, Belgique

Objectifs

La spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une des techniques analytiques apportant le plus d'informations structurales pour les composés organiques. Son apport est en général indispensable dans l'identification de composés inconnus et elle représente un complément essentiel à la spectrométrie de masse. Malgré une relative faible sensibilité, les avantages de la RMN sont nombreux puisque cette méthode est rapide, quantitative, non destructrice, reproductible. Les récentes avancées technologiques ont permis à cette technique de devenir un outil extrêmement efficace dans l'analyse de composés inconnus et dans l'identification et le dosage de dérivés organiques dans des mélanges complexes. Cette approche est donc parfaitement applicable en toxicologie judiciaire et pourrait devenir un support plus intéressant dans l'identification de drogues ou de substances saisies qui ne seraient pas aisément identifiables par des méthodes classiques.

Méthodes

Suivant la solubilité, les mélanges à analyser (quelques mg) seront dissous dans une faible quantité (700 µl) de solvants deutérés avant d'être placés dans des tubes RMN 5 mm puis mesurés à l'aide d'un spectromètre Avance 500 MHz équipé d'une sonde cryogénique 5 mm de type TCI. Des spectres monodimensionnels (¹H) et bidimensionnels homo- (COSY) ou hétéronucléaires (HSQC et HMBC) peuvent alors être enregistrés selon la nécessité et la complexité des substances à analyser.

Résultats

Plusieurs substances inconnues ont été saisies par les Services de Police. Elles ont été analysées par RMN mono et bidimensionnelle de manière à obtenir un maximum de données spectrales et structurales. L'ensemble de ces données a permis de proposer des structures pour chacun des composés. Ces structures ont été confirmées par la détermination des masses exactes et des compositions élémentaires via une analyse LC/MS-MS. Après vérification, les drogues ont pu être reliées à des cannabinoïdes de synthèse connus et proposés sur Internet mais non encore décrits comme substances illicites (1).

Un autre exemple concerne l'analyse par RMN (¹H et COSY) d'une poudre inconnue qui s'est rapidement révélée être constituée majoritairement de sucrose et ne contenir aucune substance illicite.

Conclusions

Combinée à d'autres techniques d'analyses, la RMN est un outil qui peut se révéler extrêmement puissant et utile dans l'élucidation de la composition de mélanges ou de substances. Rapide et quantitative, elle pourrait à l'avenir devenir une aide de premier ordre dans l'analyse de substances inconnues ou difficilement identifiables via les techniques classiquement utilisées en toxicologie.

Référence

1. Identification and structural elucidation of four cannabimimetic compounds (RCS-4, AM-2201, JWH-203 and JWH-210) in seized products. Denoz R, Vanheugen JC, Frederich M, de Tullio P, Charlier C. *J Anal Toxicol* 2013 Mar; 37(2): 56-63.

18

INTOXICATION FATALE PAR INGESTION D'UN HERBICIDE, LE DIMÉTHÉNAMIDE

Ferec S¹, Bretauadeau M², Bruneau C², Queneau A-C³, Gaudin A³, Gaulier J-M⁴, Lelievre B¹, Turclement A¹

¹Laboratoire Pharmacologie-Toxicologie, ²Centre antipoison-Toxicovigilance CHU Angers; ³Service Médecine légale CHU Angers; ⁴ Pharmacologie-Toxicologie CHU Limoges, France

Objectifs

Le diméthénamide (C₁₂H₁₈ClNO₂S) est un herbicide de la famille des chloroacétamides, analogue de l'alachlore. Il est commercialisé en France sous forme énantiomérique S (diméthénamide-P, Isard®, Spectrum®...) comme inhibiteur de la croissance des mauvaises herbes sur cultures de maïs ou de betteraves à sucre. Un cas médical de décès après ingestion de ce produit est rapporté.

Cas clinique

Un patient de 60 ans, sans antécédent médical connu, est découvert mort à son domicile (décès < 48h). L'intention suicidaire est fortement suspectée. À l'autopsie, une forte odeur, faisant penser à des hydrocarbures, est notée dans le contenu gastrique. Les poumons sont légèrement oedémateux. Un syndrome asphyxique non spécifique sera confirmé par les données d'anatomo-pathologie. La vessie est vide. Trois prélèvements (sang cardiaque, liquide gastrique et bile) sont effectués à la demande de la justice pour recherche des causes de la mort.

Matériel et méthodes

Une recherche de substances volatiles par CG/SM après extraction solide sur microfibre (SPME) et une recherche large de médicaments et toxiques par CG-SM et CL-UV/BD sont effectuées. En raison de difficultés de quantification du diméthénamide par CL-UV après extraction liquide-liquide, une méthode par CL-SM-SM après simple précipitation des protéines par acétonitrile est développée en mode ESI+ et MRM (transitions m/z 275,9 > m/z 244,2 et m/z 275,9 > m/z 167,9).

Résultats

L'alcool est négatif dans le sang et l'urine. Des hydrocarbures de type C10 à C14 (alkylbenzène, méthyl naphthalène) sont identifiés après SPME. L'activité des pseudo-cholinestérasés dans le surnageant plasmatique est normale. Les recherches larges de médicaments et toxiques montrent la présence de plusieurs composés initialement non identifiés par nos bases de données. L'identification du diméthénamide est faite par un 2^e laboratoire. Ce résultat est confirmé dans nos conditions analytiques après obtention de la poudre pure. Des métabolites possibles du diméthénamide sont mis en évidence par analogie spectrale UV. La concentration de diméthénamide dans le surnageant de centrifugation du sang, conservé à -20 °C, est égale à 10 mg/L et dans le liquide gastrique à 130 mg/L. Un liquide ambré, trouvé ultérieurement au domicile dans un flacon déconditionné, est identifié comme contenant bien le diméthénamide et les hydrocarbures aromatiques avec un profil chromatographique tout à fait comparable.

Discussion

Des difficultés analytiques de reproductibilité d'extraction ou de stabilité de produit à l'évaporation, d'une part, et une instabilité dans le surnageant de centrifugation du sang au cours du temps en fonction de la température de conservation, d'autre part, ont été observées. Le diméthénamide n'a pas été retrouvé dans le sang total conservé à 4°C et analysé 5 mois plus tard. Concernant la toxicité aiguë humaine, aucune donnée n'a été retrouvée dans la littérature. Les données expérimentales chez le rat font état d'une DL50 (voie orale) voisine de 500 mg/kg.

Conclusion

En l'absence de causes formelles au décès (autopsie, anatomo-pathologie) et en l'absence d'autre substance identifiée dans les liquides biologiques, le décès semble imputable à la prise de cet herbicide.

19

DÉCÈS SUITE À UNE INGESTION DE MÉTHYLONE

Barrios L¹, Grison-Hernando H², Montassier E³, Boels D⁴, Monteil-Ganieri C¹, Dailly E¹, Pineau A¹, Harry P⁴, Clement R⁴

¹Médecine légale, CHU, Nantes; ²Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, CHU, Nantes; ³SAMU, CHU, Nantes; ⁴Centre antipoison, CHU, Angers, France

Objectif

La méthylone (3,4-méthylène-dioxy-méthcathinone) est un dérivé synthétique de la cathinone. Essentiellement vendue sur Internet, sous l'appellation «bath salts» (sels de bains), elle est consommée pour ses effets euphorisants proches de ceux du MDMA (ecstasy). Nous rapportons le premier cas de décès en France, suite à une consommation de méthylone.

Méthodes

Au cours d'une soirée festive, un homme de 21 ans présente des difficultés respiratoires, accompagnées de polygnée. À l'arrivée du SAMU, appelé devant la persistance du malaise, il se trouve en arrêt cardio-respiratoire. Il présente un trismus du masséter, qui gêne pour l'intubation, et une raideur généralisée du corps. Il décède malgré les manœuvres de réanimation. À l'autopsie, on observe un syndrome asphyxique. Différents prélèvements (sang périphérique, sang cardiaque, urine, bile, contenu gastrique et humeur vitrée) sont effectués. Un échantillon du produit consommé, saisi par les enquêteurs, est aussi transmis au laboratoire. Ce produit aurait été vendu à la victime comme étant de l'ecstasy.

Résultats

L'analyse du sang périphérique montre l'absence d'alcool et de médicaments. Le dosage des produits stupéfiants habituellement recherchés montre l'absence d'opiacés, cocaïniques et amphétaminiques, et la présence de cannabinoïdes (THC 12,7 ng/ml; THC-COOH 29,3 ng/ml; 11-OH-THC 4,9 ng/ml). Un pic chromatographique apparaît sur les tracés du screening UPLC/BD et CPG/MS, dans le sang et les urines, ayant mêmes caractéristiques spectrales et temps de rétention, que le pic obtenu lors de l'analyse du produit saisi par les enquêteurs. Le produit correspondant est identifié comme de la méthylone et dosé dans les différents liquides biologiques par LC/MS-MS, après extraction en ligne, en utilisant la méthylone-d3 comme étalon interne:

Prélèvement	Concentration (mg/L)
sang périphérique	3,13
sang cardiaque	6,64
urine	502
bile	35,3
contenu gastrique	57,3
humeur vitrée	5,04

La seule molécule organique présente dans le produit saisi est la méthylone (83,3%).

Conclusion

Les analyses ont montré une consommation de cannabis et de méthylone avant le décès. Dans la littérature, les cas de décès liés à la méthylone seule montrent des concentrations dans le sang périphérique comprises entre 0,56 et 3,3 mg/L [1, 2, 3]. La concentration de méthylone dans le cas présent est élevée. Le décès peut provenir d'un syndrome de détresse respiratoire consécutif à l'absorption d'une quantité importante de méthylone. Les résultats des analyses toxicologiques sont en accord avec les observations du SAMU (trismus, raideur, arrêt cardio-respiratoire) et les signes d'asphyxie observés en *post-mortem*.

Références

1. Pearson JM. et coll. Three fatal intoxications due to methylene. *J Anal Tox* 2012; 36: 444-451.
2. Cawse BM. et coll. Distribution of methylene in four post-mortem cases. *J Anal Tox* 2012; 36: 434-439.
3. Carbone PN. et coll. Sudden cardiac death associated with methylene use. *Am J Forensic Med Pathol* 2013; 34: 26-28.

20

DRIVING UNDER THE INFLUENCE OF DRUGS: 2.5 YEARS OF ORAL FLUID ROADSIDE TESTING

Maudens K¹

¹Toxicological Centre, University of Antwerp, Wilrijk, Belgium

Background

On October 1st, 2010 the Belgian driving-under-the-influence-of-drugs legislation had undergone a dramatic change: oral fluid screening was replaced urine screening. At the same time, confirmation cut-offs in plasma have been halved.

Objective

To evaluate this change of law by comparing screening and confirmation results of the last 2.5 years of the old law (urine screening – old cut-offs) to the first 2.5 years of the new law (oral fluid screening – new cut-offs). To drive or not to drive ... that's the question!

Methods

The screening and confirmation results in our lab of more than 1000 samples in each time period were compared.

Results and discussion

Although the mean number of parameters positive in a sample has not changed considerably (1.5 parameters positive in urine screening vs. 1.4 in oral fluid screening), the contribution of the individual parameters has changed: cannabis positives have lowered from 82% (urine) to 50% (oral fluid), cocaine positives have increased from 30% (urine) to 44% (oral fluid), amphetamine/MDMA positives have increased from 23% (urine) to 35% (oral fluid) and opiates positives have remained constant (11% in urine vs. 10% in oral fluid).

Much more cannabis samples are now confirmed in plasma (THC concentration above cut-off): 88% with the new law vs. 69% with the old law. This is mainly due to the difference in screening parameter (THC-COOH in urine vs. THC in oral fluid). Confirmation of cocaine (cocaine and/or benzoylecgonine above cut-off) is comparable: 68% with the new law vs. 63% with the old law. This means that the number of samples not confirmed by plasma analysis stays relatively high. Confirmation of amphetamine/MDMA is almost identical (amphetamine and/or MDMA above cut-off): 77% with both laws. The oral fluid to blood ratio for amphetamines, the cross-reactivity of the screening tests and the increase of new psychoactive stimulants are important factors to take into consideration. The confirmation of morphine in plasma above the cut-off remains problematic: only 33% of the samples are confirmed by the new law vs. 32% with the old law. The cross-reactivity of the screening tests for other opiates can explain this phenomenon to a large extent.

In general, more driver licenses are withheld correctly: 87% with the new law vs. 82% with the old law.

Conclusion

The introduction of the new law, comprising both introduction of oral fluid screening and lowering of plasma confirmation cut-off, has led to a better outcome.

21

EFFETS DE L'ASSOCIATION DU Δ-9-TÉTRAHYDROCANNABINOL OU DE L'ACIDE γ-AMINOBUTYRIQUE À L'ÉTHANOL SUR LA TEMPÉRATURE CORPORELLE CHEZ LE RAT

Roussel O^{1,2}, Risède P¹, Houzé P^{3,4}, Baud FJ^{1,5}

¹INSERM U705, Paris, France; ²IRCGN, Rosny/Bois, France; ³Hôpital Saint-Louis, Paris, France; ⁴Laboratoire C-TAC A4463, Paris, France; ⁵Hôpital Lariboisière, Paris, France

Objectif

La consommation de substances récréatives expose l'utilisateur à des perturbations de la température corporelle, potentiellement létales dans le cas de l'ecstasy ou de l'alcool. D'autres substances sont connues pour modifier dans une moindre mesure la température corporelle comme le δ-9-tétrahydrocannabinol (THC) hypothermisant ou l'acide γ-aminobutyrique (GHB) qui provoque une hypothermie à évolution triphasique. Ces substances étant fréquemment associées à l'alcool, nous avons vérifié les conséquences de cette association sur la régulation de la température.

Méthodes

Les rats Sprague-Dawley mâles âgés de 7 à 9 semaines sont distribués aléatoirement entre les groupes: [Témoins]; [THC 3 mg/kg] et [THC 8,4 mg/kg]; [GHB 300 mg/kg] et [GHB 600 mg/kg] et leurs combinaisons à la dose d'éthanol soit de 1 g/kg, soit de 3 g/kg. La température corporelle est mesurée en continu grâce à une sonde intra-abdominale (TA10TA-F20, Data sciences international) implantée par laparotomie au plus tôt 4 jours avant l'expérimentation. L'étude a été menée pendant 4 heures au sein d'un laboratoire climatisé. Les animaux étaient placés dans des enceintes non thermostatées mais dont la température était mesurée en continu.

Résultats

Les rats témoins sont restés asymptomatiques et normothermes. Les rats du groupe Éthanol 1 g/kg ont présenté des incoordinations et périodes de sommeil mais sont restés normothermes. La dose d'alcool de 3 g/kg a provoqué un coma prolongé et une hypothermie marquée (maximale à t_{150min}: 34,8 ± 0,5 °C, p < 0,001 vs [Témoins]). Les animaux du groupe THC 3 mg/kg et 8,4 mg/kg ont présenté des signes d'incoordination, de prostration et une hypothermie d'autant plus intense que la dose était importante (maximale à t_{120min}: [THC 3 mg/kg]: 36,3 ± 0,3 °C, ns et [THC 8,4 mg/kg]: 34,9 ± 0,3 °C, p < 0,001 vs [Témoins]). L'association de l'éthanol au THC provoque pour les deux doses une augmentation des effets cliniques et de l'hypothermie (à t_{120min}: [THC 3 mg/kg + Éthanol 1 g/kg]: 35,6 ± 0,3 °C, p < 0,001 vs [THC 3 mg/kg]: 36,9 ± 0,3 °C et [THC 8,4 mg/kg + Éthanol 3 g/kg]: 33,2 ± 0,5 °C, p < 0,001 vs [THC 8,4 mg/kg]: 35,7 ± 0,3 °C). Le GHB provoque une sédation et une variation triphasique de température: hypo-, hyper-, hypothermie dont l'intensité est proportionnelle à la dose. Lors de l'association à l'éthanol, les signes cliniques se sont intensifiés, en revanche la température corporelle a peu varié. Les rats ayant reçu l'association du GHB avec l'éthanol à la 3 g/kg n'ont pas présenté d'hypothermie marquée comme ceux ayant reçu l'éthanol isolément (à t_{120min}: [GHB 600 mg/kg]: 37,1 ± 0,4 °C vs [GHB 600 mg/kg + Éthanol 3 g/kg]: 34,5 ± 0,3 °C, p < 0,001).

Conclusion

L'association de l'éthanol au THC a provoqué une augmentation de l'effet hypothermisant (synergie ou intensification de l'effet) cohérente avec quelques observations rapportées. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette synergie: i) une action combinée des substances sur le centre de la thermorégulation; ii) le stress induit par l'expérimentation ou/et par la combinaison des propriétés psychoactives de chacune des substances; ou iii) une interaction toxicocinétique. L'association de l'éthanol au GHB n'a pas modifié les variations de températures induites par le GHB seul, mais a masqué l'hypothermie induite par l'éthanol. Cette observation est en faveur d'une additivité voire d'un antagonisme des effets. Enfin, les hypothermies ont été mesurées à la température du laboratoire (20–22°C), et pourraient être plus intenses à des températures plus basses et ainsi provoquer par elles-mêmes un trouble de conscience voire le décès par arrêt cardiaque.

22

AMAZING RESUSCITATION OF A DESPERATE COMA STATE IN AN ELDERLY WOMAN

Grossenbacher E¹, Djerada Z², Melin L³, Camus M³, Mourad M-C⁴, Carolet C³¹Toxicologist Physician, ²Toxicology and pharmacology Laboratory, ³Emergency Department, ⁴Pharmacovigilance Center Reims, University Hospital Reims, 45 rue cognac-jay, 51092 Reims, France

Introduction

Suicide attempt on elderly cause 3000 fatalities a year. Modification of pharmacokinetic and pharmacodynamic on people over 65 years old, can induce while ingesting psychotropics, curious and severe clinical features.

Case report

A 87 years old woman living in a home for the aged is found unconscious at 9 a.m.. On first exam, by an emergency medical team; Glasgow Coma score was 3, with miosis, Respiratory rate was 8/ mn, SPO2 70%, Blood pressure was 90/70 mmHg and Heart rate 62 bpm. Dextro was 9 mmol/l. Temp was 36 °C. ECG shows normal PR and thin QRS. A severe cerebral stroke was then suspected. Past history was arthritis, depression. Looking at the scene, the physician evocated a possible suicide attempt. Ixprim[®] (paracetamol and tramadol), bromazepam, homeopathy were found in the flat. Naloxone (0.4 mg) is then used unsuccessfully. A dose of 0.3 mg flumazenil makes the patient rapidly alert and awake. An infusion of flumazenil 0.2 mg/h is then continued for 34 hours more with good outcome. Toxicologic routine tests (IE) is positive for benzodiazepines, negative for opiates, paracetamol and alcohol. HPLC finds only bromazepam (initial dosage: 750 microg/l, 24 h later 488 microg/l).

Discussion

People of over 65 years old are subject for suicide attempts 2 folds more than younger (and increase year after year because long aging). Psychotropics, cardiotropics, anticoagulants, painkillers (eg) are well used on elderly people. Severe Adverse events are more frequent, due to alteration of organism (liver and kidney) while aging. Overdose with tramadol induce an opiate syndrome. Bromazepam is a benzodiazepine (with good anxiolytic, low hypnotic myorelaxant properties), with a plasma half-life 8-19 h (mean 12), volume of distribution 0.9 l/ kg, protein binding 70% (1). Daily dose is usually 6 mg. Toxic dose in infant is 2 mg/kg. Stroke was the first diagnostic of the emergency medical physician send at home. During clinical examination, the sight of the scene was disturbing because of a perfect cleaning in the whole flat, so early. On a table near the patient, it was found a box containing funeral insurance with a bank check who's dating was the last day. Knowing those data, suicide attempt with Ixprim[®] was suspected because of coma, miosis, respiratory failure needing antidote as naloxone with a poor effect. Flumazenil made an amazing sudden resuscitation. Toxic samples revealed none paracetamol and no opiates in urine; Ixprim[®] hypothesis was banned. Bromazepam was then the only guilty agent. In a study (1) 2 pills of 6 mg bromazepam produce a level of 11-17 microg/l (2). On modelisation accorded to this women, the dose ingested may correspond to 24-42 pills. We can conclude that an ingestion of simple box (30 pills) of bromazepam, well tolerated in young people; is lifethreatening on elderly. Single poisoning bromazepam is rare; few fatalities are known (3).

Conclusion

Sight of the scene by an experiment Clinical Toxicologist can avoid Forensic Science. Warning of the benzodiazepines severe adverse events in elderly have to be renewed.

References

1. Clarkes, fourth edition, 993-994.
2. Randall 19th edition, 187-188.
3. Kintz P, *Toxicologie et pharmacologie médico-légales* 1998.

23

SURVEILLANCE BIOLOGIQUE DES EXPOSITIONS PROFESSIONNELLES À DES PRODUITS CHIMIQUES: PLACE DANS L'ÉVALUATION DES RISQUES, ET MISE EN ŒUVRE PRATIQUE, BESOINS ET PERSPECTIVES

Pilliere F

Département Etudes et Assistance Médicales, Institut de recherche et de sécurité INRS, Paris, France

La surveillance biologique des expositions professionnelles (SBE) à des produits chimiques fait partie intégrante de l'évaluation des risques sanitaires, le plus souvent complémentaire de la surveillance des atmosphères. Elle ne s'envisage qu'après avoir conduit une évaluation des dangers et des expositions au poste de travail.

Plusieurs éléments vont guider le choix de(s) l'indicateur(s) biologique(s) d'exposition (IBE) le(s) plus approprié(s); la spécificité de l'IBE, sa sensibilité afin d'apprécier des expositions les plus basses possibles, sa corrélation aux mieux aux effets sur la santé sinon à l'intensité de l'exposition, la disponibilité d'une méthode d'analyse accessible en routine, sensible et spécifique et d'un coût raisonnable. L'existence de valeurs de référence dans la population générale et/ou professionnellement exposée est un outil essentiel pour l'interprétation des résultats.

La mise en place de cette SBE nécessite outre de choisir l'IBE, de définir le moment et le milieu de prélèvement et les modalités de prélèvement, de transport et de conservation de l'échantillon ainsi que le laboratoire compétent pour le dosage; elle suppose l'acquisition de connaissances préalables.

Le rôle du médecin du travail y est central: il pose l'indication de la SBE et est responsable de la prescription des examens biologiques, de la stratégie de mise en place, de la restitution et de l'interprétation des résultats.

Afin d'aider le médecin dans la mise en place pratique de la SBE, une base de données Biotox accessible gratuitement sur internet, en français www.inrs.fr/biotox a été mise en place et est mise à jour annuellement.

Il existe de nombreux besoins dans le domaine de la SBE en terme de valeurs de référence, de nouveaux IBE notamment pour apprécier les multi-expositions et les expositions faibles, de traçabilité des expositions; Ces besoins permettent d'orienter les travaux futurs dans ce domaine en constante évolution.

24

EVALUATION DE L'EXPOSITION PROFESSIONNELLE AUX CYTOSTATIQUES DES TRAVAILLEURS DE DEUX SERVICES DU CHU DE LIÈGE

Rusu D¹, Dubois N², Surleraux C¹, Mistretta V², Charlier C²¹Service de Prévention et de Médecine du Travail, Liège; ²Service de Toxicologie Clinique, Médi-co-légale, de l'Environnement et en Entreprise, CHU Liège, Belgique.

Objectif

L'exposition professionnelle aux cytostatiques a été évaluée dans deux services du CHU de Liège en procédant, d'une part, à la recherche des médicaments et métabolites dans les urines des travailleurs exposés et, d'autre part, à la mesure de la contamination des surfaces de travail.

Méthodes

Ce travail a été effectué dans deux services du CHU de Liège, la pharmacie, où sont préparés les perfusions de cytostatiques de manière centralisée et l'hôpital de jour, où les perfusions sont administrées aux patients. L'étude a porté sur 3 cytostatiques: le cyclophosphamide, le 5-fluorouracile et les dérivés de platine. En plus des frottis de surface effectués pour apprécier la contamination environnementale, et du biomonitoring urinaire, une enquête a été réalisée par questionnaire (notions de contamination, signes cliniques, effets toxiques et port des équipements de protection). Au total, nous avons procédé à 96 prélèvements de surface (63 à la pharmacie et 33 à l'hôpital de jour) et à 69 récoltes d'urine (2 à 3 prélèvements répartis sur une semaine chez 27 travailleurs). Les méthodes d'analyse utilisées dans le service de toxicologie ont été:

- UHPLC/MSMS pour le dosage du cyclophosphamide, du 4-oxo-cyclophosphamide et du FBAL dans les échantillons de surface et dans l'urine (1);
- ICP/MS pour le dosage du platine dans les échantillons de surface et dans l'urine.

Résultats

L'évaluation de la contamination des surfaces de travail a fourni les résultats suivants. A la pharmacie, 28 échantillons sur 63 ont montré la présence d'au moins 1 cytostatique (soit 43%). A l'hôpital de jour, sur 33 prélèvements, 13 se sont montrés positifs (soit 39%). Les dérivés de platine sont les plus présents. Par contre, aucune contamination n'a été mise en évidence au niveau du biomonitoring urinaire.

Conclusion

Malgré une contamination fréquente des surfaces de travail, la recherche des cytostatiques urinaires s'est toujours avérée négative. Les moyens de protection utilisés semblent donc efficaces. Cependant, la contamination des surfaces est tellement fréquente qu'il faudrait malgré tout renforcer les règles de sécurité.

Référence

1. Pretty JR et coll. Sampling and mass spectrometric analytical methods for five antineoplastic drugs in the healthcare environment. *J Oncol Pharm Pract* 2012; 18-23.

25

QUELLE PLACE POUR LES ACIDES MERCAPTURIQUES EN SURVEILLANCE BIOLOGIQUE D'EXPOSITION PROFESSIONNELLE?

Haufroid V

Louvain centre for Toxicology and Applied Pharmacology (LTAP), Université catholique de Louvain, Bruxelles, Belgique

Les substances chimiques électrophiles, ou celles qui sont directement métabolisées en composés chimiques eux-mêmes électrophiles, sont potentiellement toxiques car elles peuvent réagir *in vivo* avec de nombreuses macromolécules dont l'ADN et être à l'origine de phénomènes de mutagénicité. Ces composés sont en partie détoxifiés dans l'organisme grâce à leur conjugaison au glutathion pour donner naissance à une catégorie spécifique de métabolites appelés acides mercapturiques. Après un bref rappel sur les mécanismes à l'origine de la synthèse endogène de ces acides mercapturiques, deux questions pratiques concernant l'utilisation potentielle de ces biomarqueurs en surveillance biologique d'exposition professionnelle seront discutées: d'une part existe-t-il une valeur ajoutée de ces biomarqueurs par rapport à d'autres biomarqueurs existants et validés, et d'autre part faut-il tenir compte de l'influence des polymorphismes génétiques des enzymes de biotransformation, et en particulier des glutathion transférases (GST), dans l'interprétation des concentrations urinaires de ces biomarqueurs? Enfin, la validation analytique du dosage des acides mercapturiques spécifiques de l'exposition à l'oxyde d'éthylène (acide hydroxyéthylmercapturique, HEMA, LOQ: 1 µg/L), à l'oxyde de propylène (acide 2-hydroxypropylmercapturique, 2-HPMA, LOQ: 5 µg/L), à l'acroléine (acide 3-hydroxypropylmercapturique, 3-HPMA, LOQ: 5 µg/L) et au 1,3-butadiène (acide 3,4-dihydroxybutylmercapturique, DHBMA, LOQ: 5 µg/L et acide monohydroxy-3-buténylmercapturique, MHBMA, LOQ: 5 µg/L) sera présentée.

26

PLASMA MANGANESE: A PROMISING BIOMARKER OF MN INHALATION EXPOSURE IN WELDERS

Roels HA¹, Hoet P¹, Haufroid V¹, Geens T²

¹Louvain Centre for Toxicology and Applied Pharmacology, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium; ²Provikmo, Occupational Health Services, Bruges, Belgium.

Objective

There is raising concern about the potential neurotoxic effects of manganese (Mn) inhalation exposure in welders. Because most of the airborne particles in welding fume are in the respirable fraction (< 10 µm), their bioavailability is likely to be higher than for coarser dust exposure. As no well-validated biomarker for Mn exposure is available, we investigated the interest of measuring Mn in plasma (Mn-P) as a biomarker of Mn exposure in welders (1).

Methods

Ambient exposure to Mn in air (Mn-air) was determined by personal full-shift measurements (8 h) on Monday and Tuesday in a group of 28 welders (mean age 33 years, range 20-57) whose tasks were only welding related. They had on average a welding career of 9 years (range 1-40). IOM filter holders of 25 mm diameter were used to collect the inhalable airborne fraction of which >90% may be assumed to constitute the alveolar Mn particulate fraction. The filter holder was always fixed under the welding shield helmet in the breathing zone while welding. The filters were analyzed according to the OSHA ID-121 atomic absorption spectrometry procedure (LOQ: 0.83 µg/m³ for an air sampling volume of 1 m³). On the same days of air samplings, blood samples were collected before and immediately after the shift between 4 and 5 pm. Mn-P was determined by ICP-MS by using an Agilent 7500cx equipped with an Octopole Reaction System in the He mode (1/10 dilution of plasma with a Rh solution as internal standard; LOQ=0.20 µg/L). Certified internal quality controls, i.e. Seronorm[®] Trace Elements Serum, were analyzed during each analytical run.

Results

Mn-air concentrations in welding fume ranged on Monday from 1.3 to 729 µg/m³ (GM 25.9 µg/m³) and on Tuesday from 1.6 to 350 µg/m³ (GM 29.5 µg/m³). Overall GM of Mn-air amounted to 27.7 µg/m³. There was no significant difference in the Mn-air levels between the two sampling days. Mn-air (log values) of Tuesday correlated well with those of Monday (r=0.7, p<0.0001). On Monday, the after-shift Mn-P values of the welders correlated well with Mn-air values only when Mn-air was above 10 µg/m³. In spite of similar Mn-air exposure on Monday and Tuesday, the relationship between Mn-air and after-shift Mn-P strikingly differed on Tuesday. The inflection at 10 µg/m³ in the relationship between Mn-air and Mn-P was less obvious and for a doubling of log Mn-air the slope of the regression line was 2.3 times lower than on Monday, which may be explained by an enhanced Mn homeostasis. On Monday (1st day of workweek), a Mn-P value of 2 µg/L could distinguish between Mn-air levels above or below 20 µg/m³ with a sensitivity of 69% and a specificity of 82%.

Conclusion

This study indicates that Mn-P may be a useful biomarker of current exposure to Mn in welders and lends biological plausibility to the new TLV-TWA of 20 µg/m³ for Mn-air adopted by ACGIH (2) for exposure to respirable Mn particulate at the workplace.

References

- Hoet P et coll. Manganese in plasma: a promising biomarker of exposure to Mn in welders. A pilot study. *Toxicol Lett* 2012; 213: 69-74.
- ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) 2013. Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices, Cincinnati (USA), p. 37.

27

HUMAN BIOMONITORING IN EUROPE: RECENT DEVELOPMENTS TOWARDS MORE HARMONIZED APPROACHES

Casteleyn L¹, Biot P², Angerer J³, Castano A⁴, Den Hond E⁵, Koch H⁶, Kolossa-Gehring M⁶, Horvat M⁷, Schoeters G⁸, Sepai O⁹, Knudsen LE⁹, Bloemen L¹⁰, Joas A¹¹, Joas R¹¹, Katsonouri A¹², Cerna M¹³, Nielsen J⁹, Schwedler G⁶, Rudnai P¹⁴, Mulcahy M¹⁵, Gutleb A¹⁶, Ligočka D¹⁷, Fátima Reis M¹⁸, Gurzau E¹⁹, Halzlova K²⁰, Mazej D⁷, Esteban M⁴, Berglund M²¹, Crettaz P²², Exley K⁹, Aerts D²

¹University of Leuven, Belgium; ²FPS Health, Food Chain Safety and Environment, Belgium; ³Ruhr Universität Bochum, Germany; ⁴Instituto de Salud Carlos III, Spain; ⁵VITO, Belgium; ⁶Umweltbundesamt, Germany; ⁷Jozef Stefan Institute, Slovenia; ⁸Health Protection Agency, United Kingdom; ⁹University of Copenhagen, Denmark; ¹⁰Environmental Health Sciences International, The Netherlands; ¹¹BiPRO, Germany; ¹²Ministry of Health, State General Laboratory, Cyprus; ¹³National Institute of Public Health, Czech Republic; ¹⁴National Institute of Environmental Health, Hungary; ¹⁵Health Service Executive, Ireland; ¹⁶Centre de Recherche Public - Gabriel Lippmann, Luxembourg; ¹⁷Nofer Institute of Occupational Medicine, Poland; ¹⁸Institute of Preventive Medicine, Lisbon Faculty of Medicine, Portugal; ¹⁹Environmental Health Centre, Romania; ²⁰Public Health Authority of the Slovak Republic, Slovakia; ²¹Karolinska Institutet, Sweden; ²²Federal Office of Public Health, Switzerland.

Background and Objectives

In Action 3 of the Environment and Health Action Plan 2004 - 2010 the European Commission announced the development of a coherent approach to HBM in Europe. A pilot study tested the feasibility of ensuring reliable and comparable data and was implemented by the EU funded projects COPHES and DEMO-COPHES.

Methods

A EU common protocol was proposed and subsequently translated in national operational procedures for the pilot study. A central element was the implementation of quality assurance and control strategies at all levels, including ICs and EQUAS. Children (age 6-11) were defined as the primary target group of the study, with their respective mothers. Recruitment of 120 mother-child pairs per participating country was anticipated. Mercury in hair and cadmium, cotinine, and phthalate metabolites in urine were selected as biomarkers of exposure.

Results

1844 children and their mothers were recruited in 34 rural and urban sampling sites in 17 European countries. In general, exposure to the chemicals tested was well below the available guidance values and showed a large variation within and between countries. Questionnaire information on environment and life style allowed identifying factors that may influence the biomarker levels. The levels in children were highly correlated with the levels in their mother. In general younger children (6-8) had higher levels as compared to older children (9-11). Educational level of the mother had a significant influence on each of the biomarker levels: mercury level in hair increases in children and mothers if social class is higher, while cotinine, cadmium and some phthalate metabolites are lower with increasing educational level.

Conclusions

A common approach to HBM was demonstrated in 17 countries allowing to (i) generate comparable data for selected substances and (ii) provide recommendations for further studies and programs. These results, although not representative for the EU population, are the first step towards EU-wide databases on the distribution of the chemical burden in the population. These will allow authorities to monitor and evaluate the effectiveness of regulatory measures.

COPHES was funded by the EU DG FP7 Research – No. 244237. DEMOCOPHES was carried out thanks to a joint financing of 50% from the EU LIFE+ program (DG Environment – Life09 ENV/BE000410) and 50% from each participating country.

28

OCUPACIONAL AND INDIVIDUAL VARIATION FACTORS OF URINARY AND BLOOD MANGANESE: A CROSS-SECTIONAL STUDY ON 2000 SUBJECTS OF THE GENERAL POPULATION OF NORTH OF FRANCE

Tagne-Fotso R¹, Leroyer A^{1,2}, Howsam M³, Dehon B⁴, Labat L⁴, Nisse C^{1,2}, and the Regional North-Pas de Calais Health Centres

¹University department of occupational health, Lille 2 University, Lille, France; ²Public Health Department, Lille University Hospital, Lille, France; ³University Centre of Measurements and Analysis, Lille 2 University, Lille, France; ⁴Toxicology and Genopathy laboratory, Lille University Hospital, Lille, France

Objective

We performed a study aiming to determine the distribution of 14 trace elements in blood and urine of a sample of general population of North of France and we investigated the factors modulating the observed concentrations. Only manganese (Mn) results will be presented here. Few reference values exist for manganese, and not yet in France. Manganese is an essential nutrient and is ubiquitous in the environment. In workers exposed to high Mn compounds concentrations, neurological effects called manganism have been described. Subclinical neurological effects such as deficits in tests of neuromotor or cognitive function and altered mood states, have also been associated with prolonged low-level manganese exposure in the workplace or in environmental media close to manganese-emitting industries. Therefore it appears interesting to describe the regional distribution of 2 biomarkers of exposure to manganese (blood and urine concentrations), and useful for the interpretation of biomonitoring in occupational setting.

Methods

A cross-sectional study was conducted between 2008 and 2010 to enroll 2000 residents of 20-60 years of the north of France, recruited by the Regional Health Centres. Quota method was used to warrant the representativeness of the participants on sex, social category and smoking habits, according to the census of the french National Institute of Statistics and Economic Studies (INSEE). Each subject completed a questionnaire on individual, environmental, and occupational characteristics. The levels of 14 metals (aluminum, antimony, arsenic, beryllium, cadmium, cobalt, chromium, mercury, manganese, nickel, lead, thallium, vanadium, zinc) were quantified by ICP-MS on urinary and blood samples. Variation factors of Mn were studied separately on men and women, by simple then multiple linear regressions (Mn levels), and simple then multiple logistic regressions (Mn levels upper the 90th percentile).

Results

Geometric means in blood and urine were respectively 7.30 and 0.43 µg/L in men and 8.12 and 0.45 µg/L in women. Factors associated with having a blood Mn level above the 90th percentile of the distribution were for men, occupation in aluminum products manufacture (OR=6.06, 95%CI: 1.51-21.36) and for women, amicrocytic anemia (OR=52.35, 95%CI: 19.52-162.31), living close to farmland (OR=1.81, 95%CI: 1.06-3.00) and daily fresh fruit consumption (OR=3.85, 95%CI: 1.52-11.92). In urine, the factors identified were for men, farmwork (OR=3.35, 95%CI: 1.17-8.44) and for women, working in the textile industry (OR=9.76, 95%CI: 1.69-56.24), daily cereal consumption (OR=2.41, 95%CI: 1.31-4.36) and drinking at least one glass of beer per day (OR=3.90, 95%CI: 1.17-11.40).

Conclusion

To our knowledge it is the first biomonitoring study of Mn impregnation in the general population in France. This study also allows speculating on the sources of Mn impregnation, related to professional activities and dietary habits.

This work was supported by the Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) and the Institut de Recherches en Environnement Industriel (IRENI) and financed by the European Community (FEDER), Nord-Pas de Calais Region and ANSES. The promoter of this study was the CHRU of Lille.

29

MARQUEURS URINAIRES TÉMOINS DE L'EXPOSITION DE LA POPULATION LIÉGEOISE À DIFFÉRENTS PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

Devalque L¹, Pirard C¹, Dubois N¹, Charlier C¹

¹Service de Toxicologie Clinique, Médico-légale, de l'Environnement et en Entreprise, Centre Hospitalier Universitaire, Liège, Belgique

Objectif

Sur base de biomarqueurs urinaires, nous avons évalué l'exposition de la population liégeoise aux polluants environnementaux possédant des propriétés de perturbateurs endocriniens, comme les phtalates, les parabènes et la benzophénone-3.

Méthodes

Des prélèvements d'urine ont été effectués chez 258 individus apparemment en bonne santé. Pour chaque prélèvement urinaire, la créatininurie a été déterminée dans les 24 heures. Après avoir subi une hydrolyse enzymatique par une bêta-glucuronidase, les urines ont été analysées par une technique d'extraction en phase solide (SPE) suivie d'une chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). La méthode utilisée a permis de mettre en évidence simultanément sept métabolites de phtalates, quatre alkyl-parabènes et la benzophénone-3. La spécificité de cette méthode est excellente: pour chaque composé étudié, après séparation sur une colonne UHPLC Kinetex Phényl-Hexyl (Phenomenex, Torrance, CA, USA), deux couples d'ions parents et d'ions produits sont recherchés par spectrométrie de masse. La recherche des transitions MRM correspondantes et l'établissement d'un rapport d'intensité entre-elles permet l'identification certaine du produit. Cette technique présente également une sensibilité satisfaisante avec des limites de quantification comprises entre 0.30 et 1.23 ng/ml et un intervalle de dosage allant jusqu'à 200 ng/ml pour la majorité des polluants recherchés.

Résultats

La fréquence de positivité des métabolites de phtalates (mono-2-éthylhexyl phtalate, mono-2-éthyl-5-hydroxyhexyl phtalate, mono-2-éthyl-5-oxohexyl phtalate, mono-n-butyl phtalate, mono-iso-butyl phtalate, monoéthyl phtalate, monobenzyl phtalate) est de plus de 95%. Les méthylparabène, éthylparabène, propyl et n-butylparabène sont retrouvés respectivement dans 100%, 95%, 69% et 34% des échantillons analysés. Enfin, la fréquence de positivité pour la benzophénone-3 est de 69%.

Conclusion

Sur base de notre échantillon de sujets apparemment sains, la fréquence de détection des polluants environnementaux à propriétés de perturbateurs endocriniens est très élevée. Pour les phtalates et pour le méthyl- et éthylparabène, elle est supérieure à 95%.

En région liégeoise, l'exposition de la population à plusieurs perturbateurs endocriniens est fortement répandue.

30

LEVELS OF DECHLORANES AND PBDES IN SERUM FROM WESTERN EUROPE POPULATION

Brasseur C, Pirard C, Scholl G, Focant J-F*

CART, Organic and Biological Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Liège, Allée du 6 août B6c, 4000 Liège, Belgium

Objective

Dechlorane or Mirex was extensively used as a pesticide but also as an additive flame retardant in the USA during the 1960s and the 1970s. After its ban, other related compounds such as Dechlorane Plus (DP), Dechlorane 602 (Dec 602), Dechlorane 603 (Dec 603), Dechlorane 604 (Dec 604) and Chlordane Plus (CP) became candidates to replace Mirex, with similar flame retardant properties. The objective of the present study is to determine levels of dechloranes as well as Mirex and PBDEs in human serum samples collected in Western Europe (a region of the world where levels have not yet been estimated) between 2003 and 2005. A strategy has been developed to separate and measure them in regular volumes of serum. We used GC-HRMS analysis with isotopic dilution. The aim was to provide an overview of the contamination pattern of these compounds in human.

Methods

All samples were processed in an ISO17025 BELAC accredited laboratory for dioxins and PCBs. The procedure for dechlorane and PBDE measurement is not accredited but ISO17025 type criteria were applied. French human serum samples (n=48) were used. Sample sizes of 10 g were extracted using solid-phase extraction (SPE) on non-encapped C18 cartridges (1 g/6mL). Samples were analyzed with a high resolution sector mass spectrometer Thermo MAT95 XL connected to a CE Trace gas chromatograph (ThermoQuest). The GC column was a Phenomenex ZB-5 (15m x 0.25 mm I.D., 0.25 µm df). Electron Ionization (EI) was performed with 70 eV. The HRMS instrument was operated in the selected ion monitoring (SIM) mode. Both instrumental and procedural blanks were monitored.

Results

Levels of DP, Dec 602, Dec 603, Dec 604, CP and Mirex of general French population were evaluated. Detection frequencies for all investigated dechloranes were high, excepted for Dec 603 that appeared to be below detection limit for all samples. Dec 603 surpassed all other dechloranes in terms of mean concentration (2.61 ± 2.63 ng/g lw). Mirex, the banned product, was measured in all samples at a mean value of 1.40 ± 0.93 ng/g lw. As expected, for PBDEs, BDE-47 and BDE-153 were the major congeners with mean levels at 2.06 ± 1.80 ng/g lw and 1.39 ± 0.97 ng/g lw, respectively. The mean Σ₇PBDE levels (4.32 ± 2.99 ng/g lw) was in the range of typical Western Europe levels but lower than the mean of Σ₂dechlorane levels (6.24 ± 4.16 ng/g lw).

Conclusion

This study is the first report on levels of dechloranes in European human serum. DP as well as others related dechloranes were detected, while no production source has been identified yet in Europe. The hypothesis of long term transport has to be considered. A specific pattern of contamination was found, and Dec 603 was reported with high levels, compared to others biota samples that have been analyzed from Europe (1). These results indicate that bioaccumulation properties should be further investigated and taken in consideration when considering human exposure to dechloranes. Moreover, the similar levels of PBDEs and dechloranes indicate that the attention currently given to PBDEs should be extended to dechloranes, at least until more toxicological data are available.

References

1. Feo ML. et al. Dechlorane Plus and related compounds in aquatic and terrestrial biota: a review. *Anal Bioanal Chem* 2012; 404: 2625-37.

31

COMPREHENSIVE CHEMICAL ANALYSES OF CONTAMINANTS BENEFIT FROM COMBINED CHEMICAL AND BIO-ANALYTICAL APPROACHES

Elskens M, Goeyens L

Department of Analytical and Environmental Chemistry, Vrije Universiteit Brussel, Belgium.

Emerging pollutants of concern (EPOC) were either recently discovered and synthesized or utilized for a very long time. They generally display previously unsuspected properties and were completely absent in authority control programmes. A recent paper on adhesives for packaging e.g. suggests that as many as 4000 different potential migrants can be transferred into the food item [Störmer & Franz 2009].

Within the large group of EPOC the endocrine disrupting chemicals (EDC) are of special concern. They can interfere with the hormone biosynthesis, metabolism or action, resulting in a deviation from normal homeostatic control or reproduction. EDC are a very heterogeneous group, including numerous industrial chemicals as well as their by products. These substances were regarded as safe at low exposures, but new evidence suggests that low levels of industrial chemicals may obstruct hormonal activity. Detectable quantities were evidenced in human tissues and body fluids, in food products, in both aquatic and solid environmental matrices, in atmospheric gases and ...

Many EPOC and, more particularly many EDC, are still conspicuously absent in regulation. At best, a law is in preparation. However, humans today are exposed to a plethora of chemicals in food whether of anthropogenic or natural origin, and public-health agencies must develop risk-assessment methods to bridge the gap between chemical exposure and biological effects using analytical techniques, both the physico-chemical and bio-analytical techniques, as a vehicle between the two [Dorne et al. 2009]. Recent pleading and arguments for this combined approach led us to consider the assessment methods and to address some pros and contras.

References

- Dorne et al. (2009). Combining analytical techniques, exposure assessment and biological effects for risk assessment of chemicals in food, *Trends in Analytical Chemistry* 28, 6, 695.
- Störmer & Franz (2009). MIGRESIVES: a research project on migration from adhesives in food-packaging materials in support of European legislation and standardization, *Food Additives and Contaminants* 26, 1581.

32

BIOMONITORING OF HUMAN EXPOSURE TO POLLUTANTS WITH HAIR ANALYSIS

Appenzeller BMR

Laboratory of Analytical Human Biomonitoring, CRP-Santé, Luxembourg

Mainly developed for the detection of drugs in forensic and clinical contexts, hair analysis is increasingly used for the biomonitoring of human exposure to organic pollutants such as food contaminants, industrial emissions or household pollutants.

Among the different factors which amounted for this growing interest has to be quoted the extended window of detection that hair enables to investigate, and which makes this matrix more adapted to the follow-up of chronic exposure than biological fluids such as urine and blood. The significant progresses observed during the last decade in analytical techniques and the associated improvement in method sensitivity, allowing for the detection of environmental levels of exposure, also clearly contributed to the rise in hair analysis.

Due to the latter technical improvements, the recent few years have also brought about the development of multi-residue methods, which enable to highlight the cumulative exposure of human to several compounds simultaneously.

Some limitations are however still associated with the use of hair analysis for the assessment of exposure. For instance, possible issues concerning contamination of hair surface by external deposition of pollutants, influence melanin on drug incorporation and characterization of the relationships between the level of exposure and the concentration of chemicals in hair have to be addressed for the optimal use of this matrix.

The significant efforts currently focused on this area of research should soon provide relevant information to fill the gap on the latter questions and strengthen the confidence in hair analysis for the biomonitoring of human exposure to pollutants.

33

QUALITÉ DE L'AIR, BIOMONITORING: STRATÉGIES POUR DÉFINIR DES VALEURS «DE RÉFÉRENCE»

Dewolf MC¹, Charlet F¹, Scheers H², Int Panis L¹, Van Den Heuvel R³¹Hygiène Publique en Hainaut/Hainaut Vigilance Sanitaire, Mons, Belgium (HPH-HVS); ²Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgique (KUL); ³Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek, Mol, Belgique (VITO).

Objectif

La santé de la population est affectée par des sources d'exposition diverses, avec probablement un cumul des expositions et effets. Divers réseaux scientifiques s'intéressent chacun à un aspect de la pollution environnementale et ses effets sur la santé. Chacun développe ses outils et sa stratégie pour protéger la population, le plus souvent sans grande concertation ou sans tenir compte des effets cumulés, y compris de faibles doses. La mise en place d'un processus de dialogue interdisciplinaire et de collaboration entre ces différents réseaux scientifiques avait pour objectif d'identifier diverses voies d'intégration. Deux voies d'intégration ont pu être mises en évidence: soit par le transfert de connaissances entre les domaines d'expertise, soit par la mise en oeuvre d'une approche globale visant l'implémentation d'outils transversaux ou intégrateurs et permettant le transfert ultime de données et d'informations. Parmi ces 2 voies, quelques thèmes prioritaires de travail ont été sélectionnés. La définition de valeurs de «références» ou valeurs auxquelles on peut se référer pour interpréter des résultats (valeurs seuil, valeurs guides ou valeurs cibles) et leur rôle ont été étudiés comme exemple pratique de transfert de connaissance.

Méthodes

Un inventaire de projets et programmes relatifs à la qualité de l'air (intérieur et extérieur), au biomonitoring, à la surveillance de la santé, à l'étude de modèles d'activité-temps

(«time activity patterns») a été réalisé. Pour ces différentes études, les méthodes d'échantillonnage et d'analyse ont été identifiées afin de mieux appréhender les possibilités d'intégration au niveau des méthodologies mises en oeuvre et des banques de données constituées. Pour interpréter les données et communiquer vers les publics concernés (patients, médecins, autorités, industrie, ...), en plus d'une bonne compréhension des méthodes analytiques mises en oeuvre, il est important de pouvoir se situer par rapport à des valeurs de «références». Ces dernières devraient permettre de protéger la population d'effets potentiels sur la santé lors d'une exposition environnementale aiguë mais surtout chronique, et ce, durant toute la durée de vie de la personne. Elles devraient permettre d'évaluer l'exposition de la population ou d'individus et de soutenir le processus de prise de décisions en termes de gestion des risques et de politiques à mettre en oeuvre. La définition de ces valeurs de références constitue dès lors une étape importante pour assurer en toute transparence l'interprétation des résultats d'une étude ou d'un programme de surveillance. Quelles sont les stratégies développées par les différents réseaux scientifiques pour les définir?

Résultats

En pratique, différentes stratégies existent au sein des divers réseaux scientifiques pour définir des valeurs de «référence» (valeurs seuil, valeurs guides ou valeurs cibles). Parmi les stratégies développées, certaines sont basées sur des données de santé, d'autres sur des calculs statistiques ou enfin, certaines sont mixtes. Elles peuvent évoluer en fonction de différents facteurs dont l'évolution de l'exposition de la population ou les connaissances scientifiques.

Définir des valeurs seuil sur base de données de santé, telles que les valeurs HBM 1 allemandes pour le biomonitoring ou l'OMS pour la qualité de l'air intérieur ou extérieur, consiste le plus souvent à traduire les résultats d'études toxicologiques effectuées sur des animaux de façon à en extraire une NOAEL (No Observable Adverse Effect Level), résultats complétés par les données d'études d'exposition, épidémiologiques et/ou toxicocinétiques.

D'autres stratégies, par exemple dans le cadre d'études de biomonitoring ou de la proposition de «Global Chemical Index» par la CRPI pour la qualité de l'air intérieur, définissent des valeurs de référence sur base de l'analyse statistique des résultats. Ces valeurs de référence sont définies pour une population donnée au moment de l'étude. Certains indicateurs prennent en considération plusieurs paramètres et intègrent à la fois les données statistiques et de santé. C'est le cas des recommandations allemandes éditées par Baubiologie Maes qui a réalisé une étude statistique approfondie mettant en relation les plaintes santé enregistrées dans plus de 1000 habitats et la qualité de l'air intérieur. C'est également le cas du calcul de l'index de qualité de l'air extérieur associant 4 polluants suivant leurs concentrations et effets respectifs sur la santé. Les directives définissent habituellement des valeurs pour des substances considérées individuellement (parfois même dans un environnement spécifique), souvent avec une variabilité étonnante. Elles prennent rarement en considération les effets potentiels résultant de l'exposition à plusieurs polluants simultanément (effet de cocktail) ni le moment de l'exposition (fenêtres d'exposition). Elles ne permettent donc pas nécessairement de protéger les plus vulnérables dans la mesure où des effets peuvent encore apparaître à des niveaux d'exposition inférieurs.

Conclusions

Une stratégie coordonnée entre les différents réseaux scientifiques pour élaborer des valeurs auxquelles se référer pour interpréter les résultats d'une étude est indispensable. Les données sources utilisées pour leur élaboration, d'une part, les objectifs poursuivis, d'autre part, doivent être clairs et transparents. Ceci afin de permettre qu'en aval, la communication, la prise de décision et la gestion de questions inévitablement interconnectées soient justes et efficaces pour assurer la protection des populations, y compris les plus vulnérables, aux effets cumulés des différentes pollutions environnementales.

34

ÉVALUATION DE L'IMPRÉGNATION MERCURIELLE CHEZ LES NOUVEAUX NÉS DANS LA RÉGION D'AZZABA (EST ALGÉRIEN)

Djafer B, Megueddem M, Messaoudene AB

Laboratoire de Toxicologie; Faculté de Médecine d'Annaba, Algérie

Objectif

Évaluer l'imprégnation mercurielle des nouveaux nés par le dosage du mercure total dans le sang des cordons ombilicaux durant la période allant du 01/09/2011 au 30/12/2011. Cette enquête a été organisée dans les services de maternité de l'Établissement Public Hospitalier d'AZZABA et de l'Établissement Hospitalier Spécialisé en Gynécologie Obstétrique de CONSTANTINE.

Méthode

Il s'agit d'une étude de type cohorte comportant 2 groupes de femmes parturientes à terme, composé chacun de 40 femmes (AZZABA versus CONSTANTINE).

Résultats

La moyenne d'âge de la population étudiée est de l'ordre de $31,6 \pm 7,6$ ans avec des extrêmes de 20 à 41 ans.

Notre étude a démontré qu'il existait une différence significative entre les taux moyens de mercure présent dans le cordon ombilical des deux groupes de parturientes.

Chez les nouveaux nés de la région d'AZZABA, la moyenne du mercure dans le sang ombilical trouvée est de $2,32 \pm 3,09$ µg/l avec des extrêmes de 0,1 à 12 µg/l. Par contre, chez les nouveaux nés de CONSTANTINE, elle est de $0,20 \pm 0,32$ avec des valeurs extrêmes comprises entre 0,01 et 0,9 µg/l.

Conclusion

La région d'AZZaba connue pour ses gisements importants de Cinabre (HgS) exploités depuis quelques décennies par le complexe de production Ismail a été à l'origine d'une forte pollution environnementale largement documentée ainsi que d'effets sur la santé des travailleurs et des populations environnantes. Bien que l'exploitation du gisement soit en arrêt depuis 2006, les déchets stockés à l'air libre continuent à contaminer l'environnement de la région d'AZZABA.

35

BLOOD LEAD, URINARY LEAD, URINARY Δ-AMINOLEVULINIC ACID AND URINARY PORPHYRINS LEVELS AMONG PEOPLE LIVING IN KINSHASA, D.R. CONGO: A PILOT BIOMONITORING STUDY

Mputu LCM¹, Ndolo JP¹, Marini RD², Rozet E², Lebrun P², Lusakibanza MM³, Dubois N⁴, Charlier C⁴

¹Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène Alimentaire, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université de Kinshasa (Unikin), R.D Congo; ²University of Liege (ULg), Department of Pharmacy, CIRM, Laboratory of Analytical Chemistry, Liège, Belgium; ³Laboratoire de Pharmacologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Unikin; ⁴Clinical, Forensic, Environmental and Industrial Toxicology Service/CH-ULg, Liège, Belgium.

Objectives

Existing naturally in the earth's crust, Lead is a widely used heavy metal. It is an environment toxicant that may deleteriously affect nervous, hematopoietic, skeletal, renal, endocrine and reproductive systems. Lead is classified in its inorganic form as possible human carcinogen (group 2A) by IARC [1,2]. Exposure to lead in the environment continues to be a serious public health problem for all ages. Children are particularly susceptible to lead poisoning. They absorb more lead from their environment and their developing central nervous systems are vulnerable to the toxicant. During the last twenty years, important measures of public health were undertaken in several countries to decrease lead exposure. In the best of our knowledge, this is not the case in D.R. Congo. A study indicated a relatively important lead impregnation of the Kinshasa population (mean 120 µg/L) (3). However, there have been no reported studies in the evaluation of the relationship between urinary lead, urinary δ-aminolevulinic acid (δ-AlaU) and urinary porphyrins and lead blood level in Congolese people. This is the aim of this study targeting at first people living in Kinshasa.

Methods

Blood lead and urinary lead levels were measured using inductively coupled plasma mass spectrometry. The Bio-Rad ALA/PBG by Column Test and spectrophotometer method were used to quantify the concentration of δ-Ala in urine. The separation of porphyrins was carried out by HPLC coupled with fluorescence detector.

Results

37% of studied population presented blood lead levels above the 100 µg/L threshold (geometric mean: 133.29 µg/L) with a higher concentration in women than in men (140.30 µg/L vs 130.78 µg/L). 50% of children (0-17 years) presented blood lead levels above the 100 µg/L threshold and 43% of the same population presented blood lead levels above 50 µg/L as accepted nowadays in US. In the adult population, some targeted occupations were found to be associated with high blood lead. A small correlation was observed between urinary lead and blood lead, but no correlation was noticed between δ-AlaU and Porphyrins with lead blood levels.

Conclusion

This study confirmed a relatively important Pb impregnation of the Kinshasa population and the existence of a major public health issue requiring corrective actions and the implementation of an appropriate regulation. Also, urinary lead, urinary δ-Ala and urinary porphyrins seems to not be sensitive markers for monitoring exposure to lead (4).

Références

- Soldin OP, et al., Blood lead concentrations in children: new ranges. *Clin Chim Acta* 2003; 109-113.
- WHO, 2007. Health risks of heavy metals from long-range transboundary air pollution. World Health Organization, Denmark.
- Tuakuila KJ, et al., Blood lead in the Kinshasa population. *Arch Public Health* 2010; 68, 30-41.
- Lauwerys R, et al., 2007. *Toxicologie et intoxications professionnelles*, Elsevier Masson, 5^e édition, 388-410.

Our thanks to EU-ACP for financial support through the Edulink DEV-AQM project.

36

IMPLÉMENTATION DU CONCEPT DE «THRESHOLD OF TOXICOLOGICAL CONCERN» (TTC) AU NIVEAU DES LISTES DE SUBSTANCES UTILISÉES DANS LES MATÉRIELLES ET OBJETS EN CONTACT AVEC LES DENRÉES ALIMENTAIRES

N'Goy K¹, Troisfontaines P², Van Hoec E¹, Bolle F¹

Services des Risques Chimiques Emergents¹ et de Toxicologie², Institut scientifique de santé publique, Bruxelles, Belgique

Objectif

Le nombre de substances non-évaluées d'un point de vue toxicologique représente la majorité des substances utilisées dans les emballages des aliments et des médicaments. Sachant qu'il est impossible de réaliser des tests toxicologiques sur l'ensemble de ces substances, il est proposé d'appliquer le concept de «Threshold of Toxicological Concern» (TTC) récemment évalué par l'Efsa. Ce projet a pour but d'établir la liste des substances et d'évaluer les possibilités d'application de ce concept soutenu par des avis de l'Efsa. La finalité de ce projet est de proposer un seuil à partir duquel une évaluation serait à exiger par les autorités compétentes en cas de détection de substances lors d'éventuels contrôles.

Méthodes

Il s'agit de mettre au point une base de données reprenant les informations relatives aux substances évaluées et non évaluées utilisées dans les matériaux et objets en contact avec les denrées alimentaires. A partir de cette base de données, nous effectuons une première évaluation des possibilités et limites d'application du concept de TTC en se basant sur les logiciels (Q)SAR, bases de données existantes et autres informations disponibles (REACH, ...) pour déterminer les propriétés toxicologiques des substances et ainsi déterminer le seuil toxicologique ne pouvant être dépassé. Ensuite nous évaluons la correspondance entre les résultats obtenus par ce travail et les textes européens et nationaux en application et fixant des limites (valeurs de référence: ADI, TDI, ...) pour les substances déjà évaluées.

Résultats

Dans une première étude, nous avons comparé les restrictions Européenne pour les matières plastiques aux valeurs établies avec l'approche TTC, lorsqu'il peut être appliqué. Par la suite, ce concept novateur a été appliqué de la même façon pour les migrants plastique non-évalués, en utilisant en addition un support logiciel prédictif (QSAR). Pour les substances «plastiques» évaluées il a été établi que dans plus de 95% des cas, l'utilisation du concept TTC constitue un support efficace pour étayer les opinions de leurs effets toxiques sur la santé humaine. L'approche TTC est la plupart du temps plus sévère que les évaluations préexistantes, ce qui permet une marge de sécurité lorsque l'on compare le résultat à la limite de migration spécifique (SML) décrit dans le règlement (UE) n° 10/2011.

Conclusions

Par conséquent on peut sans doute supposer que dans la plupart des cas, lorsque l'application du modèle TTC est possible, les valeurs établies avec l'approche TTC pour les substances non évaluées seront suffisamment conservatrice pour alimenter les opinions toxicologiques.

Référence

Efsa Scientific Committee; Scientific Opinion on Exploring options for providing advice about possible human health risks based on the concept of Threshold of Toxicological Concern (TTC). *Efsa Journal* 2012; 10(7): 2750.

37

THE SETUP OF A BIOMONITORING SURVEY OF THE RESIDENTS AND THE RESCUE WORKERS FOR ACRYLONITRILE AFTER THE TRAIN DISASTER IN WETTEREN (BELGIUM)

Van Loco J¹, De Cremer K¹, Fierens S², Van Overmeire I¹, van Hoegaerden M³, Van Nieuwenhuysse A², Van Oyen H²

¹ Food, Medicines and Consumer Safety, Scientific Institute of Public Health, Brussels; ² Public Health & Surveillance, Scientific Institute of Public Health, Brussels; ³ DG2 Health care & crisis management, FPS Health, Food chain safety and Environment, Brussels, Belgique

Objectives

On Mai 4, 2013, in the East Flanders village Wetteren, a train transporting chemicals derailed. Wagons with the toxic acrylonitrile (ACN, CAS no. 107-13-1) explodes. ACN is a colourless, liquid chemical with an onion- or garlic-like odour. ACN is used in polymer synthesis to make plastics, synthetic rubber, and acrylic fibers. CAN has been classified as possibly carcinogenic to humans (Group 2B) (1). During the disaster ACN was dissolved with water used to fight the fire and flowed into the sewers. The population and rescue workers were exposed via toxic fumes of ACN coming out of the sewers or from the fire. One person died, almost hundred persons were hospitalised and +/- 2000 residents were evacuated. To assess the exposure of the local population and the rescue workers a biomonitoring study was demanded by the FPS Health, Food chain safety and Environment.

Methods

A design for a Biomonitoring study was setup in a short period based on the decision scheme as proposed by Scheepers et al. (2). Taking in to account the toxicokinetic parameters, such as the biological half-life of the biomarker and the pattern of excretion, toxicity mechanism-based criteria and the availability of an adequate analytical method, the monitoring of the acrylonitrile exposure will be assessed by analysing the N-2-Cyanoethylvaline (CEV) in haemoglobin (3). Since smoking is a confounder, cotinine and 3-OH cotinine analysis in urine will be performed. A short questionnaire was used to gain information about the health effects and spatial and time information of the persons related to the train disaster. Of the selected study population in total 243 of the residents and 1055 rescue workers provided samples.

Results

At this moment, only the results for the residents are available. The median extrapolated CEV concentration was 6.8 pmol/g globin (interquartile range IQR 3.4-15.8) for the non-smokers and 190.6 pmol/g globin (IQR 152.2-264.0) for the smokers.

Conclusions

88 out of 243 residents showed an extrapolated CEV concentration above 10 pmol/g globin for the non-smokers and 200 pmol/g globin for the smokers. These residents were invited for follow-up sampling.

References

- IARC Monographs Vol 71, 43-108.
- Scheepers PT, Bos PM, Konings J, Janssen NA, Grievink L. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2011; 21: 247-261.
- Bader M, Wrbitzky R. *Toxicol Lett* 2006; 10: 125-131.

38

DEVELOPMENT OF A TOXICOKINETIC MODEL IN RAT OF THE CIS AND TRANS-PERMETHRIN AND THEIRS THREE METABOLITES

Willémin M-E^{1,2}, Desmots S³, Le Grand R⁴, Zeman F¹, Lestremau F⁵, Moesch C⁴, Brochet C¹

¹Unit of Models for the Ecotoxicology and the Toxicology (METO), National Institute of the Industrial Environment and Risks (INERIS), Verneuil en Halatte, France; ²Department of Biomechanics and Bioengineering CNRS UMR 7338, University of Technology of Compiègne, Compiègne, France; ³Unit of Experimental Toxicology (TOXI), INERIS, Verneuil en Halatte, France; ⁴CHU of Limoges, Department of Pharmacology and Toxicology – Pharmacovigilance, Limoges, France; ⁵Unit Innovation for Measure (NOVA), INERIS, Verneuil en Halatte, France

Objectives

Recent biomonitoring studies reported that the French population is significantly exposed to pyrethroid insecticides. The levels of their urinary metabolites exceed the ones observed in other countries, like Germany, Canada or United States (1). Such biomonitoring data may be interpreted using toxicokinetic models in order to better understand and quantify the environmental exposure and to predict the internal exposure in the target tissues (i.e., where the toxic action arises). We propose to develop a physiologically based pharmacokinetic (PBPK) models for permethrin, one of the most frequently used pyrethroids, and two urinary metabolites measured in biomonitoring studies (*cis* or *trans* 3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid (*cis* or *trans*-DCCA) and the 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA)). In this work, the PBPK models are developed in rats.

Methods

In vivo experiments were performed in rats dosed orally with 25 mg/kg of *cis* or *trans*-permethrin, the two isomers of permethrin. Permethrin was measured in blood and tissues (but not fat) at 8 time points between 30 minutes and 24 hours after the administration. The concentrations in fat were monitored until 6 days. Urines and feces were collected for 6 days. Metabolites were measured in blood, liver, urine and feces. PBPK models were developed for *cis* or *trans*-permethrin to describe the oral absorption, the disposition in organs (fat, muscle, kidney, testes and brain) and the elimination by metabolism (in liver and blood) and excretion (feces and urine). The kinetics of metabolites were represented by a minimal PBPK model linked to the permethrin one at sites of metabolism. The models were calibrated using the *in vivo* data in a Bayesian framework.

Results

The model adjustments are in good agreement with the observed kinetics in rats. Permethrin is rapidly absorbed (about 70% of the dose) and eliminated in blood and tissues with a half-life of 4-5 hours (8 hours for testes), except in fat where permethrin accumulates until 6 days. The urinary excretion of 3-PBA is completed 24 hours after the administration of *cis*-permethrin. The Area Under the Curve (AUC) of DCCA from 0 to 48 hours is twice to six times higher than the AUC of 3-PBA.

Conclusion

Separate PBPK models for *cis* and *trans*-permethrin and two urinary metabolites were developed in rats in order to link the external dose to the metabolite concentrations in urine and to simulate the internal dose in target tissues, such as brain. These models will be extrapolated to humans by using adequate parameters values for humans obtained from *in vitro* experiments in order to be used in the framework of biomonitoring studies.

Reference

1. Fréry N. Exposition de la population française aux substances chimiques de l'environnement. Tome 2 - Polychlorobiphényles (PCB-NDL) et pesticides. *INVS* 2013; 178.

MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE DOSAGE DE DEUX PARAOXONS ET DE LEUR MÉTABOLITE COMMUN LE PARANITROPHÉNOL – APPLICATION À LA MODÉLISATION DE LEUR CINÉTIQUE CHEZ LE RAT

Salle S¹, Cottin F¹, Chevillard L², Falchi C¹, Houze P^{3,4}, Roussel O^{1,2}

¹IRCGN, Rosny/Bois, France; ²INSERM U705, Paris, France; ³Hôpital Saint-Louis, Paris, France; ⁴Laboratoire C-TAC E4463, Paris, France

Objectif

Les organophosphorés posent un problème majeur de santé publique du fait de leur toxicité et de leur large utilisation comme pesticides, voire pour les plus toxiques d'entre eux comme arme chimique de guerre. Un modèle animal d'intoxication après administration de diéthylparafoxon (DEPOX) par voie sous-cutanée à dose modérée chez le rat mâle Sprague-Dawley a ainsi été développé pour étudier la toxicité de ce produit. En vue d'établir une relation toxicocinétique/ toxicodynamique (TK/TD), les cinétiques du DEPOX, de son analogue diméthyle, le diméthylparafoxon (DMPOX) et de leur métabolite commun le paranitrophénol (pNP) doivent être définies. Leur dosage repose sur une méthode de chromatographie liquide haute performance associant en tandem un quadrupôle et un temps de vol (CLHP-QTOF).

Méthodes

Les paramètres analytiques sont les suivants: colonne ZORBAX Eclipse plus C18, 2,1 × 100 mm, 1,8 µm – élution par un gradient acétonitrile/tampon formiate 5 mM à 0,1% d'acide formique à 50°C à 0,4 mL.min⁻¹ – source d'ionisation ESI (Dual Jet Stream d'Agilent®) – mode positif réglage à 8220 transients – mode négatif réglage à 10312 transients. La préparation de l'échantillon (100 µL de sang total) repose, après stabilisation par de l'EDTA qsp 10 g.L⁻¹ et tampon phosphate 0,1 M à pH 4,5, sur sa déprotéinisation par l'acétonitrile suivi d'une concentration par évaporation. Le résidu sec est repris par 25 µL du tampon formiate de la phase mobile et 5 µL sont injectés. Les substances sont identifiées à partir de leur temps de rétention et de leur masse exacte mesurée à 40 ppm près. Elles sont dosées après un étalonnage interne par le pNP-D4 à 10 ng.mL⁻¹.

Résultats

La méthode a été validée par la détermination du profil d'exactitude à l'aide du logiciel e-nova V3.0 (arlenda®). Le plan de validation a consisté en l'analyse répétée 2 à 4 fois de sang surchargé à l'une des 4 concentrations choisies (0,25, 4, 15 et 45 ng.mL⁻¹) selon 4 séries distinctes; chaque série possédant sa gamme de dosage respective s'étendant de 0,1 à 50 ng.mL⁻¹. Pour chacune des substances étudiées, le domaine d'exactitude de la méthode s'étend de 0,25 à 50 ng.mL⁻¹ avec une limite de détection de 0,08 ng.mL⁻¹ et l'erreur totale est inférieure à 50% pour un risque fixé *a priori* à 10%. Les incertitudes de mesure maximales sont de 41,51% pour le DEPOX, 40,28% pour le DMPOX et 28,92% pour le pNP. Les incertitudes de mesure calculées englobent l'erreur du biais et l'erreur de fidélité. Le CV peut être estimé en divisant par 2 des valeurs obtenues. Il avoisine ainsi les 20% ce qui, compte tenu des concentrations faibles, de la prise d'essai restreinte et du traitement de l'échantillon choisi, a été considéré comme acceptable.

Les performances de cette méthode sont illustrées par les profils cinétiques obtenus (administration intraveineuse d'une dose de 180 µg.kg⁻¹ de DEPOX à un groupe de 6 rats et de 230 µg.kg⁻¹ de DMPOX à un second groupe de 6 rats). Modélisées par un modèle bicompartmentale, elles ont confirmées la diffusion importante de ces toxiques (Volume de distribution de 9,9 L.(kg.min)⁻¹ pour le DEPOX et 4,55 pour le DMPOX (CV < 20%) et leur élimination rapide (2,39 minutes pour le DEPOX et 2,1 minutes pour le DMPOX (CV < 12,4%).

Conclusion

La méthode développée répond à nos contraintes expérimentales puisque qu'elle présente l'avantage d'un traitement d'échantillon simple, d'une sensibilité satisfaisante au regard du faible volume d'échantillon disponible ainsi que la possibilité d'analyser en une seule préparation et une seule injection, deux des formes du parafoxon POX et leur métabolite commun le pNP.