



HAL
open science

Traitement des intoxications. Étude de deux approches : un système d'épuration extra-rénale de type MARS et un antidote de type Fab anti-colchicine

Nicolas Fabresse

► **To cite this version:**

Nicolas Fabresse. Traitement des intoxications. Étude de deux approches : un système d'épuration extra-rénale de type MARS et un antidote de type Fab anti-colchicine. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLV082 . tel-02529865

HAL Id: tel-02529865

<https://theses.hal.science/tel-02529865>

Submitted on 2 Apr 2020

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

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

Traitement des intoxications. Etude de deux approches : un système d'épuration extra-rénale de type MARS et un antidote de type Fab anti-colchicine.

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

École doctorale n°577 Structure et dynamique
des systèmes vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Paris de soutenance, le 19 décembre 2019, par

Nicolas FABRESSE

Composition du Jury :

Ziad MASSY Professeur, Université de Paris Saclay (INSERM U-1018)	Président
Anne-Laure PÉLISSIER Professeur, Université Aix-Marseille (INSERM INMED)	Rapporteur
Pascal KINTZ Professeur, Université de Strasbourg (Institut de Médecine Légale)	Rapporteur
Pascal HOUZÉ Professeur, Université de Paris Descartes (INSERM U-1022)	Examineur
Jean-Claude ALVAREZ Professeur, Université de Paris Saclay (INSERM U-1173)	Directeur de thèse

**Traitement des intoxications. Étude de deux approches : un système d'épuration
extra-rénale de type MARS et un antidote de type Fab anti-colchicine.**

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

École doctorale n°577 Structure et dynamique
des systèmes vivants (SDSV)

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Paris de soutenance, le 19 décembre 2019, par

Nicolas FABRESSE

Composition du Jury :

Professeur Ziad MASSY	Président
Professeur Anne-Laure PÉLISSIER	Rapporteur
Professeur Pascal KINTZ	Rapporteur
Professeur Jean-Claude ALVAREZ	Directeur de thèse
Professeur Pascal HOUZÉ	Examineur

REMERCIEMENTS,

A Monsieur le Professeur Ziad Massy,

Malgré vos multiples occupations vous avez pris le temps d'évaluer ce travail, et de vous éloigner de la néphrologie le temps d'une soutenance. Nous tenons à vous remercier de l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail et de présider ce jury.

A Monsieur le Professeur Jean-Claude Alvarez,

Pour votre enseignement durant ces quatre années (+ 6 mois) passées au sein de votre laboratoire, pour votre soutien et votre accompagnement tout au long de ce travail de thèse. Bien au-delà de la transmission de connaissance de cette discipline pour laquelle nous partageons un intérêt, vous nous enseignez à tous une façon d'être et de penser qui nous permet de nous rapprocher un peu plus d'un célèbre académicien Garchois. Je tiens ici à vous témoigner ma reconnaissance, et vous remercier de m'avoir accordé votre confiance durant ces années, j'ai été fier de travailler à vos côtés. J'espère que nous continuerons à travailler ensemble encore longtemps et pas seulement à travers la SFTA et le TIAFT.

A Monsieur le Professeur Pascal Kintz,

Pascal, ton expertise est précieuse aux yeux de tous les toxicologues, merci d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et d'avoir pris le temps d'évaluer ce travail.

A Madame le Professeur Anne-Laure Pélissier,

Anne-Laure, merci d'avoir accepté et su trouver le temps d'évaluer ce travail. J'espère que nous pourrions rapidement travailler ensemble.

A Monsieur le Professeur Pascal Houzé,

Merci pour votre accompagnement et vos conseils pertinents apportés lors des différents comités de thèse qui ont permis d'améliorer la qualité de ce travail.

A Madame Isabelle Etting,

Isabelle, tout au long de ces années passées au laboratoire tu as su mettre tes connaissances et tes compétences à profit pour développer l'activité clinique, médico-légale, la recherche mais également les projets des étudiants du laboratoire. Ton immense rôle dans le développement du laboratoire est clair aux yeux de tous. J'ai bénéficié de ton aide, de tes conseils et de ton enseignement à de nombreuses reprises, à travers ce travail de thèse mais pas seulement. Je tiens ici à te remercier pour ton investissement, ta disponibilité, ta patience et ton expertise.

A Messieurs le Professeur Mickael Eddleston et le Docteur Adrian Thompson,

Merci pour votre accueil chaleureux en Ecosse, pour vos enseignements en expérimentation animale et en toxicologie clinique. Votre contribution à ce travail de thèse et à l'étude préclinique du colchibind est majeure, je suis fier d'avoir pu collaborer avec vous et vos équipes.

A Monsieur le Professeur Bruno Mégarbane,

Nous avons rencontré des difficultés dans la réalisation de ce travail sur l'étude du système MARS suite à une collaboration arrêtée du jour au lendemain. Vous nous avez proposé d'obtenir des kits de dialyse auprès de votre hôpital et de venir faire les manipulations dans votre service, ce malgré votre emploi du temps très chargé à travers vos responsabilités hospitalières et universitaires. Sans votre intervention ce travail n'aurait pas pu aboutir. Pour ces différentes raisons je tiens à vous remercier et à vous témoigner ma reconnaissance.

A Madame le Docteur Magali Labadie, Monsieur le Docteur Dominique Vodovar et à l'ensemble des centres anti-poisons français,

Il n'existe pas de données récentes sur les intoxications à la colchicine en France, grâce à votre travail nous avons pu établir des données épidémiologiques précises qui viennent étoffer ce travail de thèse et appuyer l'intérêt de développer une étude clinique rapidement. Je vous remercie pour votre investissement dans ce projet.

A Mesdames les Docteurs Paméla Duguès et Marie Martin,

Nous partagions un bureau et une affection particulière pour ces petits pains allongés et secs agrémentés de graines de sésame. Merci pour votre enthousiasme, votre bonne humeur quotidienne, ce fut un plaisir de travailler avec vous, surtout ne changez pas.

A Madame le Docteur Emuri Abe,

Maître Glims et référente en analyse de matrice non biologique, malgré mon domaine d'expertise très étroit portant sur les inhibiteurs de phosphodiesterase 5 et le *Tribulus terrestris*, j'ai été heureux de collaborer avec toi durant ces années. Merci pour ta disponibilité, ta bonne humeur et ton humour.

A Monsieur le Docteur Amine Larabi,

Nous ne nous sommes presque pas quittés depuis notre année commune de master 2, en 2014. Comme un grand frère tu m'expliquais le fonctionnement des spectromètres de masse auxquels je ne comprenais pas grand-chose. Tu m'as accompagné durant ces années, toujours avec bienveillance et sympathie. Travailler avec toi a été un réel plaisir, tu as toujours été disponible et enclin à donner des conseils. J'espère que nous continuerons à collaborer pendant longtemps.

A Madame le Docteur Adeline Knapp et Madame Charlotte Mayer,

L'équipe des expertes médico-judiciaires, merci pour votre sympathie et votre disponibilité, c'était toujours avec grand plaisir que nous vous accueillions dans la salle des ados ;) Merci Adeline pour cette délicieuse recette de cookies au chocolat blanc et au thé matcha.

A Madame le Docteur Fanta Fall et Madame Elodie Lamy,

Vous êtes les piliers de l'équipe MasSpecLab, nous passerons les épisodes de tchip, de wolof et les objets insolites offerts pour les anniversaires dont un a fini par atterrir à Garches. Merci Fanta pour ton aide sur les méthodes d'analyse de protéines, les approches métabolomiques et la

préparation du mafé. Merci Elodie de m'avoir aidé à finir les pots de bonbons, si j'arrive à atteindre l'âge de 50 ans sans être diabétique c'est grâce à toi.

A l'ensemble du laboratoire de toxicologie de Garches,

Merci à tous pour votre bonne humeur et votre sympathie, ce fut un plaisir de travailler avec vous (sauf Madame Beaufiles depuis l'histoire des choux). Vous êtes une équipe formidable, ayez en bien conscience pour continuer à avancer car Jean-Claude a commencé à démarcher des asiatiques pour récupérer le marché chinois de la toxicologie en 2021.

A Monsieur le Docteur Jean-Hubert Bourdon,

Nous ne vous oublions pas, je tiens ici à vous renouveler ma reconnaissance pour votre accompagnement et votre enseignement. De la part d'un « toxicologue en culotte courte ».

A mes Parents,

A mes Grands-Parents,

A Guillaume, Thomas et Marine,

A Charles,

A Anne-Claire,

INTRODUCTION.....	4
PREMIÈRE PARTIE : DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES.....	6
1. EPIDEMIOLOGIE DES INTOXICATIONS	7
A. PAYS DEVELOPPES	7
<i>i. France.....</i>	<i>7</i>
1. <i>Etude des cas d'exposition enregistrés par les centres antipoison français en 2013 (9).....</i>	<i>7</i>
2. <i>Observatoire multi-sources des intoxications aiguës en Ile de France (10).....</i>	<i>9</i>
<i>ii. Suisse (11).....</i>	<i>10</i>
<i>iii. Belgique (12).....</i>	<i>10</i>
<i>iv. Suède.....</i>	<i>10</i>
<i>v. Etats-Unis</i>	<i>10</i>
<i>vi. Australie (15).....</i>	<i>12</i>
B. PAYS EN VOIE DE DEVELOPPEMENT	12
<i>i. Chine.....</i>	<i>12</i>
<i>ii. Inde</i>	<i>13</i>
<i>iii. Iran</i>	<i>14</i>
2. PRISE EN CHARGE DES INTOXICATIONS	14
A. TRAITEMENT SYMPTOMATIQUE (22)	14
B. TRAITEMENT EVACUATEUR	16
C. TRAITEMENTS EPURATEURS	17
<i>i. Diurèse alcaline.....</i>	<i>17</i>
<i>ii. Epuration extracorporelle</i>	<i>17</i>
1. <i>Hémodialyse</i>	<i>17</i>
2. <i>Hémofiltration</i>	<i>18</i>
3. <i>Hémoperfusion</i>	<i>18</i>
4. <i>MARS.....</i>	<i>19</i>
D. TRAITEMENT SPECIFIQUE (ANTIDOTES)	20
<i>i. Antidotes d'action toxicocinétique.....</i>	<i>20</i>
1. <i>Redistribution extracellulaire du toxique dans l'organisme.....</i>	<i>20</i>
a. <i>EDTA dicobaltique.....</i>	<i>20</i>

b.	Iodure de potassium.....	21
c.	Immunothérapies	21
d.	Sugammadex (Bridion®).....	23
e.	Chélateurs	23
f.	Protamine.....	24
2.	<i>Ralentissement d'un métabolisme activateur</i>	25
a.	Ethanol.....	25
b.	Fomépipzole	25
3.	<i>Accélération d'un métabolisme inactivateur</i>	26
a.	N-acétylcystéine	26
b.	Carboxypeptidase-G2 (Voraxaze®).....	26
4.	<i>Restauration de la fonctionnalité enzymatique</i>	27
a.	Pralidoxime.....	27
5.	<i>Restauration de la fonctionnalité d'une protéine</i>	27
a.	Méthylthioninium (bleu de méthylène).....	27
ii.	<i>Antidotes d'action toxicodynamique</i>	28
1.	<i>Antidotes déplaçant le toxique de sa cible</i>	29
a.	Flumazénil	29
b.	Naloxone.....	29
2.	<i>Antidotes shuntant la liaison toxique-récepteur</i>	30
a.	Glucagon (β -bloquants)	30
b.	Insuline euglycémique (antagonistes calciques et β -bloquants).....	31
3.	<i>Antidotes corrigeant les effets du toxique</i>	31
a.	Solutés salés hypertoniques (lactate de sodium et bicarbonate de sodium) et toxiques à effet stabilisant de membrane.....	31
3.	PLACE DES ANALYSES TOXICOLOGIQUES	32
A.	CONFIRMATION D'UNE INTOXICATION	32
B.	EXCLUSION D'UNE HYPOTHESE TOXIQUE.....	33
C.	EVALUATION DE LA GRAVITE D'UNE INTOXICATION	33
D.	SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION D'UNE INTOXICATION	33
4.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES POUR LA THESE.....	34
	DEUXIÈME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS.....	36

PREMIERE PARTIE : ETUDE PRE-CLINIQUE D'UN ANTIDOTE DE TYPE FAB ANTI-	
COLCHICINE	37
HISTORIQUE ET RATIONNEL DE L'ÉTUDE	38
PUBLICATION N°1.....	41
PUBLICATION N°2.....	49
DISCUSSION.....	59
DEUXIEME PARTIE : ETUDE DE L'EFFICACITE DU SYSTEME DE DIALYSE HEPATIQUE DE	
TYPE MARS DANS L'EPURATION DU VERAPAMIL ET DU DILTIAZEM A TRAVERS UN	
MODELE IN VITRO.	64
CONTEXTE ET RATIONNEL DE L'ÉTUDE	65
PUBLICATION N°3.....	67
PUBLICATION N°4.....	90
DISCUSSION.....	111
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	114
BIBLIOGRAPHIE	115

INTRODUCTION

L'intoxication est définie comme la survenue de tout effet toxique pour l'homme faisant suite à une exposition unique ou répétée à un mélange ou une substance naturelle ou de synthèse, disponible sur le marché ou présent dans l'environnement (1). Celui-ci peut survenir dans un délai plus ou moins important selon le type de toxique, le niveau et la voie d'exposition (toxicité aiguë et chronique).

En 2013, l'OMS estimait que 300 000 personnes mouraient chaque année des suites d'une d'intoxication (2). La majorité de ces décès surviennent dans les pays à revenus faibles et intermédiaires et sont liés à des intoxications volontaires aux pesticides (3,4). Dans les pays développés les médicaments constituent la principale cause de décès par intoxication bien que les intoxications aux pesticides aient également lieu.

Afin de limiter le nombre d'intoxications fatales, plusieurs approches peuvent être mises en place. Une méthode efficace pour lutter en amont contre les intoxications volontaires ou accidentelles est la « réduction des moyens », diminuant l'accès aux substances toxiques ou en modifiant les conditionnements de façon à diminuer le risque en cas d'exposition (5). La formation des médecins et la diminution de l'accès aux produits toxiques semblent être les outils préventifs les plus efficaces (5). En France cela a conduit au retrait de nombreux pesticides dont la toxicité était avérée, notamment le paraquat, ainsi que les organophosphorés et les carbamates les plus nocifs. Pour les médicaments cela a conduit au retrait de nombreuses molécules et à la réévaluation régulière (tous les 5 ans) du service médical rendu (SMR) par la commission de transparence. Cela est à l'origine de la modification du conditionnement de certaines molécules (les spécialités contenant du paracétamol sont limitées à 8 grammes par boîte), de la composition des médicaments (buprénorphine associée à la naloxone dans la spécialité Suboxone® permettant de bloquer les effets de la buprénorphine si celle-ci est injectée, limitant le risque de surdosage). Ces mesures ont parfois été prises de façon inadaptée comme c'est le cas pour le dextropropoxyphène. Au Royaume-Unis entre 1997 et 1999, 20% des suicides étaient par intoxications et 20% d'entre eux impliquaient le co-proxamol® (dextropropoxyphène associé au paracétamol). Afin de limiter les intoxications volontaires, et améliorer d'une façon générale le profil de sécurité de la molécule, celui-ci était retiré du marché au Royaume-Unis le 31 janvier 2005 (6). En 2011, lors de la réévaluation du dextropropoxyphène par l'agence européenne du médicament celui-ci a été retiré du marché. En France le conditionnement des

boîtes était de 8 g de paracétamol et 600 mg de dextropropoxyphène, et celui-ci ne constituait pas a priori un problème de santé publique.

Ces évolutions ont été associées à la mise sur le marché de nouvelles molécules notamment des psychotropes, impliqués dans la majorité des intoxications. Les barbituriques qui étaient utilisés comme anxiolytiques et hypnotiques, présentent une marge thérapeutique étroite et étaient responsables de nombreux décès. Ceux-ci ont progressivement été remplacés par les benzodiazépines présentant un meilleur profil de tolérance. Les décès par intoxications aux barbituriques en France sont passés de 31% en 1980 à 4% en 1994-1995 (7). De même les antidépresseurs tricycliques, première famille d'antidépresseurs commercialisée, présentent des propriétés stabilisants de membranes, et cardiotoxiques à forte dose. Ceux-ci étaient responsables de nombreux décès par intoxication médicamenteuse volontaire. L'arrivée des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (spécifiques et non spécifiques), mieux tolérés avec une marge thérapeutique plus large a permis de diminuer considérablement les cas de décès par intoxications aux antidépresseurs (8).

Parallèlement, l'amélioration des connaissances toxicocinétiques et toxicodynamiques des molécules en cause a permis de comprendre les mécanismes et la variabilité des réponses. Cela a amélioré la prise en charge des patients. L'utilisation d'émétiques, le lavage gastrique et la diurèse forcée ont disparu au profit d'approches plus rationnelles et spécifiques, notamment l'utilisation d'antidotes. Des systèmes d'assistance permettent désormais de substituer des organes vitaux tels que les poumons ou le cœur de façon transitoire, le temps pour l'organisme d'éliminer le ou les toxiques.

Ces dernières décennies le profil des intoxications a évolué, autant sur le plan épidémiologique que thérapeutique. Ce travail de thèse a pour objectif dans une première partie de faire une synthèse sur l'état des connaissances épidémiologiques et sur les traitements des intoxications. Et dans une deuxième partie d'évaluer deux approches permettant la prise en charge de patients intoxiqués : un antidote de type Fab dans les intoxications à la colchicine et un système de dialyse à l'albumine permettant l'épuration des molécules fortement liées aux protéines plasmatiques.

**PREMIÈRE PARTIE : DONNÉES
BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Epidémiologie des intoxications

a. Pays développés

i. France

Malgré l'existence d'une base de données informatisée et incrémentée par les centres anti-poisons français (SICAP), il existe peu de données épidémiologiques récentes sur les intoxications en France.

1. Etude des cas d'exposition enregistrés par les centres antipoison français en 2013 (9)

Une étude rétrospective descriptive des cas d'exposition avec ou sans symptôme a été réalisée à partir de la base de donnée des centres antipoison français SICAP. Les données allant du 1^{er} janvier 2013 au 31 décembre 2013 ont été rassemblées. Au total 168 475 cas d'exposition ont été répertoriés dont 73 889 (43,9%) étaient symptomatiques. Le nombre de cas mensuel était relativement constant au fil de l'année. Les taux d'incidence les plus élevés étaient en Corse (39,2/100 000), en Midi-Pyrénées (34,0/100 000) et en Languedoc-Roussillon (30,3/100 000). L'âge médian de la population était de 7 ans. La classe d'âge de 0-4 ans représentait 43,7% des cas (n=73 702), suivie des 20-39 ans et 40-59 ans. Le sex ratio était équilibré (H/F = 0,96). La majorité des intoxications était involontaires (87,1%), 12,2% étaient volontaires et 0,7% de circonstances non renseignées. Les voies d'exposition principales étaient la voie orale (93,8%), la voie respiratoire (10,7%) et la voie cutanée (8,1%). Concernant les classes d'agent associés aux expositions, la première classe correspondait aux spécialités pharmaceutiques (37,6%), suivie des produits domestiques (27,2%), des substances chimiques (6,6%), des produits cosmétiques (5,1%), des produits alimentaires (4,5%) et des plantes (4,5%). Parmi les cas d'exposition aux médicaments, les antalgiques non opioïdes étaient prépondérants (12,6% des cas, 95,7% de paracétamol). Les médicaments dermatologiques (10,0%), des voies digestives et du métabolisme (9,5%), les benzodiazépines (9,1%), les anti-inflammatoires non stéroïdiens (7,6%), et les anti-infectieux à usage systémique (5,5%) étaient les plus impliqués. Parmi l'ensemble des intoxications rapportées, 407 cas de décès ont été recensés 178 femmes et 230 hommes. Cent quatre étaient accidentelles et 246 volontaires. Les médicaments impliqués dans les cas de décès sont présentés dans le tableau 1.

Médicaments humains	n=136	75,6%
Benzodiazépines	31	22,8%
Antidépresseurs (dont ISRS : 8)	18	13,2%
Antiépileptiques (gabapentine, valproate de sodium, etc...)	13	9,6%
Opioides	13	9,6%
Inhibiteurs calciques	9	6,6%
Antidiabétiques	5	3,7%
Paracétamol	5	3,7%
Antiviraux	4	2,9%
β-bloquants	4	2,9%
Colchicine	4	2,9%
Inhibiteurs de l'enzyme de conversion	4	2,9%
Inhibiteurs de l'angiotensine II	4	2,9%
Phénothiazines	4	2,9%
Antiarythmiques	3	2,2%
Anticoagulants	3	2,2%
Antihistaminiques	3	2,2%
Myorelaxants	3	2,2%
Antiagrégants plaquettaires	1	0,7%
Anti-inflammatoires	1	0,7%
Antimitotiques	1	0,7%
Antipaludéens aminoquinoléines	1	0,7%
Désinfectants	1	0,7%
Diurétiques	1	0,7%
Médicaments vétérinaires	6	3,3%
Phytopharmaceutiques	27	15,0%
Herbicides	16	59,3%
Insecticides	6	22,2%
Rodenticides	4	14,8%
Engrais	1	3,7%
Produits à usage domestique	8	4,4%

Nettoyants/dégraissants de surface	4	50,0%
Déboucheurs pour canalisation – Liquide alcalin	3	37,5%
Nettoyant pour textile	1	12,5%
Produits cosmétiques	3	1,7%

Tableau 1. Toxiques en cause seuls ou en association dans les intoxications volontaires mortelles.

2. Observatoire multi-sources des intoxications aiguës en Ile de France (10)

Une étude réalisée sur la période allant de 2010 à 2011 en région parisienne a colligé les données du centre antipoison (CAP) de Paris, d'un service d'urgence et de réanimation médicale toxicologique (groupement hospitalier de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris : Fernand Widal, Saint-Louis, Lariboisière), du centre régional de pharmacovigilance (CRPV) et de deux laboratoires de toxicologie réalisant les expertises judiciaires en post-mortem (le laboratoire de pharmacologie et de toxicologie de l'hôpital Raymond Poincaré à Garches et le laboratoire Toxlab à Paris). Les laboratoires de toxicologie ont retrouvé 207 décès toxiques pré-hospitaliers, les services de réanimations 270 cas graves d'intoxications dont 18 décès, le CRPV 45 cas d'intoxications aiguës et 2980 cas d'intoxications aiguës en service d'urgence. Les cas signalés au CAP correspondaient pour 59,8% à des expositions environnementales (produits de nettoyage/entretien, désinfectant hors matériel médical, produits cosmétiques et corporels, produits phytosanitaires), pour 31,3% à des intoxications médicamenteuses et pour 8,9% à des intoxications alimentaires. Pour les autres les causes médicamenteuses étaient les plus fréquentes, à l'exception des services d'urgence pour lesquels l'éthanol occupait le premier rang. Les médicaments les plus souvent en cause en Île-de-France lors d'intoxications signalées au CAP étaient, pour les intoxications volontaires (par ordre de fréquence décroissante) le bromazépan, le paracétamol, l'ibuprofène et l'hydroxyzine et, pour les intoxications accidentelles, le paracétamol, le bromazépan, l'ibuprofène et le tramadol. Pour le service de réanimation et les experts judiciaires toxicologues, le paracétamol, le bromazépan et le citalopram occupaient les trois premiers rangs des principes actifs les plus fréquemment impliqués dans les intoxications aiguës volontaires.

ii. Suisse (11)

Selon le rapport d'activité du Centre Suisse d'Information Toxicologique (CSIT) de 2017, 32 719 cas d'intoxication ont été rapportés. Les enfants de moins de 5 ans sont les plus fréquemment touchés (45,4%). Les intoxications étaient accidentelles dans la majorité des cas (80,7%) et volontaires dans 13,8% des cas, une faible part demeurant indéterminée. Les agents en cause étaient principalement les médicaments (34,7%) suivi des produits domestiques (26,3%) et des plantes (8,4%). Le détail des médicaments impliqués n'est pas fourni dans le rapport. Chez l'enfant, aucune intoxication n'a été fatale, et chez l'adulte 7 intoxications ont conduit au décès.

iii. Belgique (12)

Le rapport annuel d'activité du centre antipoison belge de l'année 2018 rapporte 48 042 intoxications dont 51,5% d'adultes et 48,5% d'enfants (32% < 4 ans). Le sex ratio est partagé (H/F = 1,14). Les premiers agents cause étaient les médicaments (51%), suivi des produits domestiques (23%), des produits alimentaires/cosmétiques/tabac (16%) et des pesticides (5%). Selon la classification ATC la première classe de médicament en cause était les médicaments du système nerveux (43%), suivi du système respiratoire (10%), du système musculo-squelettique (9%) du système digestif et du métabolisme (8%) et du système cardio-vasculaire (7%).

iv. Suède

En Suède l'étude rétrospective d'un service de réanimation médicale (n=8 155 admissions, 6730 patients) rapporte une incidence de 43/100 000 avec un taux de mortalité de 1,9% (13). L'âge moyen était de 38 ans, et il n'y avait pas de différence significative entre les hommes et les femmes (50,6% d'hommes). 46% des patients avaient déjà été admis pour intoxication aux urgences ou en réanimation. Une assistance respiratoire a été mise en place pour 14,6% et 1,2% ont été dialysés. Les substances les plus fréquemment impliquées dans les intoxications étaient l'éthanol (15%), les psychotropes sédatifs (16,2%), les associations de plusieurs substances (29,7%).

v. Etats-Unis

Aux Etats-Unis, le rapport de l'année 2017 de l'association américaine des centres antipoison (AAPCC) rapporte 2 541 728 cas d'exposition, 1 858 385 étaient des expositions à

une seule substance, 954 802 (51,4%) de non-médicaments et 903 583 (48,6%) de médicaments. 23,2% des intoxications aux médicaments étaient volontaires contre 4,1% seulement pour les produits non médicamenteux. Les enfants de plus de 3 ans étaient impliqués dans 33,6% des expositions, et les enfants ≤ 5 ans représentent presque la moitié de l'ensemble des cas d'intoxications (45,2%). La majorité des intoxications étaient accidentelles (77%) et 18,9% volontaires. 656 235 cas ont nécessité une prise en charge hospitalière, 47% ont été traités puis sont sortis, 101 849 (15,5%) ont été admis en unité de soins intensifs, et 85 629 (13%) ont été admis directement en établissement de psychiatrie. Au total, 1 388 cas d'intoxications fatales ont été rapportés, les catégories de substances les plus fréquemment impliquées sont détaillées dans le tableau 2 (14).

Substances (par catégories)	Toutes les substances	%	Exposition à une substance unique	%
Psychotropes sédatifs	404	12,38	14	2,34
Opioides	315	9,65	48	8,03
Produits stupéfiants	299	9,16	71	11,87
Alcool	202	6,19	15	2,51
Antagonistes calciques	170	5,21	31	5,18
Paracétamol en association	142	4,35	28	4,68
Paracétamol seul	140	4,29	61	10,20
Bétabloquants	118	3,62	12	2,01
Antidépresseurs (Sans ISRS, IRNS et ATC)	87	2,67	9	1,51
Substances inconnues	87	2,67	26	4,35
Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS)	84	2,57	1	0,17
Antihistaminiques	82	2,51	14	2,34
Hypoglycémiant	74	2,27	14	2,34
Antidépresseurs tricycliques (ATC)	73	2,24	9	1,51
Myorelaxants	72	2,21	11	1,84
Anticonvulsivants (GABA et dérivés)	64	1,96	3	0,50
Médicaments du système cardiovasculaire	60	1,84	17	2,84
Fumées/gaz/vapeurs	53	1,62	32	5,35
Acide acétylsalicylique seul	47	1,44	20	3,34

Anticonvulsivants	45	1,38	3	0,50
AINS	42	1,29	6	1,00
Inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (non sélectifs, IRNS)	40	1,23	2	0,33
Inhibiteurs de l'enzyme de conversion	38	1,16	1	0,17
Cannabinoïdes et analogues	37	1,13	2	0,33
Autres produits chimiques	35	1,07	20	3,34

Tableau 2. Substances les plus fréquemment impliquées dans les intoxications fatales aux Etats-Unis en 2017 (14).

vi. Australie (15)

Le rapport de 2015 des centres d'information australiens sur les poisons rapporte 164 363 appels en lien avec des intoxications. Les expositions étaient accidentelles dans la majorité des cas (64,4%), liées à des erreurs médicamenteuses dans 18,1% des cas, et intentionnelles dans 10,7% des cas. Les substances les plus fréquemment impliquées étaient les médicaments (paracétamol 7,3%, antidépresseurs 4,2%, AINS 3,9%, cardiotropes 3,4%, sédatifs 2,9%, neuroleptiques 2,7%) suivi des produits domestiques (10,2%), des produits cosmétiques (4,2%), des morsures/piqûres (3,3%) et des pesticides (2,8%). Les âges les plus touchés étaient les enfants de moins de 4 ans (45%) suivi des adultes dans 40% des cas. Les expositions étaient majoritairement intentionnelles chez les adolescents (50% des cas).

b. Pays en voie de développement

Dans les pays en voie de développement il n'existe pas de système permettant de colliger les données épidémiologiques au niveau national. Chaque étude est réalisée sur un échantillon plus ou moins large de la population permettant une estimation de la problématique au niveau national.

i. Chine

En Chine, 16 176 décès par intoxication non volontaires ont été dénombrés en 2016 selon le centre chinois de surveillance et de prévention des maladies (3). Dans une sous population de 84 060 559 de personnes, 4 936 intoxications fatales ont été dénombrées en 2016 soit un

taux de mortalité de 5.9/100 000. Le sex ratio pour les intoxications est partagé (H/F : 1,03), mais plus élevé pour les hommes concernant les intoxications fatales (H/F, 1,80). Les intoxications étaient majoritairement involontaires chez les enfants de moins de 5 ans, et volontaires chez les adultes. Les auteurs observent une diminution du taux de mortalité allant de 9,2 à 5,4/100000 entre 2006 et 2016, respectivement. Cette baisse est associée à une réduction du pourcentage de personnes résidant en zone rurale de 80% à 50% au cours des 25 dernières années, entraînant une diminution de 300 millions de personnes ayant accès aux pesticides (16). Les personnes travaillant dans l'agriculture ont également diminué de 50% en 2002 à 31% en 2013 (17). La mortalité est plus élevée en zone rurale par rapport aux zones urbaines (2,1 à 2,8 fois plus élevée). Chez les hommes les pesticides et l'alcool sont responsables de 48% et 22% des intoxications, respectivement. Chez les femmes les pesticides étaient la principale cause de décès (69%).

ii. Inde

Il n'existe pas de données nationales sur les intoxications en Inde. La dernière étude du centre antipoison de New Delhi a été réalisée sur la période allant d'avril 1999 à mars 2002 (18). Les hommes étaient majoritairement concernés (H = 1426, F = 1068). La tranche d'âge la plus touchée était les 14-40 ans. Les intoxications étaient principalement volontaires (53%), et accidentelles dans 47% des cas. Les substances en cause étaient des produits domestiques (44,1%), suivi des médicaments (18,8%), des pesticides (12,8%), des produits industriels (8,9%) et des morsures/piqûres d'animaux (4,7%).

Lorsque l'on s'intéresse à un service de médecine légiste (Patiala, Punjab), en 2010 sur 624 autopsies, 110 décès étaient dus à des intoxications (2). La tranche d'âge la plus touchée était les 21-30 ans suivis des 31-40 ans. Les hommes étaient plus touchés (73,7%) que les femmes (27,3%). Le phosphore d'aluminium était responsable de 50% des décès, le reste étant dû aux dérivés chlorés, aux organophosphorés et aux pesticides. Le phosphore d'aluminium, également appelé « *rice tablet* », est un rodenticide et insecticide utilisé pour conserver les céréales ; l'exposition est accidentelle le plus souvent.

Une étude a été publiée sur les cas d'intoxication des centres hospitaliers de Pune (Maharashtra) représentant une agglomération de 9,4 millions d'habitants. Les données ont été collectées entre janvier 2013 et décembre 2015. Les intoxications touchent les personnes d'âge moyen (20-35 ans) et principalement des hommes (56,2%). Les produits les plus fréquents

étaient les produits domestiques et les produits agricoles (53,3%). La plupart des intoxications étaient volontaires (53,3%). Le taux de décès était de 9,8%. Les produits les plus souvent impliqués dans les décès étaient les produits domestiques et agricoles (82,8%) suivi des morsures/piqûres d'animaux (14,1%) et intoxications médicamenteuses (2,0%).

iii. Iran

Entre 1990 et 2015 40 456 décès dus aux intoxications ont été dénombrés dans le pays, soit un taux de mortalité sur la période étudiée de 62/100 000. Le taux de mortalité par intoxication a considérablement diminué entre 1990 et 2015 en passant de 3.08 à 0.96/100 000 (19). Les tranches d'âge les plus touchées par les intoxications étaient les enfants de moins de 5 ans et les personnes âgées de plus de 70 ans. Les médicaments sont responsables de la majorité des intoxications aiguës (20). Ensuite viennent les pesticides dans les régions agricoles du nord du pays, et le monoxyde de carbone dans les régions polluées comme Téhéran et les régions froides du nord et de l'ouest en raison de l'utilisation de chauffages. Dans une étude réalisée à l'hôpital Baharloo de Téhéran sur 245 décès par intoxication, la cause la plus fréquente était le phosphore d'aluminium (101 cas), suivi de l'opium (70 cas), le tramadol (11 cas) et les stimulants (10 cas) (21).

2. Prise en charge des intoxications

a. Traitement symptomatique (22)

L'objectif du traitement symptomatique est de prendre en charge des perturbations de l'état de conscience, hémodynamique, de la fonction respiratoire, rénale, hépatique, de la température corporelle, de l'homéostasie (déséquilibre acide/base, électrolytiques), de la coagulation et des lignées cellulaires. Celui-ci est empirique, et fait appel à des systèmes d'assistance ou des traitements pharmacologiques qui vont dépendre des défaillances du patient. Quel que soit le type d'intoxication la première mesure à mettre en place est de soustraire le patient au toxique. En cas de défaillance respiratoire l'objectif premier est de corriger l'hypoxémie par des moyens plus ou moins invasifs: ventilation non invasive ou ventilation invasive (avec assistance).

Le patient doit alors être pris en charge rapidement dans un centre compétent en milieu hospitalier et équipé d'une réanimation médicale. Chaque défaillance d'organe doit être gérée de façon spécifique par une équipe entraînée et multidisciplinaire.

Dans les défaillances hémodynamiques (état de choc) le traitement est adapté à son mécanisme :

- Cardiogénique :
 - Sur bradycardie extrême le patient est traité par isoprénaline (atropine uniquement si le choc est d'origine vagale, jamais fait en pratique) ;
 - Dysfonction ventriculaire gauche aiguë : Le patient sera traité par dobutamine, pouvant aller jusqu'à l'assistance cardiaque ;
- Vasoplégique : ce n'est pas un choc en soit mais cela participe à l'état de choc de façon plus ou moins prépondérante, le patient sera traité par remplissage par du sérum hypertonique, avec ajout d'amines vasopressives en cas de non réponse (noradrénaline ou adrénaline) ;
- Hémorragique (anticoagulant) : le patient est traité par remplissage, transfusion de culot globulaires et noradrénaline ;
- Septique (traitement spécifique indépendant des intoxications).

La prise en charge d'une insuffisance rénale va dépendre de la gravité (anurie, œdème aiguë pulmonaire, acidose métabolique, hyperkaliémie) et du mécanisme en cause (pré-rénal : fonctionnel ou organique, post rénal : obstructif). La prise en charge de l'insuffisance rénale est particulièrement importante dans le cas d'intoxications avec des composés dont l'élimination se fait par voie urinaire.

L'insuffisance hépatocellulaire aiguë est responsable de nombreux déséquilibres métaboliques (hypoglycémie, encéphalopathie hépatique liée à l'hyperammoniémie, acidose lactique) et de la coagulation (risque hémorragique accru) dont les traitements symptomatiques visent à substituer la fonctionnalité du foie. Des systèmes de suppléances ont été développés comme le système MARS (*molecular adsorbent recirculating system*) ou SPAD (*single pass albumin dialysis*). Toutefois tous les services de réanimation médicale ne disposent pas de ce type de machine, et leur utilisation nécessite d'avoir un personnel spécifiquement formé. Le fonctionnement du système MARS est détaillé dans la suite du manuscrit.

Les comas toxiques peuvent être responsables d'hypothermies sévères (< 29°C) pouvant être à l'origine de trouble du rythme ventriculaire. Le traitement repose sur le réchauffement par couverture de survie. La prise en charge de l'hyperthermie maligne (> 39°C) va dépendre de l'étiologie : un traitement par dantrolène pourra être mis en place en cas de syndrome malin des neuroleptiques, ou par cyproheptadine en cas de syndrome sérotoninergique.

Le traitement des troubles de la coagulation dépend du type de trouble et de l'agent causal. Concernant les intoxications aux anti-vitamines K qui constituent la cause la plus fréquente de troubles de la coagulation, la HAS a publié des recommandations avec une stratification de la prise en charge dépendant de l'INR et de la présence ou non de saignements (23). Les anticoagulants oraux d'action directe (anti-Xa et anti-IIa) la prise en charge repose sur l'administration de complexe prothrombinique activé à l'exception du dabigatran qui possède son propre antidote l'idarucizumab. Les troubles de la coagulation consécutifs à des morsures de serpents sont un signe de gravité de l'envenimation et nécessite l'administration rapide de l'antidote correspondant (le plus souvent envenimation vipérine en Europe).

En cas d'atteinte des lignées cellulaires, il est nécessaire de définir l'origine périphérique ou centrale et le mécanisme de toxicité. Pour les atteintes périphériques, selon la gravité, il est préconisé d'administrer des culots de globules rouges ou culot plaquettaire selon les cellules touchées. Les facteurs de croissance hématopoïétiques (erythropoïétine, G-CSF, thrombopoïétine) ont quant à eux leur place dans les atteintes d'origine centrale.

b. Traitement évacuateur

Le traitement évacuateur repose principalement sur l'administration orale de charbon activé. Il n'est pas absorbé par la muqueuse digestive, ses effets se limitent donc au milieu digestif. Sa durée d'action correspond à celle du transit, il est ensuite éliminé par voie fécale. Celui-ci doit être administré le plus précocement possible par rapport à l'intoxication, idéalement dans l'heure qui suit. Toutefois, en raison des formes galéniques (libération prolongée) et de l'effet ralentisseur du transit de certains médicaments, il est possible de l'administrer jusqu'à 4 heures post ingestion. La dose est de 50 g chez les adultes et 0,5-1 g/Kg chez les enfants. Une administration répétée est indiquée pour les molécules persistant longtemps dans l'estomac, les formes à libération prolongée ou les substances ayant un cycle entéro-hépatique. Le charbon activé n'est pas ou peu efficace dans les intoxications avec des acides ou des bases, des alcools, des solvants organiques, des sels inorganiques ou des métaux (24).

Le lavage gastrique est indiqué uniquement pour les intoxications aux composés non carboadsorbables, il garde une indication en France dans les intoxications au lithium. La décontamination digestive n'est plus préconisée et les laxatifs ne sont pas recommandés.

c. Traitements épurateurs

i. Diurèse alcaline

La diurèse alcaline est indiquée dans les intoxications par des composés acides. L'alcalinisation des urines (pH >7) permet d'augmenter l'élimination urinaire de l'acide salicylique, des barbituriques et de certains pesticides (25–27). Cependant, l'administration de charbon activé reste plus efficace que la diurèse alcaline dans le traitement des intoxications au phénobarbital (28). La diurèse alcaline est également recommandée dans les chimiothérapies incluant du méthotrexate à haute dose afin d'éviter les lithiases tubulaires et de favoriser son élimination rénale (29).

ii. Epuration extracorporelle

L'utilisation de système d'épuration extracorporelle (EEC) est indiquée si l'intoxication est sévère (tableau 3) et si la capacité d'élimination du toxique peut être augmentée de plus de 30% (30). Les capacités d'épuration vont dépendre du toxique et de la méthode utilisée.

(1) Quantité ingérée associée à une toxicité sévère
(2) Ingestion d'un toxique ayant des effets retardés
(3) Voie d'élimination naturelle altérée
(4) Détérioration clinique du patient
(5) Gravité manifeste de l'intoxication : hypotension, coma, acidose métabolique, dépression respiratoire, arythmie ou décompensation cardiaque

Tableau 3. Caractérisation d'une intoxication sévère (31).

1. Hémodialyse

Pour être candidat à l'hémodialyse un toxique doit présenter certaines caractéristiques, elles sont résumées dans le tableau 4. Au cours de l'hémodialyse les substances sont épurées du sang par diffusion à travers une membrane semi-perméable. Afin d'être éligible à l'hémodialyse les molécules doivent être hydrophile, de faible poids moléculaire, avoir un petit volume de distribution, et un taux de liaison aux protéines plasmatiques faible. L'efficacité de l'épuration va dépendre des débits appliqués ainsi que de la surface de la membrane de dialyse. Plus celle-ci sera importante, plus la dialyse sera efficace. L'effet indésirable pouvant apparaître avec ce

type de traitement est une réapparition des symptômes à l'arrêt du traitement liée aux phénomènes de redistribution. L'utilisation de l'hémodialyse est indiquée dans les intoxications à l'éthylène glycol, méthanol, au lithium (32,33).

	Hémodialyse	Hémofiltration	Hémoperfusion
Solubilité	Polaire	Polaire	Polaire ou lipophile
Masse moléculaire	< 500 Da	< 40 000 Da	< 40 000 Da
Liaison aux protéines plasmatiques	Faible (<80%)	Faible	Faible ou élevée
Volume de distribution	< 1 L/Kg	< 1 L/Kg	< 1 L/Kg
Clairance	< 4 mL/min/Kg	< 4 mL/min/Kg	< 4 mL/min/Kg
Vitesse de distribution	Rapide	Longue	Rapide

Tableau 4. Propriétés nécessaires pour une épuration par les différentes techniques d'EEC (31).

2. Hémofiltration

Concernant les techniques d'hémofiltration comme la CVVH (*continuous venovenous hemofiltration*) et la CVVHDF (*continuous venovenous hemodiafiltration*), le sang passe au contact de membranes présentant des pores de taille élevée, permettant l'épuration par convection de molécules allant jusqu'à 40 KDa. Contrairement à l'hémodialyse, elle présente l'avantage de pouvoir être appliquée à des patients instables sur le plan hémodynamique (34). L'inconvénient de ce type de technique est la clairance plus faible comparée à l'hémodialyse en raison des débits plus faibles : 67 mL/min en hémofiltration et jusqu'à 500 mL/min en hémodialyse.

3. Hémoperfusion

Durant l'hémoperfusion le sang du patient passe dans une cartouche contenant un produit adsorbant. Il existe trois types d'adsorbant : le charbon activé, les résines synthétique et les

résines échangeuses d'anions (35). Les résines ne sont plus utilisées dans la plupart des pays (36). Le charbon activé permet l'élimination des molécules ayant une masse comprise entre 1000 et 1500 KDa mais ne permet pas l'épuration des molécules liées aux protéines plasmatiques (37). L'hémo perfusion requiert une anticoagulation plus importante que l'hémodialyse, le débit ne doit pas excéder 350 mL/min afin d'éviter les risques d'hémolyse et la cartouche doit être changée toute les 2 heures en raison de la saturation qui diminue la clairance des toxiques (36).

4. MARS

Le MARS est un système d'épuration permettant d'extraire du sang les molécules fortement liées à l'albumine. Il est composé de trois circuits, un circuit sang (patient), un circuit albumine et un circuit hémodialyse (Figure 1). Le sang du patient passe au contact d'une membrane de dialyse à haut débit et les molécules liées aux protéines et celles hydrosolubles vont pouvoir diffuser vers le circuit albumine. Le circuit albumine contient deux filtres : une cartouche de charbon activé permettant d'adsorber les toxiques et une résine échangeuse d'anion permettant d'épurer l'albumine. L'albumine également passe au contact d'une bobine d'hémodialyse où les petites molécules hydrophiles sont filtrées. Le MARS est indiqué depuis 1999 dans le traitement de l'insuffisance hépatique aiguë, primaire ou secondaire sur une insuffisance hépatique chronique. Ce système a rapidement été utilisé pour prendre en charge des intoxications avec des substances liées à l'albumine, avec ou sans insuffisance hépatique. Il a été utilisé avec succès dans le traitement d'intoxications médicamenteuses aux antagonistes calciques (vérapamil, diltiazem, amlodipine), à la théophylline, la lamotrigine, la phénytoïne et au paracétamol (38–46). Il a également permis de prendre en charge des patients intoxiqués à l'amanite phalloïde (*Amanita phalloides*) présentant une hépatite fulminante (47,48).

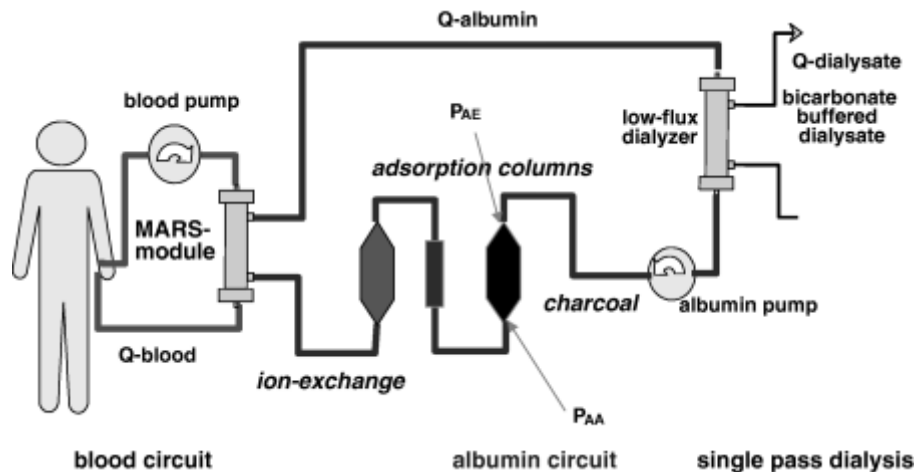


Figure 1. Représentation schématique du système MARS (49).

d. Traitement spécifique (antidotes)

Il existe deux types d'antidotes : les antidotes d'action toxicocinétique, qui vont accélérer la vitesse d'élimination du ou des toxiques et les antidotes d'action toxicodynamique qui vont bloquer spécifiquement l'action toxique des molécules. Les modalités de traitement sont issues des résumés des caractéristiques du produit disponibles sur la base de données publique des médicaments (<http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/>).

i. Antidotes d'action toxicocinétique

1. Redistribution extracellulaire du toxique dans l'organisme

a. EDTA dicobaltique

L'intoxication au cyanure, souvent collective, se fait par inhalation accidentelle domestique lors de l'exposition aux fumées d'incendies. L'inhalation entraîne une perte de connaissance, des convulsions puis un arrêt cardio-respiratoire en quelques minutes ou secondes suivant l'exposition. L'EDTA dicobaltique fixe l'ion cyanure (CN^-) formant un complexe atoxique éliminé dans les urines (50). Il présente des effets indésirables : hypo et hypertension brutales, tachycardie et extrasystoles associées à des nausées, vomissements, diarrhées, sueurs profuses et des réactions anaphylactoïdes (éruptions, œdèmes). La dose à administrer est de 2 ampoules de 20 mL soit 600 mg en 30 secondes suivie d'une injection IV de 50 mL de solution hypertonique de glucose. En cas d'absence d'amélioration une troisième ampoule peut être administrée. Dans l'organisme l'ion cobalt Co^{++} se combine avec 2 ions cyanures. L'élimination est entièrement rénale sous forme inchangée. Il existe une action antidotique

réciproque entre cyanure et cobalt, en l'absence de cyanure l'injection d'EDTA dicobaltique est toxique, il est donc important d'objectiver l'intoxication cyanhydrique avant d'administrer l'antidote.

b. Iodure de potassium

A la suite de l'accident de Tchernobyl, l'Organisation Mondiale de la Santé a publié des recommandations sur la prophylaxie à l'iode consécutive aux accidents nucléaires (51). Dans les pays européens il y a actuellement 185 centrales nucléaires et d'ici 2045, 100 centrales supplémentaires devrait être construites (52). L'iode est indiqué en prévention de l'accumulation d'iode radioactif au niveau de la thyroïde en cas de contamination par des radioéléments émis accidentellement par une installation nucléaire, il permet de réduire de 90% la fixation de l'iode radioactif. Dans les régions où l'apport alimentaire en iode est normal la dose recommandée est ≥ 30 mg, dans les régions où il existe une carence relative en iode alimentaire 50 à 100 mg. L'efficacité est conditionnée par la précocité de la prise en charge. L'iodure de potassium permet de saturer la thyroïde avec de l'iode non radioactif et évite la fixation de l'iode radioactif qui pourrait provoquer l'apparition de troubles tardifs : hypothyroïdie secondaire, nodules ou cancers de la thyroïde.

c. Immunothérapies

i. Anti-digitalique

Les anticorps anti-digitaliques correspondent à des fragments Fab ovins d'anticorps affins pour la fraction génine de la digoxine. Ils se fixent en formant des complexes immuns stables masquant les sites moléculaires du toxique, et permettent une redistribution de la digoxine du compartiment tissulaire vers le compartiment sanguin. Ils sont indiqués dans les intoxications à la digoxine ou ses dérivés, aux plantes contenant des glycosides cardiotoniques (digitale, laurier rose) et aux préparations à base de crapauds du genre *Bufo* (53). Ils sont indiqués en neutralisation équimolaire en présence d'un seul facteur péjoratif suivant :

- Arythmie ventriculaire (fibrillation ou tachycardie ventriculaire),
- Bradycardie sévère < 40 bpm résistante à l'injection IV de 1 mg d'atropine,
- Kaliémie $> 5,5$ mmol/L,
- Choc cardiogénique,
- Infarctus mésentérique.

Il faut 80 mg d'anticorps pour neutraliser 1 mg de digoxine présente dans l'organisme. L'antidote doit être administré en perfusion IV sur 30 min dans du sérum isotonique. Le calcul de la dose lors d'une ingestion aiguë est le suivant: dose interne (mg) = quantité supposée ingérée (en mg) x biodisponibilité de la digoxine (0,8). Les effets indésirables sont des réactions anaphylactoïdes potentiellement mortelles, l'aggravation d'une insuffisance cardiaque préexistante traitée par digitalique, hypokaliémie, phlébite ou réaction d'hypersensibilité.

ii. Idarucizumab

Les anti-coagulants oraux d'action directe ont révolutionné la prise en charge des patients en évitant l'administration parentérale d'héparine, diminuant la durée des hospitalisations et en évitant le monitoring régulier de l'INR imposé par les anti-vitamines K. Le principal inconvénient rencontré avec cette famille de médicaments lors de leur mise sur le marché était l'absence traitement spécifique en cas de saignements menaçant le pronostic vital ou incontrôlés, contrairement aux héparines et aux AVK qui ont leurs antidotes. Cela a depuis été résolu pour le dabigatran (Pradaxa®) avec le développement de l'idarucizumab (Praxbind®). C'est un fragment Fab humanisé qui se lie au dabigatran avec une très forte affinité, approximativement 350 fois plus importante que l'affinité du dabigatran pour la thrombine (54). La dose recommandée d'idarucizumab est de 5 g (2 x 2,5 g/50 mL).

iii. Sérum antivipérin (Viperfav®)

Le sérum antivipérin est constitué d'immunoglobulines équine F(ab')₂ permettant la neutralisation du venin des vipères européennes (*Vipera aspis*, *Vipera berus*, *Vipera ammodytes*) (55,56). Ces F(ab')₂ d'immunoglobuline équine séquestrent les antigènes de venin présents dans la circulation sous la forme de complexes inactifs F(ab')₂ antigènes, diminuant la concentration en venin libre. Expérimentalement, ils sont responsables d'une redistribution des antigènes du venin des sites périphériques tissulaires vers le compartiment vasculaire où ils sont complexés et inactivés. La dose initiale totale recommandée est une perfusion de 4 mL, ils doivent être dilués dans 100 ml de NaCl à 0,9% et administrés en perfusion intraveineuse lente sous surveillance médicale. Chez l'enfant, la perfusion peut être renouvelée 2 fois à 5 heures d'intervalles selon l'évolution clinique.

d. Sugammadex (Bridion®)

Le sugammadex est une γ -cyclodextrine se liant avec certains myorelaxants (rocuronium, vécuronium) ce qui va diminuer la quantité de curare disponible pour se lier aux récepteurs nicotiniques de la jonction neuromusculaire (57). Cela permet une décurarisation après un bloc neuromusculaire. La dose de sugammadex recommandée dépend du degré du bloc neuromusculaire à décurariser.

e. Chélateurs

i. EDTA et plomb

Les traitements chélateurs du plomb sont indiqués dans les cas de saturnisme, ce qui correspond à une concentration sanguine $> 50 \mu\text{g/L}$. L'utilisation de chélateurs permet d'abaisser les concentrations élevées de plomb mais ne préviennent pas les risques cognitifs associés aux niveaux d'exposition plus faibles (58). Cela est lié à l'incapacité d'extraire des quantités suffisantes de plomb à partir des tissus ou l'incapacité de reverser des dommages tissulaires préexistants. L'EDTA est un chélateur du plomb efficace mais il accroît la redistribution du plomb vers le système nerveux central (SNC) sauf si du dimercaprol est administré 4 heures avant. Il est actuellement utilisé en association avec le dimercaprol dans le traitement des encéphalopathies sévères. La posologie usuelle est de $1000\text{--}1500 \text{ mg/m}^2/\text{jour}$ ($1\text{--}2 \text{ g}$ par 24 heures pour un adulte de 70 kg) en perfusion IV continue pendant 5 jours. L'effet indésirable le plus grave associé avec l'EDTA est la néphrotoxicité, laquelle peut être diminuée en administrant des quantités plus faibles, moins fréquentes et en maintenant une bonne hydratation. Il doit être arrêté au moins une heure avant les prélèvements sanguins réalisés pour la plombémie afin de permettre une mesure exacte (59).

ii. Dimercaprol (B.A.L.)

Le dimercaprol (B.A.L., British anti-Lewisite) est un chélateur de choix dans le traitement de l'encéphalopathie et des symptômes graves liés à l'intoxication au plomb en association avec l'EDTA. Il est également indiqué dans les intoxications à l'arsenic, aux sels d'or et aux sels de mercure. La dose usuelle est de 75 mg/m^2 par voie intramusculaire toutes les 4 heures pendant 5 jours (58). Il est indispensable de connaître le statut allergique du patient avant d'initier le traitement car les solutions disponibles en France contiennent de l'huile d'arachide. Les urines doivent être alcalinisées durant le traitement pour prévenir la dissociation du complexe et la

réabsorption du métal. Les effets indésirables sont dose dépendants et transitoires (nausées, vomissements, céphalées, hypertension, tachycardie, fièvre et leucopénie) (59).

iii. Penicillamine (Trolovol®)

Elle a la propriété de chélater les métaux lourds, en particulier le cuivre sérique, ce qui explique son emploi dans la maladie de Wilson. La penicillamine stimule et accroît l'élimination urinaire du cuivre. La dose recommandée est de 750 – 1 500 mg/jour (20 mg/kg/jour), administrée en deux ou trois fois. Il est nécessaire de supplémenter les patients en pyridoxine (vitamine B6) car elle interfère avec son métabolisme. Pour suivre le traitement il est recommandé de réaliser la cuprurie des 24 heures (60). Elle n'est plus utilisée dans les intoxications au plomb à cause du risque de néphrite interstitielle et d'aplasie médullaire.

iv. Déféroxamine (Desferal®)

La déféroxamine est un agent chélateur des anions trivalents : ion ferrique et ion aluminium trivalent; les constantes de formation des complexes sont très élevées respectivement 10^{31} et 10^{25} . La chélation s'effectue sur une base molaire 1:1, de sorte qu'1 g de déféroxamine peut théoriquement complexer 85 mg de fer ferrique (ou 41 mg d' Al^{3+}). L'administration est intramusculaire. L'excrétion urinaire de la ferrioxamine est pour l'essentiel le reflet de la chélation du fer plasmatique (urines rosées), alors que l'élimination fécale reflète principalement la chélation du fer intrahépatique. Le fer de l'hémoglobine, de la transferrine, de l'hémosidérine, de la ferritine et des cytochromes est inaccessible à la déféroxamine. La déféroxamine est associée à des effets indésirables notables tels que l'hypotension, l'insuffisance rénale, le syndrome de défaillance respiratoire aiguë et le sepsis (61).

f. Protamine

La protamine est un mélange de peptides (5-10 KDa) polycationiques fortement acides produits à haute concentration dans le sperme des poissons appartenant aux *Clupidae* et *Salmonidae* chez lesquels elle est liée à l'ADN (62). L'héparine dans l'organisme est liée à l'antithrombine III, après administration de sulfate de protamine par voie IV, il va se lier à l'héparine polyanionique formant une charge neutre (ratio molaire 1:1) isolant l'héparine de l'antithrombine III. Les complexes protamine/héparine sont ensuite éliminés par le système réticulo-endothélial. En raison des effets anticoagulants intrinsèques de la protamine, il est recommandé de ne pas administrer plus de 1 mg de protamine pour 100 IU d'héparine. La demi-

vie est de 24 min en absence d'héparine et 18 min en présence d'héparine (plus courte que celle de l'héparine : 1-2 h). L'administration est réalisée par voie intraveineuse lente, et la dose doit être calculée en fonction de l'héparinémie mesurée et non de la dose d'héparine administrée.

2. *Ralentissement d'un métabolisme activateur*

a. Ethanol

Le méthanol est métabolisé en formaldéhyde par l'alcool déshydrogénase puis en acide formique par l'aldéhyde déshydrogénase. L'acide formique entraîne une inhibition de la cytochrome oxydase de la chaîne respiratoire mitochondriale, entraînant des dysfonctions cellulaires et une atteinte des organes. L'acide formique est particulièrement toxique pour la rétine et le cerveau pouvant aller jusqu'à la perte de la vue et des lésions des ganglions de la base. L'éthanol est plus affiné pour l'alcool déshydrogénase et bloque ainsi la transformation du méthanol en formaldéhyde. La concentration sanguine cible est de 100-125 mg/gL. La dose de charge est de 600-1000 mg/Kg, ce qui correspond à 3-4 verres d'alcools pris par voie orale par un individu de 75 Kg, en considérant que la dose est de 14 g d'éthanol par verre. L'administration devrait être répétée toutes les 1-2 h, et l'éthanol redosé pour maintenir une concentration de 100-125 mg/dL. L'utilisation de l'éthanol comme antidote a plusieurs inconvénients. Il peut aggraver l'intoxication du patient, et maintenir une concentration sanguine fixe est très difficile compte tenu de la variabilité pharmacocinétique interindividuelle (63). Pour ces raisons, l'éthanol sera utilisé si le fomépizole n'est pas disponible.

b. Fomépizole

L'alcool déshydrogénase est responsable de la transformation de l'éthylène glycol en acide glycolique et de la transformation du méthanol en acide formique. Le fomépizole est un inhibiteur de l'alcool déshydrogénase permettant de prévenir la toxification de ces deux composés. Le traitement doit être débuté devant toute suspicion d'intoxication par l'éthylène glycol ou par le méthanol, le plus précocement possible après la prise du toxique, même en l'absence de signes de toxicité. Le fomépizole est par voie intraveineuse à une dose de charge de 15 mg/Kg sur 30 min suivi de 10 mg/Kg toutes les 12 h jusqu'à ce que la concentration de méthanol soit < 30 mg/dL (64). L'administration de fomépizole permet de réduire la formation d'acide formique/acide glycolique, diminuer l'acidose et améliorer les symptômes de l'intoxication (63). Le fomépizole est dialysable, les doses devront être ajustées si le patient est dialysé.

3. Accélération d'un métabolisme inactivateur

a. N-acétylcystéine

Le paracétamol est principalement métabolisé par conjugaison (sulfo- et glucuroconjugaison) et de façon minoritaire transformé en N-acetyl-para-benzoquinone-imine (NAPQ) par le CYP2E1, rapidement conjuguée au glutathion réduit. En cas de surdosage, la voie du CYP2E1 devient majoritaire et la conjugaison au glutathion est saturée. La NAPQ se fixe alors aux protéines hépatiques, conduisant à une nécrose cellulaire aboutissant à une cytolysé hépatique. L'administration de N-acétylcystéine permet de régénérer le glutathion et restaurer la voie de détoxification par conjugaison au glutathion. Le traitement doit être instauré dans les 8 heures suivant l'ingestion du paracétamol. En cas d'administration d'acétylcystéine dans les 15 heures suivant le surdosage en paracétamol, le traitement est généralement inefficace, bien qu'il existe dans la littérature des rapports faisant état d'une efficacité du traitement 16–24 heures après la prise de paracétamol (65). Chez les patients > 40 Kg la dose de charge est de 150 mg/kg dilués dans 200 ml de soluté glucosé à 5%, perfusés en 60 min, suivi d'une deuxième dose de 50 mg/kg dilués dans 500 ml de soluté glucosé à 5%, perfusés en 4 heures, puis d'une troisième dose de 100 mg/kg dans 1000 ml de soluté glucosé à 5%, perfusés en 16 heures. Chez les patients <40 Kg, les doses sont identiques seuls les volumes diffèrent.

b. Carboxypeptidase-G2 (Voraxaze®)

Le méthotrexate (MTX) haute dose (de 1 000 à 30 000 mg/m²) est inclus dans différents protocoles de chimiothérapies, notamment dans le traitement des leucémies aigues lymphoblastiques, les ostéosarcomes et les lymphomes. Le MTX présente la particularité d'être néphrotoxique directement et par précipitation de ses métabolites au niveau des tubules rénaux. La voie urinaire étant la principale voie d'élimination du méthotrexate, cela entraîne un retard d'élimination et une exacerbation de ses toxicités (myélotoxicité principalement). La carboxypeptidase est une enzyme qui hydrolyse naturellement le résidu glutamate terminal des folates et de leurs analogues. Après administration elle hydrolyse rapidement le MTX en acide 4-deoxy-4-amino-N-méthylptéorique (DAMPA) et en acide glutamique, permettant une dégradation rapide du méthotrexate présent au niveau du compartiment sanguin (66). Les critères d'administration sont une créatininémie augmentée d'un facteur 1,5 par rapport à la valeur basale associée à une concentration de MTX comprise entre 3 et 10 µM ou une concentration de MTX > 10 µM à H48.

4. *Restauration de la fonctionnalité enzymatique*

a. Pralidoxime

Les organophosphorés (pesticides, armes biologiques) sont des molécules qui se fixent de façon covalente au site actif de la choline estérase, bloquant la fonctionnalité de l'enzyme. Ils bloquent ainsi la transformation de l'acétylcholine en choline et acide acétique. Cela entraîne une accumulation d'acétylcholine au niveau des ganglions du système nerveux autonome, des jonctions neuromusculaires, des fibres post-ganglionnaires du système nerveux parasympathique et du système nerveux central. Sur le plan clinique ils entraînent un syndrome muscarinique, un syndrome nicotinique et troubles comportementaux avec des crises tonico-cloniques (67). La gravité de l'intoxication est principalement liée à l'insuffisance respiratoire aiguë consécutive à l'intoxication. La pralidoxime permet de régénérer l'acétylcholinestérase durant les 24 h suivant l'intoxication, elle réactive par hydrolyse les enzymes phosphorylées. La dose préconisée chez l'adulte est de 1 à 2 g en bolus de 30 min puis infusion de 0,4 g/h. Chez l'enfant, on préconise l'administration d'un bolus de 30 mg/kg sur 30 min puis une infusion continue de 10 mg/kg/h pour une durée de 18 h minimum (68). La dose peut être réduite chez les patients ayant une fonction rénale altérée.

5. *Restauration de la fonctionnalité d'une protéine*

a. Méthylthioninium (bleu de méthylène)

La méthémoglobine fait référence à l'oxydation du fer ferreux (Fe^{++}) contenu dans l'hémoglobine en fer ferrique (Fe^{+++}). Cette réaction empêche l'hémoglobine de fixer le dioxygène et le dioxyde de carbone, entraînant une hypoxie tissulaire pouvant conduire au décès dans les cas les plus sévères. Les causes les plus fréquentes sont les intoxications à l'aniline, la benzocaïne, la dapsonne, la phenazopyridine, les nitrites, les nitrates et le naphthalène (69). Le méthylthioninium ou bleu de méthylène est indiqué dans le traitement symptomatique aigu de la méthémoglobinémie induite par des médicaments ou des produits chimiques. Le mécanisme d'action est schématisé sur la figure 2. Pour que le traitement soit efficace, il est nécessaire que la NADPH (nicotinamide adénine phosphate dinucléotide phosphate) réductase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PD) soient fonctionnelles, pour cette raison le bleu de méthylène est contre-indiqué chez les patients souffrant de déficit en NADPH réductase et G-6-PD. La dose habituelle est de 1 à 2 mg par kg de poids corporel, soit 0,2 à 0,4 ml par kg de poids corporel, administré sur une durée de 5 minutes. La dose peut être répétée (1 à 2 mg /kg

de poids corporel, soit 0,2 à 0,4 ml /kg de poids corporel) une heure après la première dose en cas de symptômes persistants, sans dépasser 7 mg/Kg.

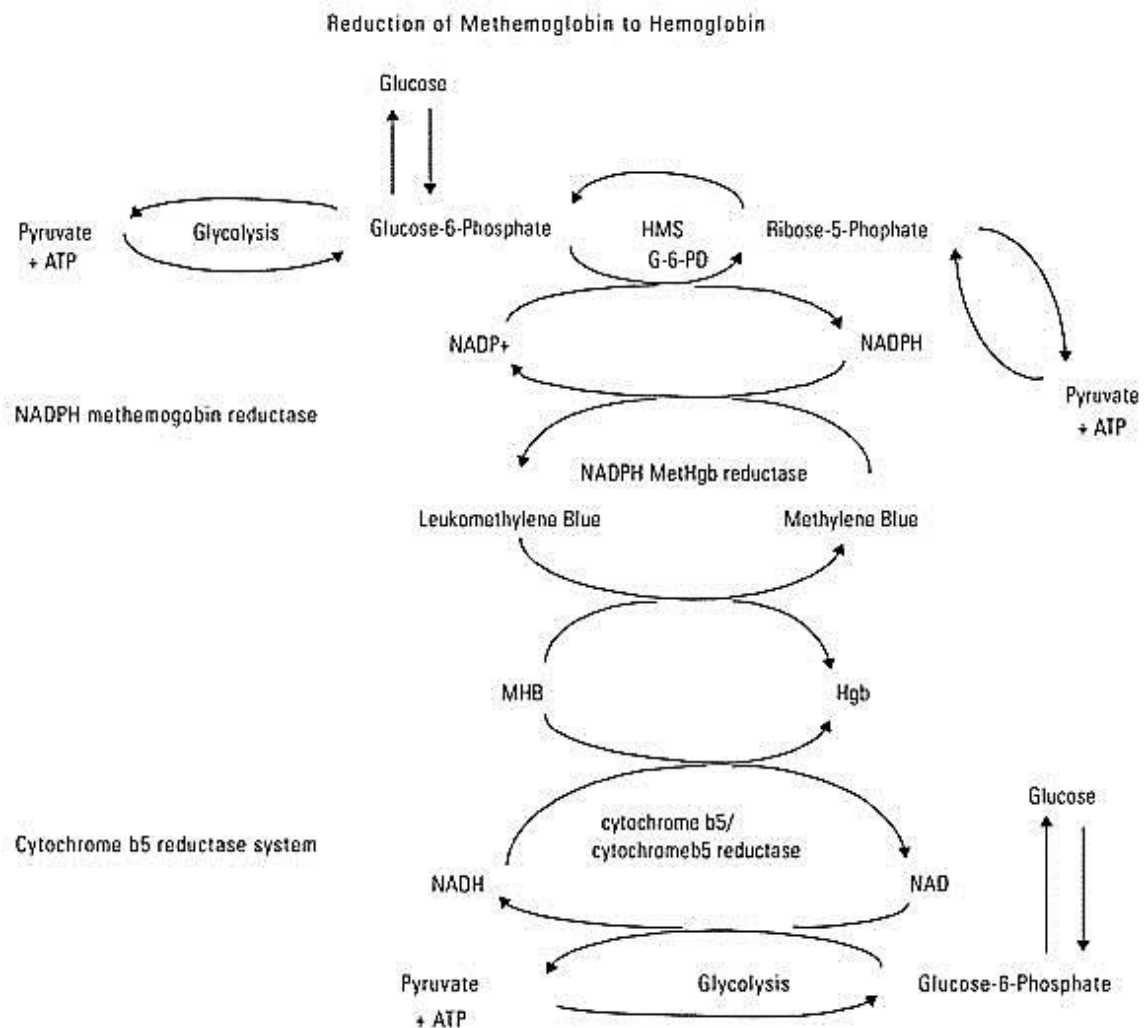


Figure 2. Réduction de la méthémoglobine en hémoglobine. ATP : Adénosine triphosphate ; G-6-PD : glucose-6-déhydrogénase ; Hgb : hémoglobine ; MHB : méthémoglobine (69).

ii. Antidotes d'action toxicodynamique

Concernant les antidotes d'action toxicodynamique, on peut distinguer les antidotes déplaçant le toxique de sa cible, avec un effet antagoniste sur le récepteur (naloxone et opiacés, flumazénil et benzodiazépines), les antidotes qui court-circuitent la liaison du toxique au récepteur (glucagon et bêta-bloquants) et les antidotes qui corrigent les effets du toxique (solutés salés hypertoniques et médicaments à effets stabilisateurs de membrane).

1. Antidotes déplaçant le toxique de sa cible

a. Flumazénil

Les intoxications aux benzodiazépines et apparentés (zolpidem, zopiclone) sont parmi les intoxications médicamenteuses aiguës les plus fréquentes (9). L'antidote de ces intoxications est un antagoniste spécifique compétitif du récepteur GABA de type A, le flumazénil. Il se fixe sur la sous-unité gamma du récepteur-canal GABA-A sur le site de fixation des benzodiazépines, c'est un antagoniste compétitif. Le délai d'action est de 1 minute et la durée d'action varie de 1 à 2 heures. La demi-vie du flumazénil est de l'ordre de 40 à 80 minutes, et la liaison aux protéines plasmatiques est de 50%. Les effets hypnotiques, sédatifs et déprimeurs respiratoires des benzodiazépines sont rapidement neutralisés par le flumazénil injecté par voie intraveineuse (quelques minutes) mais peuvent réapparaître progressivement dans les heures qui suivent l'administration de l'antidote selon la demi-vie des produits et le rapport existant entre les doses d'agoniste (benzodiazépines) et d'antagoniste (flumazénil) administrées. Cet antidote fonctionne également lors d'intoxications avec les nouvelles benzodiazépines de synthèse, cela a été mis en évidence chez un patient intoxiqué au flubromazolam (70). Le volume de distribution du flumazénil est élevé, avec une distribution extravasculaire. Le flumazénil est largement métabolisé par le foie en un métabolite inactif, un acide carboxylique qui est éliminé par voie urinaire. Au cours de l'insuffisance hépatique, la demi-vie d'élimination du flumazénil est allongée tandis que la clairance totale est diminuée par comparaison avec le sujet sain. En revanche, ni les modifications physiologiques (sexe, âge), ni l'insuffisance rénale ne semblent modifier la pharmacocinétique du flumazénil. Parmi les précautions d'emploi, il est à noter le risque de convulsions en cas d'intoxications associant les benzodiazépines à d'autres substances abaissant le seuil épiléptogène telles que les antidépresseurs tricycliques d'une part, et de levée de l'effet anticonvulsivant des benzodiazépines chez les patients avec une épilepsie d'autre part. Le flumazénil est bien toléré, en particulier sur le plan hémodynamique.

b. Naloxone

L'antidote des intoxications aiguës aux opiacés est la naloxone, un antagoniste sélectif du récepteur des opioïdes de type μ . Le délai d'action de la naloxone, est de 1 à 2 min en IV, 3 min en IM ou SC, et 20 min par voie nasale. La durée d'action de la naloxone est de 20 à 30 min en IV, 30-60 min par voie nasale, 2-3 heures en IM ou SC. Elle est inférieure à celle des médicaments opiacés (demi-vie de la morphine : 2 à 3 h) ce qui nécessite une administration fréquente de l'antidote. La naloxone possède une affinité de 50 à 100 fois plus grande que celle

de la morphine, qui permet d'inverser l'effet de la morphine via aussi bien l'injection intraveineuse que par voie nasale. La naloxone est efficace dans le traitement de la dépression respiratoire secondaire à l'intoxication aiguë aux opiacés, y compris aux nouveaux opioïdes de synthèses (71–78). En revanche, la naloxone est inefficace dans le traitement des intoxications à la buprénorphine, agoniste partiel des récepteurs opioïdes de type μ . Les effets indésirables peuvent notamment concerner l'appareil cardiovasculaire (hypertension, trouble du rythme ventriculaire, œdème aigu pulmonaire) et le système nerveux (agitation, anxiété). Il est à noter que l'administration de naloxone chez des patients avec une intoxication chronique aux opioïdes peut entraîner un syndrome de sevrage. Dans un contexte où des substances opioïdes de plus en plus puissantes circulent (analogues du fentanyl), la naloxone par voie nasale a reçu une autorisation de mise sur le marché au début de l'année 2018 chez l'adulte et l'enfant dans le traitement d'urgence des surdosages aux opioïdes, qui se manifestant par une dépression respiratoire et dans l'attente d'une prise en charge par une structure médicalisée.

2. Antidotes shuntant la liaison toxique-récepteur

a. Glucagon (β -bloquants)

Les β -bloquants appartiennent à la classe II des anti-arythmiques exercent des effets inotrope, chronotrope, bathmotrope et dromotrope négatifs. L'antagonisme des récepteurs β_1 provoque une inhibition de la production d'AMPc (AMP cyclique), impliquée dans la conduction cardiaque. En cas d'intoxication aux β -bloquants, il se produit une inhibition de la voie de l'AMPc, qui participe aux signes cardiaques de l'intoxication. Le glucagon exerce un effet « by-pass » du récepteur membranaire adrénergique β_1 en stimulant la production d'AMPc par une voie indépendante des récepteurs β_1 . L'augmentation de la production intracellulaire d'AMPc va entraîner l'activation d'une protéine kinase A, favorisant *in fine* l'augmentation du calcium intracellulaire et conduisant à l'augmentation de la contraction musculaire (inotropisme positif), ainsi que l'augmentation de la vitesse de dépolarisation initiale des fibres du nœud auriculo-ventriculaire qui accroît sa vitesse de propagation (effet dromotrope positif). Les effets cliniques apparaissent en quelques minutes et persistent 10-15 min. Il est utilisé en cas d'hypotension à la posologie de 5 à 10 mg (0,15 mg/Kg) en bolus IV, suivi en cas d'efficacité par une perfusion continue à la dose de 1 à 10 mg/h (0,05-0,10 mg/Kg/h). Sa demi-vie est de 20 min. Il permet d'obtenir une amélioration au moins partielle de la pression

artérielle. Le glucagon est indiqué en deuxième intention, l'insuline euglycémique et les catécholamines étant privilégiées (79).

b. Insuline euglycémique (antagonistes calciques et β -bloquants)

Les antagonistes calciques appartiennent à la classe IV des anti-arythmiques. Ils diminuent l'influx de calcium dans les cellules à travers les canaux calciques lents. Ils agissent au niveau du myocarde (cellules contractiles auriculaires et ventriculaires) et des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire. L'administration d'insuline et de glucose augmente le transfert de glucose vers le milieu intracellulaire, notamment au niveau du myocarde et permet ainsi de réamorcer l'alimentation du cœur en source d'énergie. L'insuline euglycémique s'est montrée efficace dans lors d'intoxications aux β -bloquants et/ou aux antagonistes calciques, avec un effet inotrope positif et une augmentation de la pression artérielle (79). Elle a également permis dans certains cas un sevrage des catécholamines. Les recommandations posologiques sont : insuline ordinaire en bolus IV : 0,5 à 1 UI/Kg puis infusion continue de 0,5 UI/Kg/h, associée à une supplémentation en glucose (20 à 30 g/h) et en potassium avec un contrôle strict de la glycémie.

3. Antidotes corrigeant les effets du toxique

a. Solutés salés hypertoniques (lactate de sodium et bicarbonate de sodium) et toxiques à effet stabilisant de membrane

L'antidote des intoxications aux médicaments avec un effet stabilisateur de membrane sont les solutés salés hypertoniques. L'intoxication aux médicaments ayant un effet stabilisant de membrane est liée au blocage des canaux sodiques membranaires rapides. Ceci a pour effet une inhibition de l'entrée de sodium dans la cellule cardiaque. L'une des conséquences sur l'activité électrique du cœur est une prolongation de la dépolarisation ventriculaire des fibres rapides (élargissement des complexes QRS) (80). Il existe de nombreux médicaments toxiques avec un effet stabilisant de membrane dont les antiarythmiques de classe I dans la classification de Vaughan-Williams (bloqueurs du canal sodique rapide), des β -bloquants (propranolol), les antidépresseurs tricycliques, la chloroquine et la cocaïne. L'inhibition des canaux sodiques rapides déprime la phase 0 du potentiel d'action, qui entraîne une diminution de la vitesse d'ascension du potentiel d'action, un ralentissement de la vitesse de propagation ainsi qu'un

allongement de la période réfractaire. Les solutés salés hypertoniques sont des antidotes des médicaments à effet stabilisant de membrane en favorisant l'entrée de sodium dans la cellule, via le remplissage vasculaire et en favorisant la dissociation du toxique de son récepteur. Ils corrigent ainsi les effets toxiques cardiaques des médicaments à effet stabilisant de membrane.

3. Place des analyses toxicologiques

Lors de la prise en charge d'un patient intoxiqué ou supposé intoxiqué, l'analyse toxicologique viendra après un examen clinique complet et un bilan biologique de routine. Les analyses toxicologiques permettent de confirmer ou d'écarter une intoxication, d'évaluer la gravité d'une intoxication ou de surveiller l'évolution d'une intoxication.

a. Confirmation d'une intoxication

Les outils analytiques modernes permettent de détecter et de quantifier tous les types de toxiques dans les matrices biologiques. Classiquement, dans un premier temps un dépistage est réalisé en immunoanalyse (IA). L'IA est le plus souvent réalisée sur des automates de biochimie, faciles d'utilisation, sensibles et permettant un résultat rapide. Cependant celui-ci se limite à quelques classes de médicaments (barbituriques, antidépresseurs tricycliques, opiacés) et de stupéfiants (cannabinoïdes, amphétamines, opiacés). En raison des réactions croisées (anticorps spécifiques de classes chimiques, ex : molécules tricycliques), les résultats positifs doivent être confirmés avec une méthode spécifique, le plus souvent en spectrométrie de masse. De nouveaux systèmes d'IA sont en train d'intégrer les laboratoires de toxicologie. Ceux-ci permettent la recherche d'un nombre plus important de classes et des catégories de molécules en accord avec l'évolution des molécules impliquées dans les intoxications, notamment les nouvelles substances psychoactives (81). Cependant l'utilisation de ce type d'appareil reste actuellement limitée à quelques laboratoires en France. Les analyses en IA permettent également la quantification de certaines molécules (acide acétylsalicylique, paracétamol, digoxine, phénobarbital, acide valproïque, méthotrexate). La spectrométrie de masse intervient dans un deuxième temps, en raison de l'absence de personnel formé en garde et du temps nécessaire à l'analyse. La chromatographie liquide et la chromatographie gazeuse couplées à la spectrométrie de masse (CL-SM, GC-SM) permettent de détecter et de quantifier la plupart des molécules d'intérêt en toxicologie, elles sont devenues des outils analytiques incontournables en toxicologie analytique. Cependant le développement de nouvelles méthodes ainsi que leur validation selon les normes actuelles demeurent fastidieux.

b. Exclusion d'une hypothèse toxique

Certains tableaux cliniques d'étiologie non toxiques sont très proches de toxidromes, les intoxications pouvant être responsables d'un nombre extrêmement varié de symptômes. Les analyses toxicologiques permettent d'écarter une cause toxique lors de la prise en charge d'un malade. Elles sont particulièrement d'intérêt dans le cadre médico-légal afin de déterminer la cause toxique ou non d'un décès. Un contexte particulier est la mort cérébrale, certaines molécules génèrent des électroencéphalogrammes plats, notamment les barbituriques, il est indispensable d'écarter la présence de barbiturique avant de déclarer le décès d'un patient en réanimation.

c. Evaluation de la gravité d'une intoxication

La plupart des médicaments et des produits stupéfiants présentent une concentration sanguine corrélée à l'effet pharmacologique. Dans ce contexte, le dosage de la molécule va permettre d'évaluer la gravité de l'intoxication. C'est le cas pour le lithium, l'acide acétylsalicylique, la digoxine, le paracétamol, la metformine et les cardiotropes pour ne citer que les plus fréquents. Cependant certaines molécules vont présenter une variabilité interindividuelle importante, rendant difficile une corrélation avec la gravité (ex : colchicine). Des facteurs de risques sont également à prendre en compte pour pondérer la gravité d'une intoxication, comme une intoxication aux β -bloquants chez un patient souffrant de bradycardie, ou à l'inverse une intoxication à la codéine chez un patient présentant un phénotype « métaboliseur lent » du CYP2D6. La quantification dans plusieurs matrices peut également permettre de mieux cerner le type d'intoxication. Par exemple la quantification du lithium dans les érythrocytes et dans le plasma permet de déterminer s'il s'agit d'une intoxication aiguë chez un patient naïf de tout traitement, ou s'il s'agit d'une intoxication aiguë chez un patient traité de façon chronique, beaucoup plus grave. La tolérance pharmacologique peut également être responsable d'une variabilité importante de la gravité d'une intoxication, notamment pour les opiacés. Ainsi, lors d'une recherche de cause de décès chez un patient, lorsqu'un opiacé est mis en évidence à une concentration létale il est indispensable de définir le statut naïf ou non de l'individu, ce qui est réalisable par analyse capillaire.

d. Surveillance de l'évolution d'une intoxication

Le dosage répété du toxique permet de suivre son élimination. A dose élevée, les voies d'élimination peuvent être saturées ou déficientes, comme c'est le cas pour la metformine ou la

digoxine chez le sujet insuffisant rénal. Après administration d'un antidote, les analyses peuvent permettre d'objectiver l'efficacité du traitement. C'est le cas après administration de carboxypeptidase G2 dans les intoxications au méthotrexate, celui-ci est rapidement dégradé, et on observe une baisse rapide et importante des concentrations en méthotrexate plasmatique. C'est également le cas après administration de Fab anti-digoxine, on observe une augmentation des concentrations plasmatiques reflétant une redistribution importante du compartiment tissulaire vers le compartiment sanguin.

4. Conclusion et perspectives pour la thèse

Les intoxications aiguës constituent un problème majeur de santé publique dans les pays développés et les pays en voie de développement. Cependant les agents en cause ainsi que les populations touchées diffèrent d'un pays à l'autre. Dans les pays développés, la première tranche d'âge touchée est les enfants de moins de 4 ans, les intoxications involontaires sont plus fréquentes, et les agents en cause sont principalement les médicaments. Dans les pays en voie de développement, les adultes sont les plus touchés, les intoxications sont majoritairement volontaires et les premiers agents en cause sont les pesticides. Il est intéressant de noter l'homogénéité des caractéristiques épidémiologiques au sein des différents pays européens ainsi que pour les Etats-Unis. Pour les pays en voie de développement, la couverture du territoire par les outils de surveillance épidémiologique n'est pas équivalente à celle des pays développés. Une partie importante des intoxications ne sont pas déclarées. La partie notifiée concerne les intoxications les plus graves, et il est décrit que les intoxications volontaires sont plus graves que celles accidentelles. Cela explique en partie les différences entre les deux types de pays étudiés. Les agents incriminés diffèrent également, cela dépend de leur accessibilité par les populations touchées, les médicaments pour les pays développés et les pesticides pour les pays en voie de développement. Selon une étude de l'OMS, en 2012 un suicide sur sept était le résultat d'une intoxication au pesticide (4).

Parmi les agents médicamenteux les plus fréquemment impliqués dans les intoxications (France, Etats-Unis) nous retrouvons le paracétamol, médicament de loin le plus prescrit en France. Toutefois en France en 2013, seules 5 intoxications fatales étaient attribuées au paracétamol. A l'inverse la colchicine est un médicament peu prescrit, dont l'indication principale est la crise de goutte, elle est également indiquée dans la maladie de Behçet, la maladie périodique et depuis 2015 la péricardite aiguë idiopathique. Elle était toutefois responsable de 4 décès en 2013, soit presque autant que le paracétamol. Pour le paracétamol, il

existe un antidote efficace, la N-acetylcystéine, permettant de prévenir l'hépatotoxicité lorsqu'il est administré précocement. A l'inverse il n'existe pas d'antidote pour la colchicine. Les intoxications graves sont difficiles à prendre en charge, elles ne répondent que rarement aux traitements symptomatiques et sont fatales dans 80% des cas. C'est dans ce contexte que nous avons décidé d'étudier un antidote de type Fab, permettant de prendre en charge les intoxications aiguës à la colchicine.

Le traitement des intoxications a beaucoup évolué au cours des dernières décennies, dans le sens d'une amélioration de la prise en charge des patients. Les défaillances d'organes peuvent transitoirement être suppléées par des systèmes d'assistance, notamment pour les organes vitaux (cœur et poumons) mais aussi ceux responsables de l'épuration des toxiques (rein et foie). Grâce à la compréhension des mécanismes d'action toxiques des agents en cause, un traitement symptomatique adapté peut être mis en place, et des traitements spécifiques ont été développés pour des classes pharmacologiques ou des molécules particulières. Ces approches couvrent la majorité des agents responsables d'intoxications en France. Cependant, parmi les médicaments responsables d'intoxications fatales nous retrouvons des cardiotropes, notamment les antagonistes calciques pour lesquels il n'existe pas de traitement spécifique. L'insuline euglycémique permet d'améliorer la prise en charge dans les formes peu graves, mais reste inefficace dans les intoxications sévères. Les antagonistes calciques (diltiazem, vérapamil et dihydropyridines) ont la particularité d'être fortement liés aux protéines plasmatiques, et ne sont pas épurables par hémoperfusion. Le système MARS a déjà été appliqué avec succès à la prise en charge de patients intoxiqués au diltiazem ou au vérapamil. Cependant aucune étude analytique visant à évaluer le rôle du système et de ses différentes composantes dans le traitement n'a été réalisée. C'est dans ce contexte que nous avons développé la deuxième partie de cette thèse sur l'évaluation de l'efficacité du système MARS dans l'épuration du vérapamil et du diltiazem dans un modèle *in vitro*.

DEUXIÈME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS

Première partie : Etude pré-clinique d'un antidote de type Fab anti-colchicine

HISTORIQUE ET RATIONNEL DE L'ÉTUDE

La colchicine est un alcaloïde extrait de la colchique (*Colchicum autumnale L.*), dont les vertus thérapeutiques dans la crise aiguë de goutte sont connues depuis le VI^{ème} siècle (Alexandre de Tralles) (82). Elle est aujourd'hui indiquée en aiguë dans la crise de goutte, et en chronique dans la péricardite idiopathique, la maladie de Behçet et la fièvre méditerranéenne familiale.

La colchicine se lie à la tubuline et bloque la polymérisation des microtubules. Les microtubules sont impliqués dans la division, la migration et la polarisation des cellules. La colchicine bloque des voies de signalisation en inhibant le déplacement de vésicules et la sécrétion de médiateurs (cytokines et chemokines) notamment au niveau des leucocytes (83). Ce sont les principaux mécanismes responsables de l'effet anti-inflammatoire de la colchicine.

Sur le plan pharmacocinétique, après administration par voie orale, l'absorption de la colchicine est rapide, la concentration maximale est atteinte en 30-90 min (84). La colchicine est lipophile, mais sa biodisponibilité demeure très variable allant de 24% à 88% (85). La présence de glycoprotéine-P à la face luminale des entérocytes et de CYP3A4 dans les entérocytes et au niveau hépatique explique en grande partie les différences interindividuelles. La demi-vie de distribution est de 1-2,7 heures, et le volume de distribution de 7-10 L/Kg (85). La demi-vie d'élimination est de 14 à 30 heures chez des volontaires sains (84). Selon les espèces 5% à 20% de la dose administrée est éliminée par voie rénale (86). La voie biliaire semble être la principale voie d'élimination de la colchicine, avec un rôle majeur de la glycoprotéine P, fortement exprimée au niveau des cellules biliaires.

La dose thérapeutique de colchicine est de 0,015 mg/Kg, elle est toxique à partir de 0,1 mg/Kg et létale dès 0,8 mg/Kg, c'est une molécule présentant une marge thérapeutique étroite (87). Les manifestations cliniques de l'intoxication aiguë à la colchicine peuvent être divisées en trois phases. La première dans les 24 heures suivant l'ingestion, dominée par les troubles digestifs avec des douleurs abdominales, vomissements et diarrhée. La deuxième phase dans les 24 à 72 heures où se manifestent les défaillances d'organe : insuffisance rénale, respiratoire, troubles du rythme cardiaque, insuffisance médullaire et troubles neuromusculaires. La troisième phase est caractérisée par la restauration de la fonction des différents organes, notamment médullaire avec une leucocytose, et l'apparition d'une alopecie.

La prise en charge des intoxications à la colchicine repose aujourd'hui sur un traitement symptomatique, et les intoxications sévères ($> 0,8$ mg/Kg) demeurent fatales dans 80% des cas (88). L'évolution des intoxications à la colchicine lors des 20 dernières années en France est représentée sur la figure 3 (les données ont été recueillies auprès des différents CAP français).

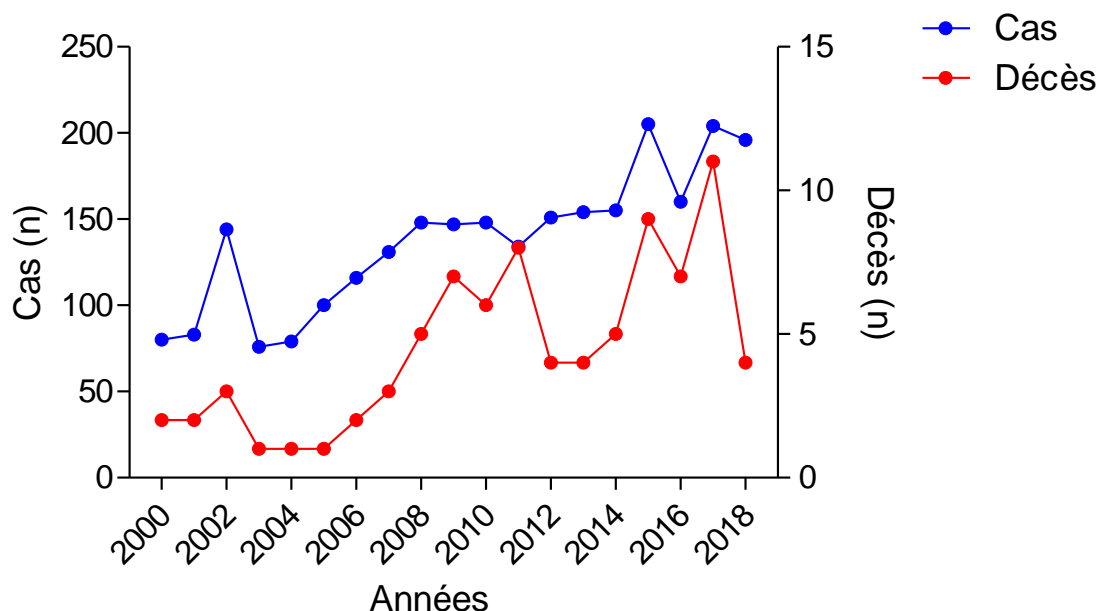


Figure 3. Evolution du nombre de cas de surdosage et de décès par intoxication à la colchicine en France.

Une approche pharmacodynamique pour l'élaboration d'un antidote n'est pas possible cette liaison n'activant ou ne bloquant aucune voie de signalisation, quelle que soit la molécule se fixant sur le site de liaison de la colchicine cela entrainera une inhibition de la polymérisation des dimères de tubuline par encombrement stérique du site permettant la liaison des dimères entre eux. La colchicine est très fortement distribuée et minoritairement éliminée par voie rénale (86). Cela rend inefficace l'hémodiafiltration et tous les systèmes d'épuration extra-rénale. Elle est métabolisée par les cytochromes, notamment le CYP3A4, mais l'induction enzymatique met une dizaine de jours à apparaître après exposition à un inducteur, et aucune étude n'a montré un bénéfice dans l'intoxication à la colchicine. La colchicine présente une affinité élevée pour la tubuline avec une constante de dissociation 10^{-6} à 10^{-7} à 37°C , et une demi-vie de dissociation de 20 à 30 heures (89). L'approche la plus rationnelle développée à ce jour a été le développement d'un anticorps de type FAB spécifique de la colchicine, et ayant une affinité pour la colchicine supérieure à celle de la colchicine pour la tubuline. Les fragments FAB

administrés par voie intraveineuses ne sont pas distribués (très faiblement dans les liquides interstitiels) et peuvent être filtrés par le glomérule rénal. Cela permet une redistribution de la colchicine du compartiment tissulaire vers le compartiment sanguin, puis une élimination des FAB liés à la colchicine par voie rénale. Cette approche a été développée par l'équipe du professeur Jean-Michel Scherrmann dans les années 1990. Après le développement d'une méthode permettant le dosage de la colchicine radio-immunoanalyse (90), ils ont évalué l'efficacité de l'antidote chez l'animal. Chez la souris, l'administration de fragments Fab permet la réversion d'une dose léthale (3,8 mg/Kg), 80% de survie (91). Chez le lapin, après l'antidote permet une redistribution importante de la colchicine du compartiment tissulaire vers le compartiment sanguin et une diminution de la toxicité (92). En 1995, une patiente ayant fait une tentative de suicide avec une prise de 60 mg de colchicine a été traitée par cet antidote, il a été administré 40 h après l'ingestion (93). Le traitement a permis la survie de la patiente. Malgré l'efficacité de l'antidote sa fabrication a par la suite été arrêtée en raison de la maladie de Creutzfeldt Jakob, car celui-ci était d'origine ovine. Ce n'est qu'en 2014 qu'un nouvel antidote a été développé par l'industrie Galloise Micropharm. Celui-ci présente une affinité pour la colchicine plus importante que le précédent Fab. Il a été étudié chez le rat et permet d'accroître l'élimination urinaire (94). Cependant le rat est un mauvais modèle animal pour étudier la toxicité de la colchicine, la dose léthale est >25 mg/Kg contre 0,8 mg/Kg chez l'homme. Dans cet étude nous avons choisi le cochon nain Göttingen qui est approuvé par l'industrie pharmaceutique pour les études précliniques de toxicologie (95).

Publication n°1

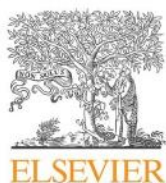
**LC–MS/MS quantification of free and Fab-bound colchicine in plasma,
urine and organs following colchicine administration and colchicine-specific
Fab fragments treatment in Göttingen minipigs.**

Nicolas Fabresse, Julien Allard, Marine Sardaby, Adrian Thompson, R.

Eddie Clutton, Michael Eddleston, Jean-Claude Alvarez.

Publié en 2017 dans Journal of Chromatography B,

Volume 1060 pages 400-406.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jchromb

LC–MS/MS quantification of free and Fab-bound colchicine in plasma, urine and organs following colchicine administration and colchicine-specific Fab fragments treatment in Göttingen minipigs



Nicolas Fabresse^{a,b}, Julien Allard^a, Marine Sardaby^a, Adrian Thompson^c, R. Eddie Clutton^d, Michael Eddleston^c, Jean-Claude Alvarez^{a,b,*}

^a MassSpecLab, Plateforme de Spectrométrie de Masse, Inserm U-1173, UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, Université Versailles Saint-Quentin, 2 Avenue de la Source de la Bièvre, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France

^b Laboratoire de Pharmacologie – Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire Raymond Poincaré, AP-HP, 104 Boulevard R. Poincaré, 92380 Garches, France

^c Pharmacology, Toxicology, & Therapeutics, University/BHF Centre for Cardiovascular Science, University of Edinburgh, Scotland, UK

^d Easter Bush Veterinary Centre, Royal (Dick) School of Veterinary Studies, The University of Edinburgh, Midlothian, UK

ARTICLE INFO

Keywords:

Colchicine

Toxicology

Mass spectrometry

Immunoglobulin Fab fragments

Antidote

ABSTRACT

Clinical evaluation of a colchicine specific antigen-binding fragment (Fab) in order to treat colchicine poisoning required the development of an accurate method allowing quantification of free and Fab-bound colchicine in plasma and urine, and free colchicine in tissues, to measure colchicine redistribution after Fab administration. Three methods have been developed for this purpose, and validated in plasma, urine and liver: total colchicine was determined after denaturation of Fab by dilution in water and heating; free colchicine was separated from Fab-bound colchicine by filtration with 30 kDa micro-filters; tissues were homogenized in a tissue mixer. Deuterated colchicine was used as internal standard. Samples were extracted by liquid–liquid extraction and analyzed with a LC–MS/MS. LOQ were 0.5 ng/mL in plasma and urine for free and total colchicine and 5 pg/mg in tissues. The methods were linear in the 0.5–100 ng/mL range in plasma and urine, and 5–300 pg/mg in tissues with determination coefficients > 0.99. Precision and accuracy of QC samples presented a CV < 9.4%. The methods require only 200 µL of sample and allow a high throughput due to short analytical run (2 min). These methods were successfully applied to a pig intoxicated with colchicine and treated with colchicine specific Fab fragments.

1. Introduction

Colchicine is a tricyclic alkaloid extracted from *Colchicum autumnale*, used since historic times for acute gout [1]. Nowadays, colchicine is indicated in gouty arthritis, Behçet disease [2] and Mediterranean fever [3]. Colchicine is a potent inhibitor of tubulin polymerization and microtubules genesis, blocking cell mitosis and neutrophil phagocytosis.

Colchicine presents a variable oral bioavailability ranging from 18 to 79% (mean 45%) among healthy volunteers and elderly people [4]. After oral administration of 1 mg of colchicine, plasma peak concentration is observed between 0.5 and 1.5 h [5]. Colchicine is well distributed in tissues, with a distribution half-life and volume respectively ranging from 0.9 to 1.4 h and 2.3 to 8.5 L/Kg [4]. Among healthy subjects, the terminal half-life varies from 23 to 41 h [4]. Less than 40%

of a labeled oral dose of colchicine is excreted in urine [6].

Colchicine therapeutic dose is 0.015 mg/Kg, it can be toxic from 0.1 mg/Kg and lethal at 0.8 mg/Kg, exhibiting a narrow therapeutic index [7]. Intoxications are rare, but they are associated with high mortality [8–16]. The course of colchicine toxicity can be divided in three phases [17,18]. The first occurs within the first 24 h after ingestion, with gastrointestinal symptomatology (mainly diarrhea). The second develops from 24 h to 72 h, and is manifested by multiorgan failure: disseminated intravascular coagulation (DIC), renal, liver, respiratory, bone marrow and cardiac failure. The third stage is characterized by organ recovery associated with a leukocytosis and alopecia. Currently, there is no treatment available for colchicine intoxication. Colchicine has been reported to be non-dialyzable due to a high distribution volume, and a low body clearance [19]. Colchicine presents a high dissociation constant (10^{-6} – 10^{-7} M at 37 °C) with

* Corresponding author at: Laboratoire de Pharmacologie – Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire Raymond Poincaré, AP-HP, 104, Boulevard R. Poincaré, 92380 Garches, France.

E-mail addresses: jean-claude.alvarez@aphp.fr, jean-claude.alvarez@rpc.aphp.fr (J.-C. Alvarez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.06.034>

Received 3 April 2017; Received in revised form 6 June 2017; Accepted 18 June 2017

Available online 20 June 2017

1570-0232/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

tubulin, with a dissociation half-life of the complex tubulin-colchicine ranging from 20 to 30 h [20]. This observation explains the long colchicine half-life (20–60 h) among intoxicated patients which is closely related to the complex dissociation [21,22]. Following these observations, an immunotoxotherapy was developed using colchicine specific fragment antigen-binding (Fab). This therapy was successfully applied in a murine model intoxicated with colchicine lethal doses [23]. In rabbits, after a non-lethal dose of colchicine, Fab alter colchicine disposition with an important redistribution from tissues to blood [24]. In 1995, a clinical case of colchicine intoxication was successfully treated with Fab [8]. Thereafter, in 1996, spongiform encephalopathy and mad cow disease have spread in Europe, and colchicine specific Fab production from ovine origin was stopped in France. Recently, a new colchicine specific Fab has been developed, with a high affinity for colchicine ($K_a = 10^{11} \text{ M}^{-1}$) [25].

The evaluation of treatment efficacy required a specific analytical method allowing free and Fab-bound colchicine to be distinguished following colchicine specific Fab treatment. A previous method was developed by radioimmunoassay (RIA) with colchicine specific antiserum, but RIA is used less today due to environmental and economic issues [26]. We present here two rapid and sensitive mass spectrometric methods able to assess free and total (free + Fab-bound) colchicine in plasma and urine, and a third assay in organs.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagents

The HPLC grade acetonitrile, MS grade water, isopropanol and hexane were provided by Merck (Darmstadt, Germany). Ammonium formate, formic acid and dichloromethane standards were supplied by Sigma Aldrich (Saint-Louis, USA). Colchicine was provided from LGC standards (Teddington, United Kingdom) and colchicine D-3 from Toronto Research Medical (Toronto, Canada). Potassium dihydrophosphate (KH_2PO_4) was purchased from VWR (Radnor, USA). Colchicine-specific Fab fragments were provided by Micropharm (Newcastle Emlyn, UK). Microcon centrifugal filters 30 KDa were purchased from Millipore (Merck, Darmstadt, Germany).

2.2. Standard and quality control solutions

Stock solutions of colchicine and colchicine D-3 (1 mg/mL) were prepared in methanol and stored for one year at -20°C . Standards solutions were wrapped in aluminium foil to prevent photodegradation of colchicine. Working solutions of colchicine for calibration standards (CS) were prepared at three concentrations (1, 0.1 and 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) by dilution in MS grade water of the stock solution. Working solution of colchicine for quality control (QC) was prepared from another 1 mg/mL stock solution. A working internal standard solution (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was prepared by dilution of colchicine D-3 stock solution with MS grade water.

2.3. LC-MS/MS

Colchicine concentrations were measured using an UPLC system (Dionex Ultimate 3000, Thermo, USA) coupled with a tandem mass spectrometer (TSQ Quantiva, Thermo, USA). Analyte separation was carried out on a Hypersil GOLD Thermo column ($100 \times 2.1 \text{ mm}$, $1.9 \mu\text{m}$) maintained at 30°C . The device was completed with a pre-column (Thermo Hypersil GOLD $10 \times 2.1 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$). Elution was in isocratic mode with a mobile phase composed by a mixture of 2 mM ammonium formate containing 0.1% formic acid and acetonitrile (40/60, v/v) pumped at 0.2 mL/min. A high rate of acetonitrile was necessary to achieve a short analytical run due to lipophilic properties of colchicine ($\text{LogP} = 1.8$ with a $\text{p}K_a = 1.85$). The total run time for the analysis was 2 min. Analysis was performed on a tandem mass

spectrometer (TSQ Quantiva, Thermo, USA) equipped with an electrospray ionization source set in positive mode. An ion-spray voltage of $+3.5 \text{ kV}$ was applied. The heated capillary temperature was set at 300°C . Nitrogen was employed as sheath and auxiliary gas at a pressure of 35 and 10 arbitrary units, respectively. The argon gas collision-induced dissociation was used with a pressure of 1.5 mTorr. Data were collected in selected reaction monitoring (SRM) mode. In order to determine the MS transitions, two solutions (analyte and IS) were infused into the mass spectrometer using a syringe pump. The most intense product ions resulting from these fragmentations were $m/z 400.2 \rightarrow m/z 295.1$ (used for quantification) and $\rightarrow m/z 310.1$ for colchicine and $m/z 403.25 \rightarrow m/z 295.1$ for colchicine D-3 at collision energy of 37 for all transitions.

2.4. Sample preparation

2.4.1. Total colchicine

Drug-free human plasma samples were obtained from Etablissement Français du Sang, (Le Chesnay, France). Urine samples were collected from member of the laboratory personnel. To 200 μL of plasma or urine, 10 μL of internal standard were added. The determination of the total colchicine concentration required the denaturation of the Fab fragments after incubation in 5 volumes of water for plasma and 2 volumes for urine at 100°C , during 1 h according to the method described by Smith et al. for digoxin specific antibodies [27]. Mixture was then extracted by 3 mL *n*-hexane:dichloromethane:isopropanol (300:150:15, v:v:v) after adding 100 μL of phosphate buffer 2 M ($\text{pH} = 8.4$, adjusted by addition of sodium hydroxide). Samples were mixed for 10 min and then centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The upper organic layer was decanted into another tube and evaporated to dryness under a nitrogen stream. Samples were reconstituted with 100 μL of mobile phase, vortex mixed for 10 s, and transferred into injection vials for analysis. In order to check the effectiveness of the method for degrading the Fab and releasing the colchicine, six plasma samples with 15 ng/mL of colchicine were spiked with an excess of Fab before heating.

2.4.2. Free colchicine

A 200 μL volume of plasma or urine was placed in a Microcon centrifugal filter 30 KDa and centrifuged for 20 min at 13000 rpm, 100 μL of the ultra filtrate were transferred into another tube and 10 μL of internal standard were added. Extraction was as described in section 2.4.1. In order to check the effectiveness of the method for separating Fab-bound and free colchicine, six plasma samples with 15 ng/mL of colchicine were spiked with an excess of Fab before filtration.

2.4.3. Organs

Drug-free human liver samples were provided from former forensic cases. Fifty to 150 mg of liver were weighted and diluted with 3 parts of desionized water (v/w). The mixture was then ground 1 h using a Tissue Lyser LT (Qiagen, Hilden, Germany) 50 oscillations per second after adding a steel ball. Then 100 μL of phosphate buffer 2 M ($\text{pH} = 8.4$), 10 μL of IS and 1 mL of dichloromethane were added to 20 μL of homogenates (corresponding to 5 mg of tissue) and mixed 15 min at 50 oscillations by second. After 10 min of centrifugation at 13000 rpm, the upper organic layer was decanted into another tube and evaporated to dryness under a nitrogen stream. Samples were reconstituted with 100 μL of mobile phase, vortex mixed for 10 s, and transferred into injection vials for analysis.

2.5. Method validation procedure

2.5.1. Linearity

Calibration curves included a blank sample, a zero sample, and seven CS over the concentration [0.5–100 ng/mL] range for plasma and urine, and [5–300 pg/mg] for liver. Calibration curves over a period of one month were taken into account for the determination of the best fit.

The best fit among linear and quadratic equations was determined using various weighting factors of the inverse concentration (e.g. $1/x$ and $1/x^2$). The equation showing the lowest and most constant percentage total bias from nominal CS values was considered as the best-fit model. The IS method was used for quantification: analytes/IS ratios were plotted against the spiked concentrations. Back-calculated concentrations of the CS had to be within 85–115% of the nominal concentrations.

2.5.2. Specificity, carry over

To investigate whether endogenous matrix constituents interfered with the assay, drug free matrix blank samples, zero samples and samples spiked at the LLOQ were analyzed according to the described procedure. Interferences with others drugs were investigated by analyzing a drug free matrix spiked with 1 $\mu\text{g/mL}$ of analgesic and non-steroidal anti-inflammatory drugs that could be used in acute gout treatment (acetaminophen, codeine, morphine, tramadol, salicylic acid, mefenamic acid, niflumic acid, nimesulide, ibuprofen, piroxicam, nabumetone, tiaprofenic acid, indomethacin, diclofenac, flurbiprofen, meloxicam, naproxen, sulindac, ketoprofen, rofecoxib, celecoxib). Assay specificity was defined by evidence of non-interference at retention times and ion channels identical to that of colchicine and IS in the blank samples. A blank sample was also analyzed immediately following the highest CS in each run to monitor the carry-over of analyte and IS.

2.5.3. Lower limit of quantification and detection

The LLOQ was defined as the lowest concentration for which an accuracy between 80% and 120% and a precision with a coefficient of variation of $\pm 20\%$ or less that was obtained over six measurements. A QC was prepared in plasma, urine and in liver at the LLOQ and analyzed as the others QC levels. The limit of detection (LOD) was determined by analyzing serial dilutions in mobile phase of the LLOQ until obtaining the last concentration value with a signal to noise ratio > 3 .

2.5.4. Accuracy and precision

Accuracy (measured value/nominal value) and precision (coefficient of variation) were determined for three QC levels (low, medium and high level) in each matrix. Each QC level was processed six times three different days over a period of one month. The values obtained were analyzed using analysis of variance (ANOVA), which separated the intra-day and inter-day standard deviation and consequently the corresponding coefficients of variation (CV). An accuracy within the range 85–115% of the nominal values and a precision with a CV of $\pm 15\%$ were required, except for the LLOQ.

2.5.5. Recovery and matrix effect

Three procedures (A–C) were performed on six different matrix sources for plasma, urine and liver at two concentrations (1.5–75 ng/mL for liquid matrices and 15–260 pg/mg for liver) in order to evaluate extraction yield and matrix effect (ME). (A) Analytes and the IS were spiked in the mobile phase and directly injected; (B) Analytes and the IS were spiked afterwards in extracted blank matrix samples and injected; and (C) Analytes and IS were spiked in plasma samples, the complete extraction procedure was carried through, and the samples were injected into the system. The mean chromatographic peaks obtained using the three procedures were compared. The ratios C/B, B/A determined the yield of extraction and the matrix effect, respectively.

2.5.6. Stability

Colchicine stability was investigated in plasma at four levels (QC levels and LOQ) after 24 h at $20 \pm 5^\circ\text{C}$, and after 24 h and 72 h at $5 \pm 3^\circ\text{C}$ ($n = 6$). Long term stability was evaluated through 1 and 3 months at the same temperatures. Stability after three freeze/thaw cycles was also tested at the three QC levels ($n = 3$). The stability of the

vial inside the autosampler (8°C) was evaluated over 24 h by reinjection of QC and LOQ samples. Samples were considered stable if colchicine variation was less than 15% from initial value.

2.6. Application

One Göttingen mini-pig, age one year, and obtained from the Ellegaard Göttingen Minipigs A/S (Dalmose, Denmark) was used for this pre-clinical study. The study was approved by the Edinburgh University's Ethical Review Committee and was licensed under the Animals (Scientific Procedures) Act 1986. The animal was weighed immediately before entering in the study (30 Kg). The animal was anesthetized before surgery, and remained anesthetized throughout the study under the care of the veterinary anesthetists. Central lines were inserted by "cut down" into the carotid artery and external jugular vein. Bladder catheterization was realized by mini laparotomy. Intra-venous fluids replacement with Hartmann's solution began at induction of anesthesia (10 mL/Kg over 30 min then 5 mL/Kg/hr). The flow rate was increased as required to support central venous pressure. Approximately 30 min before dosing, colchicine was dissolved in physiological saline to achieve selected dose (0.25 mg/Kg). Solution was administered intravenously over one hour. Three hours after the end of colchicine administration, the animal was treated with an equimolar dose of Fab administered over 1 h. Arterial blood samples were taken at -10 min pre-treatment and 1 h, 5 h and 48 h post-dosing. Plasma was separated by centrifugation at 4.000 rpm for 10 min and transferred to a -80°C freezer for subsequent storage within 48 h of sampling. Urine was collected pre-treatment and 3 h, 6 h and 48 h post-treatment and immediately frozen, urine volume being recorded. The animal was euthanized by IV overdose with pentobarbital at the end of the experiment (48 h). For post-mortem examination, heart, liver, one kidney and a sample of muscle and small intestine were removed from the animal and rinsed with saline. A sample was frozen at -80°C and stored for subsequent colchicine analysis.

3. Results

3.1. Validation

A chromatogram of a blank sample and plasma sample spiked with 0.5 ng/mL of colchicine (LOQ) are presented in Fig. 1. The retention times of colchicine and its IS was 1.55 min. No interference from constituents of drug-free human plasma and from all the others tested drugs at the retention times and the ion channels of colchicine and colchicine D-3 were observed. Mean carry-over was lower than 0.1% for colchicine and colchicine D-3.

The calibration curves exhibited good linearity in the concentration range 0.5–100 ng/mL for plasma and urine, and 5–300 pg/mg for liver with $1/x$ weighting factor. Mean slopes, intercepts and determination coefficients are reported in Table 1. Coefficient of variation (CV) and bias for the back-calculated concentrations of the calibration standards were all $< 15\%$ and within 85–115% of the nominal concentrations, respectively (Table 1).

Matrix effect and extraction recovery for plasma and liver are presented in Table 2.

LOQ and LOD were 0.5 ng/mL and 0.3 ng/mL for plasma and urine respectively, and 5 pg/mg and 3 pg/mg for liver, respectively. Intra-day, inter-day CV and bias for LOQ and QC samples were lower than 15%. Inter-day CV and bias are presented in Table 3.

Plasma levels of colchicine were stable under the different tested conditions exhibiting a variation lower than 15%.

No free colchicine was found in plasma samples spiked with 15 ng/mL of colchicine and an excess of Fab before filtration. Conversely, the 15 ng/mL of colchicine were recovered following heating procedure, with a CV and a bias $< 15\%$.

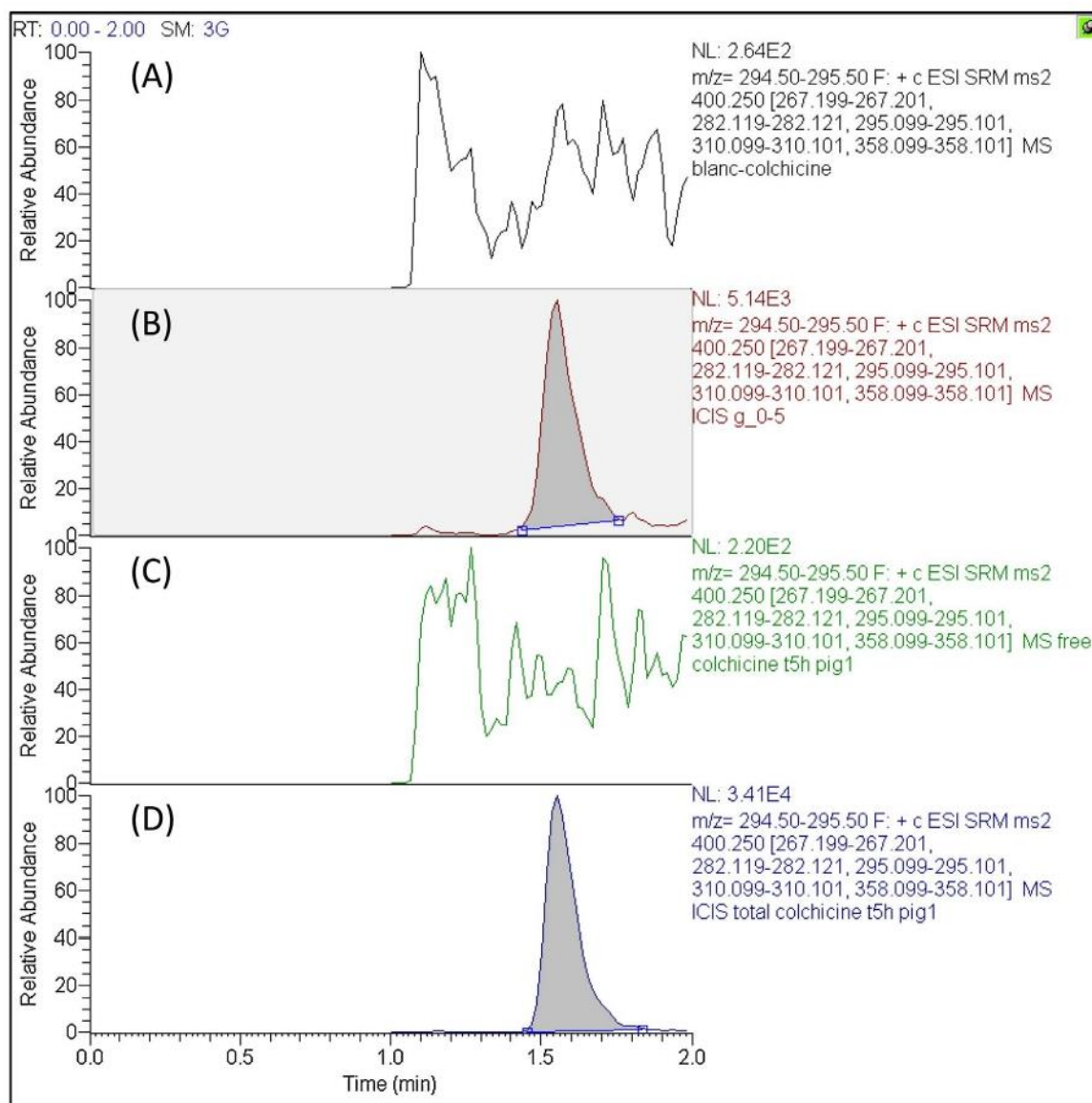


Fig. 1. Colchicine ion chromatogram of a plasma blank sample (A); plasma sample spiked with colchicine at a concentration of 0.5 ng/mL (B); a real plasma sample (T5 h after Fab infusion) with free colchicine < 0.5 ng/mL (C) and total colchicine at 110 ng/mL (D).

3.2. Application

Total and free colchicine obtained in plasma and urine are presented in Table 4. Post-mortem colchicine levels measured in organs are presented in Table 5.

4. Discussion

4.1. Validation

Colchicine assay using LC–MS/MS after Fab administration required

a separation of free and Fab-bound colchicine, allowing an accurate estimation of colchicine redistribution from tissue to blood. To our knowledge, only one method devoted to measure free and total colchicine has been published [24]. Sabouraud et al. developed a radio immunoassay (RIA) with colchicine-specific antibodies; separation of both free and Fab-bound colchicine was realized using the method described for digoxin and digitoxin by Smith et al. [26,27]. Separation was carried out by equilibrium dialysis overnight for free colchicine. Total colchicine was estimated after Fab denaturation by dilution of plasma in 5 volumes and urine in 2 volumes of water heated to 100 °C for 1 h. These authors estimated that 90–94% of bound-colchicine was

Table 1
Mean slope, intercept, determination coefficient and calibration standard (CS) range (minimum and maximum), CV and bias for the different methods.

	Slope \pm SD	Intercept \pm SD	$R^2 \pm$ SD	CS CV (min;max,%)	CS bias (min;max,%)
Plasma free colchicine (n = 4)	0.167 \pm 0.101	0.080 \pm 0.123	0.9992 \pm 0.0004	1.53;8.47	–0.37;–10.2
Plasma total colchicine (n = 4)	0.276 \pm 0.022	0.009 \pm 0.031	0.9983 \pm 0.0011	2.24;11.67	–1.15;3.33
Urine free colchicine (n = 4)	0.180 \pm 0.023	0.014 \pm 0.029	0.9975 \pm 0.0007	1.15;4.72	–3.39;–11.67
Urine total colchicine (n = 4)	0.365 \pm 0.064	–0.001 \pm 0.053	0.9986 \pm 0.0006	3.14;10.5	0.15;–6.00
Liver (n = 5)	0.031 \pm 0.001	0.100 \pm 0.054	0.9993 \pm 0.0002	0.62;7.15	0.48;–7.19

Table 2
Mean matrix effect \pm coefficient of variation (%) and extraction recovery in plasma and liver.

		1.5 ng/mL	75 ng/mL
Plasma free colchicine	Matrix effect	85 \pm 10%	73 \pm 3%
	Extraction yield	94 \pm 14%	91 \pm 3%
Plasma total colchicine	Matrix effect	84 \pm 13%	72 \pm 9%
	Extraction yield	33 \pm 6%	31 \pm 9%
Urine free colchicine	Matrix effect	86 \pm 7%	98 \pm 10%
	Extraction yield	90 \pm 6%	78 \pm 4%
Urine total colchicine	Matrix effect	67 \pm 4%	97 \pm 10%
	Extraction yield	65 \pm 8%	69 \pm 12%
		15 pg/mg	260 pg/mg
Liver	Matrix effect	90 \pm 4%	99 \pm 9%
	Extraction yield	58 \pm 4%	73 \pm 5%

Table 3
Intra-day and inter-day coefficient of variation and mean bias observed for the limit of quantification (n = 6) and quality controls (n = 6).

QC		0.5 ng/mL		1.5 ng/mL		15 ng/mL		75 ng/mL	
		CV (%)	Bias (%)	CV (%)	Bias (%)	CV (%)	Bias (%)	CV (%)	Bias (%)
Plasma free colchicine	Intra-day	5.4	−10.1	4.6	6.4	3.7	9.7	2.5	1.8
	Inter-day	14.1	−4.8	8.8	3.0	5.5	6.3	5.7	5.2
Plasma total colchicine	Intra-day	4.2	3.5	3.7	−10.2	5.1	−6.3	4.2	−7.6
	Inter-day	6.4	−5.5	4.7	−6.1	4.3	−6.7	3.2	−2.2
Urine free colchicine	Intra-day	8.6	−0.6	8.5	3.1	4.5	6.1	3.3	4.1
	Inter-day	1.4	−5.6	9.4	−2.6	4.4	3.9	4.4	4.2
Urine total colchicine	Intra-day	8.1	1.3	2.0	−3.0	3.9	4.6	3.7	−4.6
	Inter-day	10.0	5.0	6.2	−2.9	3.5	6.0	7.0	3.9
		5 pg/mg		15 pg/mg		90 pg/mg		260 pg/mg	
Liver	Intra-day	5.2	−4.1	4.8	1.2	1.4	1.5	0.6	0.8
	Inter-day	2.4	−3.5	5.0	1.6	2.3	0.4	3.0	−0.6

transformed in free colchicine with their method. Today, due to environmental and safety issues, RIA assays in clinical laboratories are restricted, requiring the development of a novel method. Recently, a LC–MS/MS method was developed by Peake et al. for the determination of total colchicine in plasma and urine following Fab administration in rats [28]. However, the authors gave no information regarding the LOQ, and colchicine recovery following Fab lysis. We presented here a simple method, requiring a shorter preparation step for free colchicine thanks to microfiltration. The weight of Fab fragments is close to

50 kDa, Fab-bound colchicine was separated with 30 kDa filter after centrifugation, allowing free colchicine (399 Da) to pass. Due to the loss of sample during this step, a larger volume than required (200 μ L) was filtered, and the analysis was done using 100 μ L of filtrate. Internal standard was necessarily added after filtration to avoid deuterated colchicine fixation to Fab.

Fab lysis was carried out using the method of Smith et al. with a good recovery since colchicine is not thermolabile [27]. When the analysis was done without heating, in the presence of Fab, we observed

Table 4
Total and free colchicine levels (ng/mL) in plasma and urine measured during the experiment.

Time post colchicine-infusion		T0h	T1h	T5h	T48h
Plasma (ng/mL)	Free colchicine	< 0.5	190	< 0.5	1.6
	Total colchicine	< 0.5	181	110	19
Time post colchicine-infusion		T0h	T3h	T6h	T48h
Urine (ng/mL)	Free colchicine	< 0.5	6255	< 0.5	130
	Total colchicine	< 0.5	6835	1965	208

Table 5
Post-mortem colchicine levels found in organs.

	Colchicine (pg/mg)
Heart	78
Liver	73
Lung	75
Muscle	90
Small intestine	114

a total disappearance of deuterated colchicine and a loss of non-deuterated colchicine due to Fab fixation. Consequently, Fab lysis and colchicine release was assessed by deuterated colchicine recovery and by recovering the total colchicine of a spiked plasma with 15 ng/mL and an excess of Fab, showing that our lysis was complete and better than that obtained in the Sabouraud study (24). Despite a low sample volume (200 μ L) and a high sensitivity required (therapeutic plasma concentrations: 0.3–2.4 ng/mL), the LOQ of our method was 0.5 ng/mL with a LOD at 0.3 ng/mL [29]. For plasma dilution in 5 volumes of water compared to filtration, extraction recovery fell from 73–85% to 31–33% respectively. This observation is partially explained by an identical volume of solvent used for LLE despite a larger sample volume. In the same way, urine dilution in 2 vols of water compared to filtration induces a decrease in extraction recovery from 78–90% to 65–69% respectively. However, this methodology was conserved for the validation since the LOQ was still acceptable despite this poor recovery. Three compositions of organic solvent were tested for LLE. Hexane (H), dichloromethane (D) and hexane:dichloromethane:isopropanol (300:150:15, v:v:v) (HDI) [30]. H presented a low colchicine recovery. D and HDI presented equivalent recoveries, but a higher matrix effect was observed in plasma with D. HDI was chosen for plasma and urine LLE.

Few methods are described in literature for colchicine tissue analysis. A first procedure was developed for post-mortem organs by Rochdi et al. using RIA [22]. Later, Kintz et al. presented a novel method developed with HPLC/UV with a sensitivity similar to our (LOQ = 5 pg/mg) [15]. However, this procedure required a large sample (0.75 g), a high volume of organic solvent (10 mL dichloromethane) and a longer analytical run (7.6 min). Recently, Peake et al. designed a study to evaluate colchicine specific Fab efficacy in a murine model of colchicine intoxication, with a LC–MS/MS procedure for colchicine measurements in plasma, urine and organs [28]. In this paper, samples homogenates were diluted in methanol (1 part of sample plus 3 parts methanol) and directly injected in the system, but few information are given regarding the validation criteria of the method (limit of quantification, matrix effect, colchicine recovery). The procedure presented here required a low volume of sample (20 μ L of organ homogenates corresponding to 5 mg of tissue), a low volume of organic solvent (1 mL of dichloromethane) and a short analytical run (2 min) with a good sensitivity. For the LLE in liver, contrary to plasma, a lower matrix effect was observed with D rather than HDI with equivalent recoveries, so D was chosen for liver extraction. LLE was initially performed by simple turning of the tube of homogenates leading to a low extraction yield. A dynamic extraction using the same procedure as liver homogenates production was then tested (50 oscillations by second after adding a steel ball) allowing achievement of an acceptable recovery (58–73%).

4.2. Application

The method was successfully applied to an animal intoxicated with colchicine and treated with a colchicine specific Fab. Concentrations observed for total colchicine were over our LOQ throughout the experiment after colchicine administration. Before Fab administration but after colchicine administration (T1 h), free and total colchicine levels

were similar both in plasma and urine, all the circulating colchicine being free. After Fab administration (T5 h), colchicine was completely bound to Fab, free colchicine being under our LOQ both in plasma and in urine, showing the efficacy of the Fab to bind colchicine and that colchicine is also in the Fab-bound form in urine. After 48 h, colchicine is present in both forms (free and Fab-bound) in particular in urine probably because of the Fab metabolism which alter Fab affinity for colchicine, as previously shown for digoxin-specific Fab [31]. Post-mortem organ analyses found similar concentrations between organs, ranging from 73 to 114 pg/mg. Interpretation remains difficult since there is no data for colchicine levels in organs among pigs. Nevertheless, these data appeared low but probably because elimination of colchicine was already significant at 48 h as shown by low concentrations in plasma and urine at that time.

5. Conclusion

Two LC–MS/MS methods have been developed for the determination of free and Fab-bound colchicine in pig plasma and urine, and validated in both matrices. The methods require only 200 μ L of sample, and allow a high throughput due to a short analytical run (2 min). A third method was developed for tissue analysis and validated in liver. All methods were successfully applied in real samples. This method will allow the pharmacokinetics/pharmacodynamics relationship studies on the efficacy of the Fab fragments in colchicine poisoning.

Funding

Animal experiment was funded by Micropharm Ltd.

Acknowledgements

Rachel Gregson and David Binnie for their assistance with animal experiment.

References

- [1] W.N. Roberts, M.H. Liang, S.H. Stern, Colchicine in acute gout. Reassessment of risks and benefits, *JAMA* 257 (1987) 1920–1922.
- [2] C. Evereklioglu, Current concepts in the etiology and treatment of Behçet disease, *Surv. Ophthalmol.* 50 (2005) 297–350.
- [3] M. Medlej-Hashim, J. Loiselet, G. Lefranc, A. Mègarbané, Familial mediterranean fever (FMF): from diagnosis to treatment, *Sante Montrouge Fr.* 14 (2004) 261–266.
- [4] M. Rochdi, A. Sabouraud, C. Girre, R. Venet, J.M. Scherrmann, Pharmacokinetics and absolute bioavailability of colchicine after i.v. and oral administration in healthy human volunteers and elderly subjects, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 46 (1994) 351–354.
- [5] S.L. Wallace, B. Omokoku, N.H. Ertel, Colchicine plasma levels. Implications as to pharmacology and mechanism of action, *Am. J. Med.* 48 (1970) 443–448.
- [6] E.J. Walaszek, J.J. Kocsis, G. Leroy, E.M.K. Geiling, Studies on the excretion of radioactive colchicine, *Arch. Int. Pharm.* 125 (1960) 371–392.
- [7] E. Niel, J.-M. Scherrmann, Rapid and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the quantitation of colchicine in human plasma, *Rev. Rhum.* 73 (2006) 1338–1345.
- [8] F.J. Baud, A. Sabouraud, E. Vicaut, P. Taboulet, J. Lang, C. Bismuth, J.M. Rouzioux, J.-M. Scherrmann, Treatment of severe colchicine overdose with colchicine-specific Fab fragments, *N. Engl. J. Med.* 332 (1995) 642–645.
- [9] H. Wollersen, F. Erdmann, M. Risse, R. Dettmeyer, Accidental fatal ingestion of colchicine-containing leaves—toxicological and histological findings, *Leg. Med. Tokyo Jpn.* 11 (Suppl. 1) (2009) S498–S499.
- [10] A. Aghabiklooei, N. Zamani, H. Hassanian-Moghaddam, S. Nasouhi, M. Mashayekhi, Acute colchicine overdose: report of three cases, *Reumatismo* 65 (2014) 307–311.
- [11] M. Amrollahi-Sharifabadi, A. Seghatoleslami, M. Amrollahi-Sharifabadi, F. Bayani, M. Mirjalili, Fatal colchicine poisoning by accidental ingestion of Colchicum persicum: a case report, *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 34 (2013) 295–298.
- [12] P. Kintz, C. Jamey, L. Martille, J.-S. Raul, Colchicine poisoning in a pediatric population: about one accidental case and literature review, *Toxicologie analytique et clinique* 28 (2016) 79–84.
- [13] Y.P.R. Babu, S. Manjunath, S.M. Bakkannavar, J. Acharya, G.N.P. Kumar, Colchicine poisoning: a case report and review of literature, *Med. Sci. Law* 52 (2012) 205–206.
- [14] S. Bodeau, Y. Bennis, E. Abe, M.-C. Quinton, M. Andréjak, G. Bricca, J.-C. Alvarez, A.-S. Lemaire-Hurtel, Colchicine: an unusual but potential life threatening

- poisoning – about 3 cases, *Toxicologie analytique et clinique* 28 (2016) 32–37.
- [15] P. Kintz, C. Jamey, A. Tracqui, P. Mangin, Colchicine poisoning: report of a fatal case and presentation of an HPLC procedure for body fluid and tissue analyses, *J. Anal. Toxicol.* 21 (1997) 70–72.
- [16] E. Abe, A.-S. Lemaire-Hurtel, C. Duverneuill, I. Etting, E. Guillot, P. de Mazancourt, J.-C. Alvarez, A novel LC-ESI-MS-MS method for sensitive quantification of colchicine in human plasma: application to two case reports, *J. Anal. Toxicol.* 30 (2006) 210–215.
- [17] A. Folpini, P. Furfori, Colchicine toxicity—clinical features and treatment. Massive overdose case report, *J. Toxicol. Clin Toxicol.* 33 (1995) 71–77.
- [18] M. Maurizi, N. Delorme, M.C. Laprèvote-Heully, H. Lambert, A. Larcen, Acute respiratory distress syndrome in adults in colchicine poisoning, *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 5 (1986) 530–532.
- [19] E. Ben-Chetrit, R. Backenroth, M. Levy, Colchicine clearance by high-flux polysulfone dialyzers, *Arthritis Rheum.* 41 (1998) 749–750.
- [20] R. Luduena, Biochemistry of tubulin, in: K. Robert, J.S. Hyams (Eds.), *Microtubules*, Academic press, New York, 1979, pp. 65–93.
- [21] G.M. Ferron, M. Rochdi, W.J. Jusko, J.M. Scherrmann, Oral absorption characteristics and pharmacokinetics of colchicine in healthy volunteers after single and multiple doses, *J. Clin. Pharmacol.* 36 (1996) 874–883.
- [22] M. Rochdi, A. Sabouraud, F.J. Baud, C. Bismuth, J.M. Scherrmann, Toxicokinetics of colchicine in humans: analysis of tissue, plasma and urine data in ten cases, *Hum. Exp. Toxicol.* 11 (1992) 510–516.
- [23] A. Sabouraud, M. Urtizberea, M. Grandgeorge, P. Gattel, M.E. Makula, J.M. Scherrmann, Dose-dependent reversal of acute murine colchicine poisoning by goat colchicine-specific Fab fragments, *Toxicology* 68 (1991) 121–132.
- [24] A.E. Sabouraud, M. Urtizberea, N.J. Cano, M. Grandgeorge, J.M. Rouzioux, J.M. Scherrmann, Colchicine-specific Fab fragments alter colchicine disposition in rabbits, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260 (1992) 1214–1219.
- [25] B. Gumm, J. Wilkinson, M. Aldridge, J. Landon, I. Al-Abdulla, Cell-based cytotoxicity and immunocytotoxicity assays for Colchicine and Ovine anti-Colchicine sera and Fab fragments, *J. Clin. Toxicol.* 6 (2016).
- [26] J.M. Scherrmann, L. Boudet, R. Pontikis, H.N. Nguyen, E. Fournier, A sensitive radioimmunoassay for colchicine, *J. Pharm. Pharmacol.* 32 (1980) 800–802.
- [27] T.W. Smith, E. Haber, L. Yeatman, V.P. Butler, Reversal of advanced digoxin intoxication with Fab fragments of digoxin-specific antibodies, *N. Engl. J. Med.* 294 (1976) 797–800.
- [28] P.W. Peake, T.J. Pianta, L. Succar, M. Fernando, N.A. Buckley, Z.H. Endre, Fab fragments of ovine antibody to colchicine enhance its clearance in the rat, *Clin. Toxicol. Phila. Pa.* 53 (2015) 427–432.
- [29] H. Halkin, S. Dany, M. Greenwald, Y. Shnaps, M. Tirosh, Colchicine kinetics in patients with familial Mediterranean fever, *Clin. Pharmacol. Ther.* 28 (1980) 82–87.
- [30] Y. Jiang, J. Wang, Y. Wang, H. Li, J.P. Fawcett, J. Gu, Rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitation of colchicine in human plasma, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 850 (2007) 564–568.
- [31] T.W. Smith, B.L. Lloyd, N. Spicer, E. Haber, Immunogenicity and kinetics of distribution and elimination of sheep digoxin-specific IgG and Fab fragments in the rabbit and baboon, *Clin. Exp. Immunol.* 36 (1979) 384–396.

Publication n°2

Anti-colchicine Fab fragments prevent lethal colchicine toxicity in a porcine model: a pharmacokinetic and clinical study.

Eddleston M, Fabresse N, Thompson A, Al Abdulla I, Gregson R, King T,
Astier A, Baud FJ, Clutton RE, Alvarez JC.

Publié en 2018 dans *Clinical Toxicology*,

Volume 56 pages 773-781.

Anti-colchicine Fab fragments prevent lethal colchicine toxicity in a porcine model: a pharmacokinetic and clinical study

Michael Eddleston^{a,b} , Nicolas Fabresse^c, Adrian Thompson^{a,b}, Ibrahim Al Abdulla^d, Rachael Gregson^b, Tim King^b, Alain Astier^e, FREDERIC J. Baud^f, R Eddie Clutton^b and Jean-Claude Alvarez^c

^aPharmacology, Toxicology, and Therapeutics, University/BHF Centre for Cardiovascular Science, University of Edinburgh, Edinburgh, UK; ^bWellcome Trust Critical Care for Large Animals, Royal (Dick) School of Veterinary Studies and the Roslin Institute, University of Edinburgh, Edinburgh, UK; ^cLaboratoire de Pharmacologie – Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire Raymond Poincaré, AP-HP et MassSpecLab, Plateforme de Spectrométrie de Masse, Inserm U-1173, UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, Université Versailles Saint-Quentin, Garches, France; ^dMicropharm Ltd, Newcastle Emlyn, UK; ^eSchool of Medicine Paris 12, Paris, France; ^fUniversity Paris Diderot, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Paris, France

ABSTRACT

Background: Colchicine poisoning is commonly lethal. Colchicine-specific Fab fragments increase rat urinary colchicine clearance and have been associated with a good outcome in one patient. We aimed to develop a porcine model of colchicine toxicity to study the pharmacokinetics and efficacy of ovine Fab.

Methods: A Göttingen minipig critical care model was established and serial blood samples taken for colchicine and Fab pharmacokinetics, clinical chemistry, and haematology. Animals were euthanised when the mean arterial pressure fell below 45 mmHg without response to vasopressor, or at study completion.

Results: Initial studies indicated that oral dosing produced variable pharmacokinetics and time-to-euthanasia. By contrast, intravenous infusion of 0.25 mg/kg colchicine over 1 h produced reproducible pharmacokinetics (AUC_{0-20} 343 [SD = 21] $\mu\text{g/L/h}$), acute multi-organ injury, and cardiotoxicity requiring euthanasia a mean of 22.5 (SD = 3.2) h after dosing. A full-neutralising equimolar Fab dose given 6 h after the infusion (50% first hour, 50% next 6 h [to reduce renal-loss of unbound Fab]) produced a 7.35-fold increase in plasma colchicine (AUC_{0-20} 2,522 [SD = 14] $\mu\text{g/L/h}$), and removed all free plasma colchicine, but did not prevent toxicity (euthanasia at 29.1 [SD = 3.4] h). Earlier administration over 1 h of the full-neutralising dose, 1 or 3 h after the colchicine, produced a 12.9-fold (AUC_{0-20} 4,433 [SD = 607] $\mu\text{g/L/h}$) and 6.0-fold (AUC_{0-20} 2,047 [SD = 51] $\mu\text{g/L/h}$) increase in plasma colchicine, respectively, absence of free plasma colchicine until 20 h, and survival to study end without marked cardiotoxicity.

Conclusions: Colchicine-specific Fab given early, in equimolar dose, bound colchicine, eliciting its movement into the blood, and preventing severe toxicity. Clinical studies are now needed to determine how soon this antidote must be given to work in human poisoning.

ARTICLE HISTORY

Received 20 November 2017
Revised 18 December 2017
Accepted 21 December 2017
Published online 13 January 2018

KEYWORDS

Colchicine; fab fragments; antidote


Introduction

Colchicine is used for the treatment of gout, familial Mediterranean fever, pericarditis, Behçet's disease and increasingly for ischaemic heart disease [1–4]. It inhibits microtubule polymerization by binding to tubulin, preventing mitosis, and inhibiting neutrophil function. It has a narrow therapeutic index, resulting in severe toxicity after overdose, especially after intravenous (IV) administration or intentional poisoning [5–9]. Poisoning results in initial gastrointestinal effects that last for around 24 h and may be followed by multi-organ dysfunction or death from cardiogenic shock, usually within 48–96 h [8].

There is no licensed therapy, with current care revolving around supportive intensive care. Fab fragments [10] against colchicine were raised experimentally in the 1980–90s in

France [10,11] and used on a compassionate basis in at least one patient [12]. They are now being produced commercially in sheep and have been tested in a rodent model, showing increased elimination of colchicine [13]. Ovine colchicine Fab fragments have not yet been studied in humans. Before this can happen, a pre-clinical model of colchicine poisoning similar to human poisoning is needed in which anti-colchicine Fab can be tested, to explore efficacious dosing and timing.

Pigs have been identified as good models for toxicology studies, offering similarities with human toxicity [14–16]. However, no pig model has been established for colchicine poisoning and the toxic dose is not known. Reviewing colchicine toxicity in humans, Harris and Gillett concluded that survival was typical with doses of <0.5 mg/kg while death was almost inevitable with doses >0.8 mg/kg, although acknowledging multiple reports of fatalities after exposure

CONTACT Michael Eddleston  m.eddleston@ed.ac.uk  QMRI E3.22, 47 Little France Crescent, Edinburgh EH16 4TJ, UK

*These authors contributed equally to this work.

© 2018 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

to <0.5 mg/kg [6]. Rats probably do not offer an appropriate model for human toxicity because they are highly resistant to colchicine poisoning with an $LD_{50} > 25$ mg/kg following oral dosing [17].

We therefore established a model of acute colchicine poisoning in Gottingen minipigs, initially testing oral then IV administration. This model showed that early administration of colchicine Fab produced effective redistribution of colchicine from tissues into the vascular space and prevented lethal colchicine toxicity. A clinical study is now required in human patients to assess the appropriate dose and maximum interval to effective therapy.

Methods

Animals and ethics

Experiments involved male Gottingen minipigs (Ellegaard Minipigs ApS, Dalmose, DK) with mean body mass 30.4 (SD 3.1) kg, $n = 14$. Animals were barrier bred, shown to be free of infection before shipment, and treated in accordance with the Animals (Scientific Procedures) Act of 1986. This study was performed under Home Office Licence after institutional ethics review.

Colchicine and anti-colchicine fab fragments

Colchicine (Abcam, Cambridge, UK) solutions were made up in sterile water for injection at 1.0 mg/mL and filter sterilised using a 0.2- μ m in-line filter. Colchicine containers were wrapped in metal foil and stored in the dark to prevent photodegradation. Solutions were diluted to 0.5 and 0.0625 mg/mL for oral and IV administration, respectively, and injected volumes adjusted to give the required dose (mL/kg) based on the animal's body mass on the study day. The dose varied from 0.25 to 1.0 mg/kg. Oral doses were given via nasogastric tube by bolus push using a 60-mL catheter tip syringe; IV doses were infused over 1 h.

Anti-colchicine Fab (ColchiBIND) was supplied as a solution in 10 mL ampoules by Micropharm Ltd, with each containing sufficient Fab to neutralise approximately 0.2 mg colchicine. The average affinity constant (K_a) of the ovine Fab was $3.16 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ (Micropharm Ltd, Unpublished). The Fab volume administered was varied according to the pig's body mass on the study day. The ColchiBIND solution was drawn up into 50 mL syringes fitted with a 0.2- μ m in-line filter immediately before infusion.

Study design

Drug-naive animals were kept in pens and acclimatised under the care of institutional veterinary surgeons before the study. Animals were fed a standard diet but fasted overnight preceding the study; water was available freely. Animals were weighed on the morning of the study.

The experiment was conducted in two phases, with the first phase being used to identify a toxic lethal dose with survival lasting greater than 24 h and death from apparent

cardiotoxicity. Based on the proposed human lethal dose of colchicine being between 0.5 and 1.0 mg/kg, we used two single doses of oral colchicine (0.5 or 1.0 mg/kg). The second phase was used to study the pharmacokinetic (PK) and clinical effects of anti-colchicine Fab on lethal colchicine toxicity, using 1 of 2 single doses of intravenous colchicine (0.25 or 1.0 mg/kg). We included the lower dose in case intravenous colchicine was more toxic than orally administered colchicine. Once the model was established, pharmacokinetic (PK) and clinical effects of therapeutic administration of ovine colchicine Fab fragments were evaluated at various times and infusion durations after administration of a toxic intravenous dose of colchicine.

To reduce bias, animals were allocated to treatment groups using a random number list; allocation could not be predicted before randomization. No data were available for calculating group sizes in this model; however, the use of anti-colchicine Fab at different times post poisoning offered a temporal basis for testing clinical efficacy as well as assessing the PK.

Anaesthesia and instrumentation

Studies began each day at around 07:30. Studies using oral administration were planned to last up to 60 h; after the switch to IV colchicine, the studies lasted for up to 48 h. The methods of anaesthesia induction, central vascular access, and instrumentation together with continual cardiovascular and respiratory monitoring of animals have been described previously [18].

Experimental protocol

After a 30-min stabilization period for the pigs after instrumentation, colchicine solution was given by oral bolus dose via NG tube (0.5 and 1.0 mg/kg) or by IV infusion over 1 h via a central venous line (0.25 or 1.0 mg/kg). The volume of colchicine solution varied according to the pig's body mass. Animals received an infusion of 5 mL/kg/h 0.9% sodium chloride during the study, increased as clinically required. Norepinephrine (4 mg/100 mL solution) was given IV if the mean arterial pressure (MAP) fell below 45 mmHg and did not respond to fluid resuscitation.

In the Fab fragment studies, to fully neutralise the 0.25 mg/kg colchicine challenge, 12.5 mL/kg (e.g. 375 mL for a 30 kg animal) of Fab fragments were administered. The single clinical case in the literature reported cardiovascular improvement and impressive PK response (marked redistribution of colchicine into the blood) to Fab given 40 h after exposure [12]. Being conservative, but wishing to select a clinically relevant time point for administration, we first chose to give Fab 7 h after the start (and 6 h after the end) of the colchicine infusion. The dose was split into two, with one half given over 1 h followed by the second half over 6 h, to reduce wastage in the urine of free Fab, unbound to colchicine (as done for digoxin specific Fab) [19,20]. Since this proved ineffective, in further studies, to increase the likelihood of success, the full neutralising dose was given earlier and administered over 1 h.

Sampling. Arterial blood samples were taken for pharmacokinetic analysis at -30 and -10 min prior to colchicine, at 5, 10, 15, 30, 45, 60 and 90 min post dosing, and then at 2, 4, and 4 h intervals until 24 h, and 8 hourly thereafter until the animal's euthanasia. The sample was transferred to an EDTA-containing tube, centrifuged for 7 min at 3900 rpm, and the plasma stored frozen at -20°C until analysis.

Arterial blood gasses and clinical chemistry were monitored on an EPOC blood analyser (Woodley Equipment Company Ltd, UK) pre-treatment and at 30, 60 and 90 min, 2 and 4-h post-dosing, and at 4-h intervals thereafter. Blood chemistry was checked pre-treatment and at 8-h intervals post treatment; hematology including prothrombin times was checked pre-treatment and at 12-h intervals thereafter. Blood samples were taken pre-treatment, after 24 h, and immediately before euthanasia, for microbiology studies).

Urine was collected at 3 h intervals throughout the study through an indwelling bladder catheter. Urine from the previous three hours was mixed and two 10 mL samples taken off and immediately frozen.

Samples of heart (left ventricle), muscle (*tibialis cranialis*), liver, lung, and small intestine were taken post-mortem and stored in formal saline before histological analysis.

Euthanasia. Animals were given an overdose of IV sodium pentobarbital whilst under isoflurane anaesthesia either at the end of the planned study (48 h) or when their MAP fell below 45 mmHg for 30 min and continued to fall without sign of recovery despite fluids and vasopressors.

Statistical analysis

Formal power calculations could not be performed due to a lack of data for the effect of colchicine in pigs. Primary data analysis was done in Prism 7.0 (GraphPad, CA). All animals were included in the analysis. Pig weights, clinical and biochemical outcomes were summarized with mean and SD. Time to euthanasia was assumed not to be normally distributed and hence is described with median and interquartile range (IQR), while acknowledging the small sample size. Individual animal data are provided to explicitly illustrate time to euthanasia.

Measurement of colchicine concentrations

Free and Fab-bound colchicine was measured using a LC-MS/MS method, as published [21]. Briefly, free colchicine was separated from Fab-bound colchicine using 30 kDa microfilters. Total colchicine was determined after Fab denaturation by dilution in water and heating at 100°C for 1 h. Deuterated colchicine was used as internal standard. Samples were then processed by liquid-liquid extraction before LC-MS/MS analysis. Calibration curves were designed over the concentration range 0.5–100 ng/mL for plasma and urine.

Measurement of anti-colchicine fab fragment concentrations

An ELISA was developed to measure Fab concentrations in plasma and urine. Calibration curves (0.01–0.5 mg/L) were

generated using sheep IgG Fab fragments (Rockland Immunochemicals) as standards. Accuracy and precision were controlled using three levels of quality control (QC) samples (0.03, 0.08 and 0.125 mg/L). Standards and QC were prepared in porcine plasma. Well plates were coated with 2 mg/L of rabbit anti-sheep IgG F(ab')_2 fragments (Jackson ImmunoResearch, West Grove). Fab standards and samples were added on corresponding wells. After 1 h incubation at 37°C , peroxidase-conjugated rabbit anti-sheep IgG F(ab')_2 was added and plates incubated for 30 min at 37°C . Plates were washed, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine added, incubated for 15 min, and a stop solution (HCl 1M) added. Absorbance was measured using a POLARstar omega plate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) at 450 nm.

Pharmacokinetic analysis

Plasma colchicine and Fab concentration time data were analysed using the MicroPharm Kinetics 5.0 software, using a two-compartment models. The log linear concentration time data were fitted by linear regression analysis to obtain the volume of distribution; terminal disposition constants (α and β) were calculated by mean square regression analysis. Distribution and terminal half-lives (respectively, $t_{1/2\alpha}$ and $t_{1/2\beta}$) were calculated as $\ln 2/\alpha$ and $\ln 2/\beta$. $\text{AUC}_{0-20\text{h}}$ and $\text{AUC}_{0-\text{end}}$ were calculated by use of the linear trapezoidal rule. $\text{AUC}_{0-\infty}$ was calculated for Fab by adding to AUC_{0-48} the value of the last measured plasma concentration divided by terminal disposition rate constant. QU_{0-20} and QU_{0-48} are the cumulated amounts of unchanged colchicine excreted in the urine from the time 0–20 and 0–48 h, respectively.

Funding

The funders had no role in study design, data collection, data interpretation, or writing of the report. Micropharm staff performed the measurement of plasma Fab concentrations but the PK analysis was done by others. The authors had full access to all the study data; all agreed with the decision to submit for publication. The first author (ME) guarantees the data within the paper.

Results

Oral colchicine administration

We first attempted to identify an oral dose of colchicine that would cause severe toxicity, matching human poisoning after ingestion of colchicine tablets. In a dose-ranging study, four pigs were randomly administered 0.5 or 1.0 mg/kg of colchicine in solution by oral gavage and studied for 60 h. This did not result in a reproducible model, with variable PK profiles for plasma colchicine concentration and no dose–response in the time-to-euthanasia (Figure 1).

The animals did, however, show evidence of multi-organ injury and severe cardiotoxicity. Cardio-respiratory function was not affected by colchicine until late in the poisoning (Figure 2). In three of four pigs (two 0.5 mg/kg, one

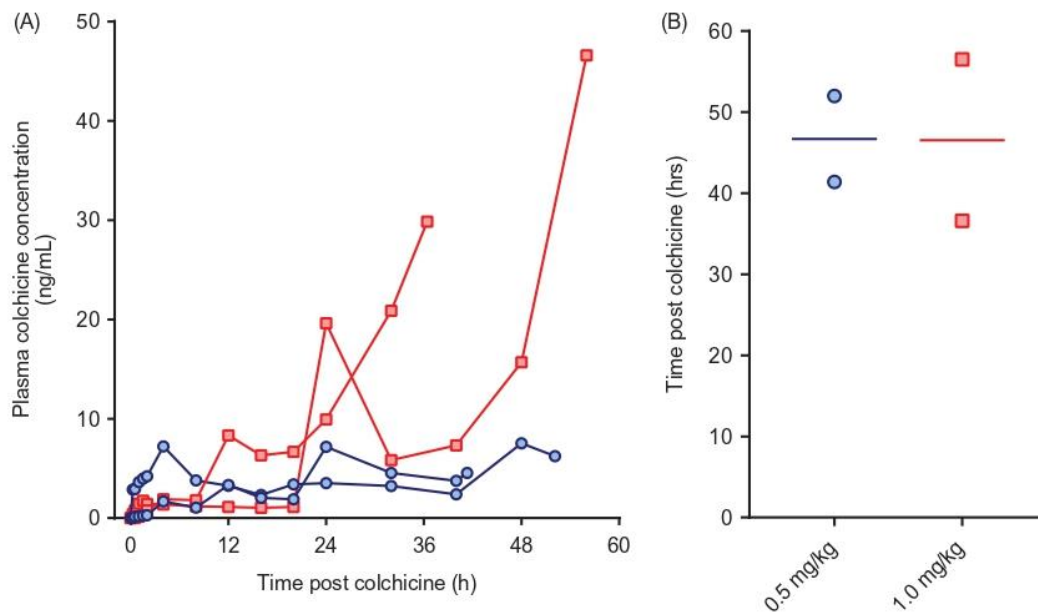


Figure 1. (A) Plasma colchicine concentration and (B) time to euthanasia for animals receiving 0.5 mg/kg (blue circles) or 1.0 mg/kg (red squares) colchicine by oral administration.

1.0 mg/kg), cardiotoxicity developed with a fall in MAP requiring norepinephrine. The doses of norepinephrine required to maintain an MAP >45 mmHg increased rapidly over a few hours before both heart rate and MAP fell precipitously over minutes (Figure 2) and the animals were euthanised. The fourth (2nd high dose) animal began to develop cardiotoxicity after 53 h; norepinephrine requirements rose more slowly than with the other animals. It was euthanised as severe cardiotoxicity developed at 56.5 h.

Clinical biochemistry analyses showed evidence of liver (raised AST activity) and muscle (raised CK activity) injury after 15 h as well as late renal injury in the hours before euthanasia (data not shown).

Intravenous colchicine administration

To seek a more reliable model, we switched to the IV route of administration for the next four pigs (a route previously used for clinical therapy [7]). To compensate for increased colchicine bioavailability after IV administration [8], the lower dose was halved to 0.25 mg/kg while a higher dose was kept at 1.0 mg/kg with the ambition of bracketing severe toxicity. The colchicine was infused over one hour.

The first two pigs received 0.25 and 1.0 mg/kg by IV infusion. Because toxicity was rapid for the higher dose, with euthanasia required at 14.5 h, the next two animals received 0.25 mg/kg IV.

Colchicine PK was similar in the three animals receiving 0.25 mg/kg, with a mean AUC_{0-20} of 343 $\mu\text{g/L/h}$ (SD = 21 $\mu\text{g/L/h}$), $t_{1/2\alpha}$ of 0.21 h (SD = 0.012 h) and QU_{0-20} of 17% (SD = 2.9%) (Figure 3; Table 1). In the animal receiving the higher dose, AUC_{0-16} was 2,398 $\mu\text{g/L/h}$ and $t_{1/2\alpha}$ 0.15 h. The elimination half-life could not be calculated because of a plateau in plasma colchicine concentration from 8 h post-administration to time of euthanasia.

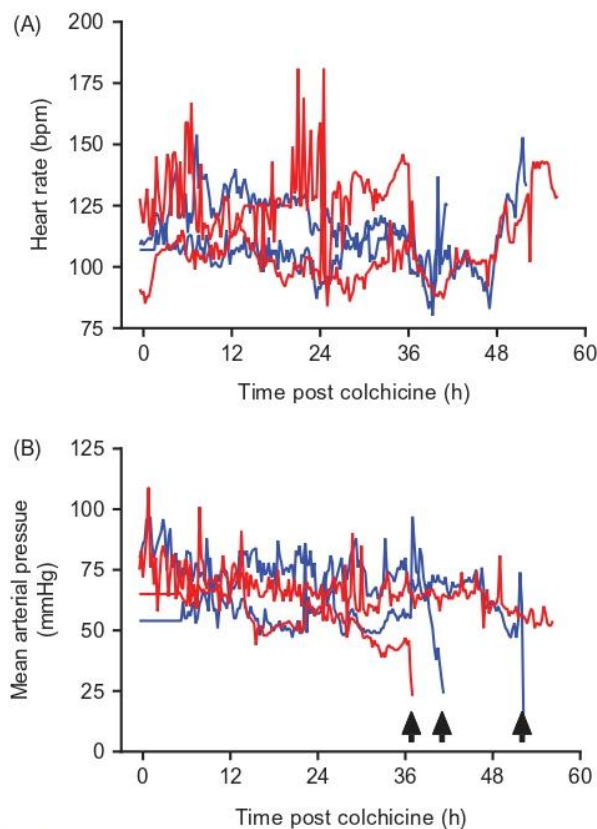


Figure 2. (A) Heart rate and (B) mean arterial pressure in animals receiving 0.5 mg/kg (blue lines) or 1.0 mg/kg (red lines) colchicine by oral administration. Arrows mark sudden catastrophic cardiovascular collapse in three of the animals.

Toxicity was consistent in the three animals receiving 0.25 mg/kg, with euthanasia required a mean of 22.5 (SD 3.2) h after starting the infusion (Figure 4). Animals showed evidence of dose-related liver, renal and muscle toxicity

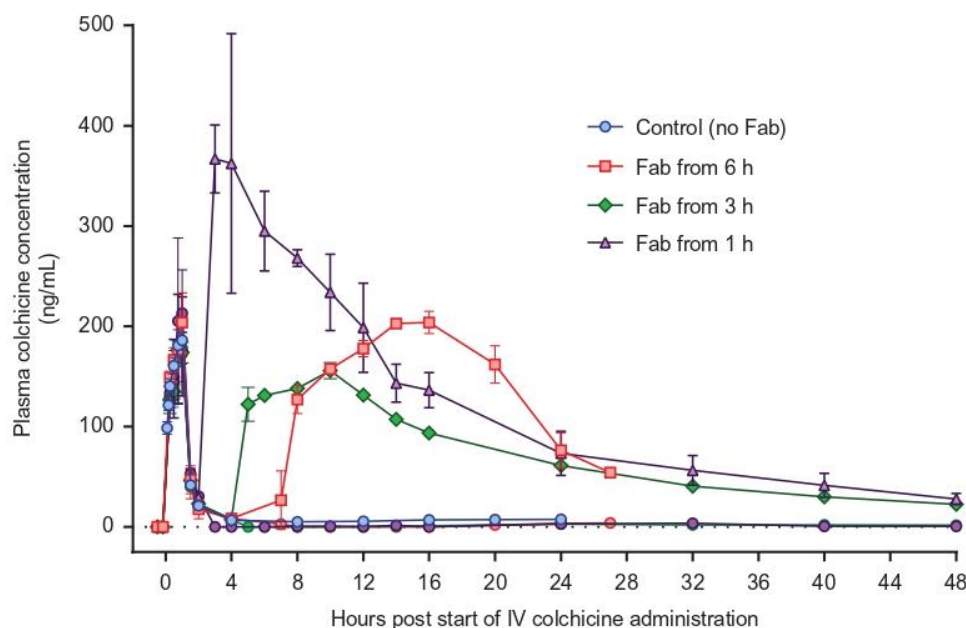


Figure 3. Plasma pharmacokinetics for total colchicine and free colchicine in animals receiving intravenous colchicine (0.25 mg/kg), with or without anti-colchicine Fab, according to delay to treatment. Control animals received no Fab after IV colchicine 0.25 mg/kg over 1 h = blue squares. Animals received Fab at 6 h post-infusion (total: red square; free colchicine: red circle), Fab at 3 h post-infusion (total: green diamond; free colchicine: green circle), and Fab at 1 h post-infusion (total: purple triangle; free colchicine: purple circle).

Table 1. Pharmacokinetics of colchicine and Fab.

Fab infusion	Colchicine administered IV 0.25 mg/kg						
	Controls	From 1 h after the colchicine infusion		From 3 h after the colchicine infusion		From 6 h after the colchicine infusion	
Animals	<i>n</i> = 3 (mean ± SD)	<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 1
AUC _{0-20h} (μg L ⁻¹ h ⁻¹)	343 ± 21	4862	4004	2011	2083	2532	2512
Free colchicines AUC ₀₋₂₀ (μg L ⁻¹ h ⁻¹)	—	389	259	298	285	300	220
AUC _{0-end} (μg L ⁻¹ h ⁻¹)	—	3741	5313	3142	3343	3182	2971
Ratio (AUC ₀₋₂₀ /AUC ₀₋₂₀ control)	1	14.1	11.6	5.8	6.1	7.4	7.3
<i>t</i> _{1/2α} (h)	0.21 ± 0.12	—	—	—	—	0.21	0.19
<i>t</i> _{1/2β} (h)	—	9.7	9.0	11	11	—	—
QU _{0-20h}	17 ± 2.9%	38%	47%	37%	36%	18%	18%
QU _{0-end}	—	43%	56%	43%	43%	18%	20%
Ratio (QU ₀₋₂₀ /QU ₀₋₂₀ control)	1	2.2	2.8	2.2	2.1	1.1	1.1
Fab AUC _{0-∞} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	—	40.0	32.4	28.2	31.9	—	—
Fab <i>t</i> _{1/2α} (h)	—	2.3	2.6	1.6	1.3	—	—
Fab <i>t</i> _{1/2β} (h)	—	44.4	31.3	22.1	11.5	—	—

The Fab infusions given 1 and 3 h after the colchicine infusion were administered over 1 h; the Fab infusion given 6 h after the colchicine infusion finished was administered over 7 h (50% over first hour, 50% over following 6 h).

(Figure 5), as well as late, severe cardiotoxicity. Blood gas analysis showed no effect on arterial pH but a substantial rise in arterial lactate concentration, peaking at 7–9 mmol/L (Figure 6). No bacteria were cultured from samples taken for microbiology. Histology showed moderate, diffuse necrotizing enteritis of the small intestine, mild cardiac myopathy, and pulmonary alveolar and interlobular oedema.

The IV dose of 0.25 mg/kg colchicine was selected to study the effect of anti-colchicine Fab.

Administration of anti-colchicine fab to colchicine poisoned pigs

A full neutralising dose of anti-colchicine Fab given from 6 h after completion of the colchicine infusion (50% over 1 h, 50% of the next 6 h) produced a 7.35-fold increase in plasma

colchicine (AUC₀₋₂₀ 2,522 [SD = 14] μg/L/h) and removed all free colchicine during the infusion (Figure 4). However, it did not increase urinary elimination of colchicine (QU₀₋₂₀ 18%, mean of 1.1-fold greater than controls) and did not prevent toxicity or markedly improve outcome—euthanasia was required a mean of 29.1 (SD 3.4) h after starting the colchicine.

Infusion over 1 h of a full neutralising dose of anti-colchicine Fab, 1 and 3 h after the end (2 and 4 h after the start) of the colchicine infusion, markedly increased both plasma colchicine and urinary elimination of colchicine. The Fab produced 12.9-fold (mean AUC₀₋₂₀ 4,433 [SD = 607] μg/L/h) and 6.0-fold (AUC₀₋₂₀ 2,047 [SD = 51] μg/L/h) increases in plasma colchicine, as well as 2.5-fold (QU₀₋₂₀ 42.5 [SD = 6.4] %) and 2.1-fold (AUC₀₋₂₀ 36.5 [SD = 0.7] %) increases in urinary colchicine elimination, respectively.

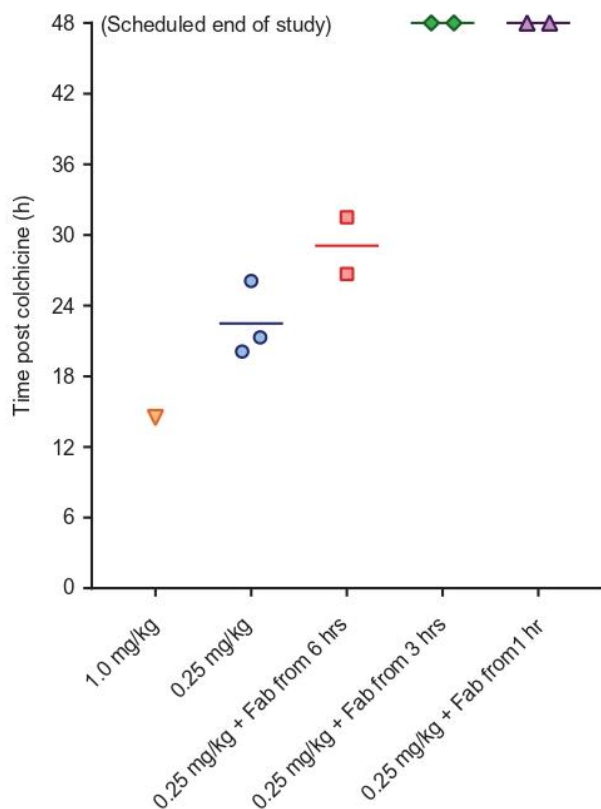


Figure 4. Time to euthanasia in animals receiving intravenous colchicine with or without anti-colchicine Fab, according to delay to treatment.

This increased extraction of colchicine from the tissues and elimination was associated with markedly reduced toxicity, with all four animals surviving to 48 h (Figure 4) and none showing marked cardiotoxicity and cardiovascular decompensation (as seen for animals not receiving Fab—see Figure 2) (data not shown). Clinical biochemistry showed reduced liver, kidney and muscle injury (Figure 5). Blood gas analysis showed no effect on arterial pH or lactate concentration, except for transient rise in lactate to 5 mmol/L in one animal receiving Fab 1 h after the end of the colchicine infusion (Figure 6). No bacteria were cultured from samples taken for microbiology. Histology showed mild necrotizing enteritis of the small intestine, mild cardiac myopathy, and mild pulmonary alveolar and interlobular oedema.

The Fab had a mean $t_{1/2\alpha}$ of 2.0 (SD 0.6) h and mean $t_{1/2\beta}$ of 27.3 (SD 14.0) h (Table 1). The half-life of elimination was slow enough in all animals to keep concentrations of free plasma colchicine undetectable until 20 h and at very low concentrations until the end of each study.

Discussion

This study has shown that early administration of anti-colchicine Fab fragments redistributes colchicine from extracellular fluid to the blood and increases its elimination in the urine; this removal of colchicine from the tissues, if the Fab is given sufficiently early, in sufficient dose, prevents colchicine-induced cardiotoxicity, multi-organ injury, and metabolic

acidosis. Although a small translational study, the results suggest that anti-colchicine Fab may benefit patients with colchicine toxicity if given early enough after exposure.

Administration of a full neutralising dose of Fab within 3 h of the end of colchicine administration resulted in marked increases in plasma colchicine and urinary elimination, and absence of free colchicine from plasma until 20 h after colchicine exposure. Delay of Fab administration to 6 h after the end of colchicine administration, and administration of a half-neutralising dose, resulted in effective redistribution—similar to that following Fab started at 3 h—but a less clear effect on urinary elimination and only a modest increase in time to euthanasia. Although this poor delayed effect may be due to the Fab dose administered, our results from IV dosing may suggest that colchicine Fab will be clinically relevant for relatively few patients since many present to hospital after 6 h [5,6].

This possible lack of effectiveness after only a few hours contrasts with the single report of a patient treated with goat anti-colchicine antibodies which showed both PK and clinical benefit when receiving Fab 40 h after ingestion [12]. This difference might be because porcine colchicine poisoning is not a perfect model of human poisoning, with differences between pigs and humans in cardiovascular function and metabolism. However, we found the lethal dose in pigs to be similar to that reported for humans, and far lower than the rat LD50 (>25 mg/kg), consistent with some relevance of pig poisoning for modelling human poisoning. Multi-organ injury seen in the model also replicated human poisoning. The polyclonal Fab had very high affinity for colchicine (average affinity constant $3.16 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$) suggesting that differences in affinity between the goat antibody used for the clinical case (affinity $2.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) and the ovine Fab used here is not responsible for the differences in effect. It is also possible that the pharmacokinetics of the ovine Fab in this pig model are quite different to that of the goat Fab used in the clinical case [12].

Unfortunately, oral colchicine dosing did not produce reliable PK or model poisoning well, likely due to variation in absorption of the colchicine from the anaesthetised pig gut. This variability was not noted in our previous studies of oral dimethoate organophosphorus insecticide toxicity [18], probably due to the lower toxicity of the insecticide and therefore much higher doses needed for poisoning (1000 mg/kg).

This pig study suggests that humans will have to be treated soon after poisoning for the Fab to be effective. This might be true for very high doses but not for more borderline doses. Increasing the number of animals studied with IV colchicine at different delays to Fab is unlikely to yield further information on timing and doses for colchicine tablet poisoning. Intravenous infusions over 1 h may not accurately reflect oral poisoning despite similar C_{max} and bioavailability. The slower absorption and distribution to tissues, and direct effect on gut enterocytes, of oral administration may allow the Fab longer to work in human poisoning [22].

Instead, a clinical study is needed that treats all patients presenting to hospital with colchicine poisoning up to 48 h after exposure, stratified according to time to treatment, estimated dose ingested, and plasma colchicine concentration

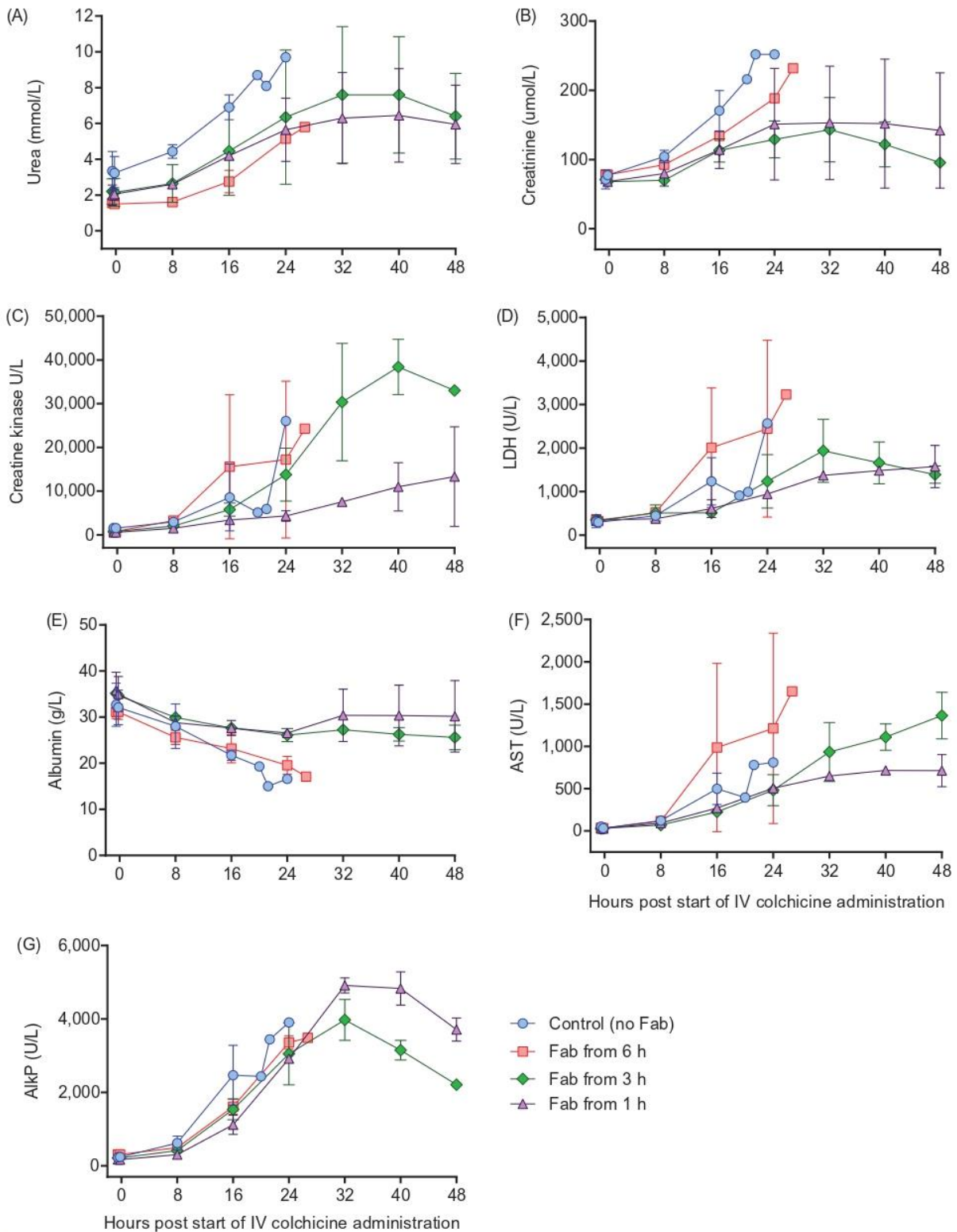


Figure 5. Clinical biochemistry in animals receiving intravenous colchicine (0.25 mg/kg), with or without anti-colchicine Fab. Control animals received no Fab after IV colchicine 0.25 mg/kg over 1 h (blue circles). Animals received Fab at 6 h post-infusion (red square), Fab at 3 h post-infusion (green diamond), and Fab at 1 h post infusion (purple triangle). (A) urea, (B) creatinine, (C) creatine kinase, (D) lactate dehydrogenase (LDH), (E) albumin, (F) aspartate aminotransferase (ALT) and (G) alkaline phosphatase (AlkP).

before treatment. Due to the scarcity of cases, the study will need to be observational. Such a study is now being started in France, based on the data on redistribution reported in this porcine study. As patients are studied, and outcomes

recorded, the time to treatment could be slowly shortened down to 6, 12 or 24 h. Alternatively, all patients could in future be treated with the understanding that only borderline cases will get any benefit after a certain time.

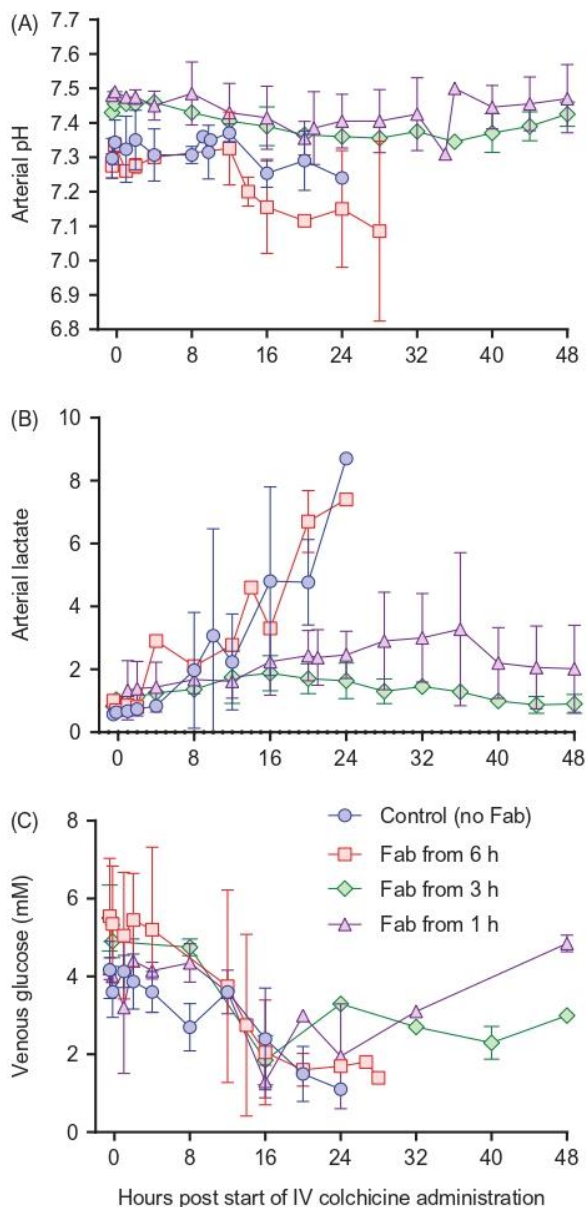


Figure 6. Blood gas analysis in animals receiving intravenous colchicine (0.25 mg/kg), with or without anti-colchicine Fab. Control animals received no Fab after IV colchicine 0.25 mg/kg over 1 h (blue circles). Animals received Fab at 6 h post-infusion (red square), Fab at 3 h post-infusion (green diamond), and Fab at 1 h post-infusion (purple triangle). (A) arterial pH, (B) arterial lactate concentration and (C) venous glucose concentration.

The pharmacokinetics of colchicine and Fab in the pigs were generally similar to those reported in humans. The distribution half-life of colchicine (0.21 h) and of Fab (2.0 h) in this porcine study were similar to that observed in humans (colchicine 0.15 h, anti-digoxin Fab 0.5–1.9 h) [21,23]. Distribution was complete one hour after the end of infusion, consistent with the best response to Fab occurring when it was started at 1 h. Fab administration increased the AUC 6 to 14-fold compared to controls, similar to that noted in colchicine intoxicated rabbits (19-fold) [24]. The elimination half-lives (9.0–11.0 h) calculated in the last four pigs were shorter than observed in humans receiving IV colchicine infusions (30 ± 6 h). In the same way, elimination half-life (11.5–44.4 h)

was comparable to half-life in human (11.0–34.5 h) exhibiting a high variability.

Limitations

We used a PK dose–response approach to minimise the number of animals used in the study before moving into human studies. Despite being a small study, robust dose/time–response effects were seen in terms of the AUC, time to euthanasia, and reduction in organ injury. Since the study has provided proof of binding *in vivo* in a clinically relevant model that is now leading to clinical trials, use of further animals is unlikely to provide additional useful data. We acknowledge that there are cardiovascular and metabolic differences between pigs and humans—such as basal heart rate and mass of the liver and kidneys—that might make pigs more sensitive to cardiotoxicity, reducing effectiveness compared to humans. However, additional pig studies will not help guide human treatment.

We used IV infusions of colchicine over 1 h to simulate oral dosing due to the unreliable PK of oral colchicine in the anaesthetised pigs. This difference might be important although the bioavailability of oral tablets is similar to IV infusions [5,6]. The animals receiving Fab at 6 h received only half a neutralising dose over the first hour, followed by the second half dose over 6 h. It is therefore not possible to directly compare the results with the 1 and 3 h delays to administration. However, redistribution was similar to that after a 3 h delay, despite the lack of effect on severity. This information is useful and reinforces the need for a large clinical study to identify the latest possible treatment time in human patients. The IV dose of 0.25 mg/kg was selected as an apparently reliable lethal dose of colchicine; we did not explore further doses between 0.25 and 1.0 mg since our aim was to rapidly move into human studies once we had tested whether the Fab could bind and redistribute colchicine with clinical effect *in vivo* in the pig.

Conclusion

In this clinically relevant porcine model of colchicine poisoning, anti-colchicine Fab fragments were highly effective at stopping toxicity if given early enough in a large enough dose. Clinical trials are required to translate this knowledge into human patients.

Acknowledgements

We thank David Binnie, Peter Tennant, and Adrian Ritchie for their technical assistance with these studies. ME and FB have received unrestricted research funds from Micropharm Ltd. IA is employed by Micropharm Ltd.


Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

The work was partially funded by Micropharm Ltd.

ORCID

Michael Eddleston  <http://orcid.org/0000-0002-6857-3441>

References

- [1] Yang LP. Oral colchicine (Colcrys): in the treatment and prophylaxis of gout. *Drugs* 2010;70:1603–1613.
- [2] Campbell KB, Cicci TA, Vora AK, et al. Beyond gout: colchicine use in the cardiovascular patient. *Hosp Pharm.* 2015;50:859–867.
- [3] Wu B, Xu T, Li Y, Yin X. Interventions for reducing inflammation in familial Mediterranean fever. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;Cd010893.
- [4] Chen K, Schenone AL, Borges N, et al. Teaching an old dog new tricks: colchicine in cardiovascular medicine. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2017;17:347–360.
- [5] Putterman C, Ben-Chetrit E, Caraco Y, et al. Colchicine intoxication: clinical pharmacology, risk factors, features, and management. *Semin Arthritis Rheum.* 1991;21:143–155.
- [6] Harris RD, Gillett MJ. Colchicine poisoning - overview and new directions. *Emerg Med Australas* 1998;10:161–167.
- [7] CDC. Deaths from intravenous colchicine resulting from a compounding pharmacy error—Oregon and Washington, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2007;56:1050–1052.
- [8] Finkelstein Y, Aks SE, Hutson JR, et al. Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug. *Clin Toxicol (Phila).* 2010;48:407–414.
- [9] Abe E, Lemaire-Hurtel AS, Duverneuil C, et al. A novel LC-ESI-MS-MS method for sensitive quantification of colchicine in human plasma: application to two case reports. *J Anal Toxicol.* 2006;30:210–215.
- [10] Scherrmann JM. Antibody treatment of toxin poisoning—recent advances. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1994;32:363–375.
- [11] Urtizberea M, Sabouraud A, Cano N, et al. Reversal of murine colchicine toxicity by colchicine-specific Fab fragments. *Toxicol Lett.* 1991;58:193–198.
- [12] Baud FJ, Sabouraud A, Vicaut E, et al. Brief report: treatment of severe colchicine overdose with colchicine-specific Fab fragments. *N Engl J Med.* 1995;332:642–645.
- [13] Peake PW, Pianta TJ, Succar L, et al. Fab fragments of ovine antibody to colchicine enhance its clearance in the rat. *Clin Toxicol (Philadelphia, Pa).* 2015;53:427–432.
- [14] Dorandeu F, Mikler JR, Thiermann H, et al. Swine models in the design of more effective medical countermeasures against organophosphorus poisoning. *Toxicology* 2007;233:128–144.
- [15] Bode G, Clausing P, Gervais F, et al. The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2010;62:196–220.
- [16] Bebartha VS, Tanen DA, Lairet J, et al. Hydroxocobalamin and sodium thiosulfate versus sodium nitrite and sodium thiosulfate in the treatment of acute cyanide toxicity in a swine (*Sus scrofa*) model. *Ann Emerg Med.* 2010;55:345–351.
- [17] Wiesenfeld PL, Garthoff LH, Sobotka TJ, et al. Acute oral toxicity of colchicine in rats: effects of gender, vehicle matrix and pre-exposure to lipopolysaccharide. *J Appl Toxicol.* 2007;27:421–433.
- [18] Eddleston M, Street JM, Self I, et al. A role for solvents in the toxicity of agricultural organophosphorus pesticides. *Toxicology* 2012;294:94–103.
- [19] Urtizberea M, Sabouraud A, Lachaise M, et al. Pharmacokinetics of total and free digoxin and Fab fragments in 5 intoxicated patients after administration of specific anti-digoxin Fab fragments. *Arch Toxicol Suppl* 1991;14:132–135.
- [20] Schaumann W, Kaufmann B, Neubert P, et al. Kinetics of the Fab fragments of digoxin antibodies and of bound digoxin in patients with severe digoxin intoxication. *Eur J Clin Pharmacol.* 1986;30:527–533.
- [21] Fabresse N, Allard J, Sardaby M, et al. LC-MS/MS quantification of free and Fab-bound colchicine in plasma, urine and organs following colchicine administration and colchicine-specific Fab fragments treatment in Gottingen minipigs. *J Chromatogr B.* 2017;1060:400–406.
- [22] Gumm B, Wilkinson J, Aldridge M, et al. Cell-based cytotoxicity and immunocytotoxicity assays for colchicine and ovine anti-colchicine sera and Fab fragments. *J Clin Toxicol.* 2016;6:1000323.
- [23] Eddleston M, Rajapakse S, Rajakanthan K, et al. Anti-digoxin Fab fragments in cardiotoxicity induced by ingestion of yellow oleander: a randomised controlled trial. *Lancet* 2000;355:967–972.
- [24] Sabouraud AE, Urtizberea M, Cano NJ, et al. Colchicine-specific Fab fragments alter colchicine disposition in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;260:1214–1219.

DISCUSSION

La première partie de ce travail a permis l'étude préclinique d'un anticorps de type Fab anti-colchicine dans un modèle animal.

Dans un premier temps il était nécessaire de développer une méthode analytique permettant le dosage de la colchicine libre et liée à l'anticorps afin de démontrer l'efficacité de celui-ci. Plusieurs méthodes ont déjà été développées en particulier pour la digoxine et la colchicine (90,96). La fraction libre était séparée par une méthode de dialyse à l'équilibre avant d'être dosée en radio-immunoanalyse. La fraction totale était dosée après libération des molécules par dénaturation de l'anticorps en chauffant à 100°C une heure. Ces approches sont longues et fastidieuses, notamment pour la dialyse qui se fait sur une nuit entière. Et aujourd'hui la radio-immunoanalyse a été délaissée pour des raisons de sécurité et des motifs environnementaux inhérents à la radioactivité des réactifs utilisés. Nous avons développé une méthode de séparation simple reposant sur la filtration avec des filtres de 30 KDa, permettant de retenir la fraction liée au Fab (50 KDa) et ne laissant passer que la colchicine libre (399 Da). La colchicine totale a été libérée après chauffage à 100°C, suivant la méthode décrite par Smith et al. (96). Le dosage était ensuite effectué en LC-MS/MS après extraction liquide-liquide, avec une méthode rapide de 2 minutes. Cette méthode a été validée selon les recommandations de l'agence européenne du médicament (EMA) sur une gamme allant de 0,5 à 100 ng/mL avec une limite de détection à 0,3 ng/mL. Cette fenêtre encadre les concentrations thérapeutiques (0,3-2,4 ng/mL) et les concentrations toxiques (97). Une seconde méthode a été développée pour le dosage tissulaire de la colchicine à partir de 5 mg de tissus, celle-ci a été validée dans le foie sur une gamme allant de 5 à 300 pg/mg. La méthode a été appliquée avec succès aux organes d'animaux traités (cœur, foie, poumon, muscle, intestin) montrant que la sensibilité était suffisante dans le cadre de notre application. Une fois ces méthodes développées et validées dans les deux matrices, elles ont pu être appliquées aux animaux de l'étude.

L'ensemble des expérimentations animales ont été réalisées chez le cochon nain Göttingen (Figure 4). La première étape a consisté à développer un modèle d'intoxication reproductible, et définir la dose létale dans chez cet animal. Afin de refléter au mieux les conditions de l'intoxication chez l'homme, les 4 premiers animaux ont été traités par voie orale avec des doses supposées être non léthales (0,5 mg/Kg) et léthales (1 mg/Kg), la dose considérée comme létale chez l'homme étant de 0,8 mg/Kg (87). Les cinétiques de colchicine observées étaient

très variables pour les 4 animaux, avec une absorption qui semble se poursuivre jusqu'à l'euthanasie. Cette variabilité est bien décrite chez l'homme, la principale raison est la présence de glycoprotéine P au niveau des entérocytes, rendant cette étape pharmacocinétique limitante. De plus, la dose de 0,5 mg/Kg devait permettre la survie des animaux, cela n'a pas été le cas et nous avons observé une absence de relation entre la dose administrée et le temps de l'euthanasie. Cette variabilité peut également être liée à l'anesthésie des animaux qui limite la motilité du tube digestif. Afin de s'affranchir de l'étape d'absorption une forme intraveineuse de colchicine a été développée par le professeur Alain Astier. La colchicine a été administrée par voie intraveineuse aux animaux suivants. La biodisponibilité moyenne de la colchicine chez des sujets sains est de 44% (85). Les doses administrées ont donc été divisées par deux (0,25 mg/Kg) tout en conservant la dose élevée (1 mg/Kg) afin d'être sûr d'obtenir une intoxication fatale. Cette voie d'administration a permis d'obtenir des cinétiques reproductibles, et l'administration de la dose de 0,25 mg/Kg à deux animaux supplémentaires a permis d'obtenir des AUC similaires avec un temps d'euthanasie très proche. Nous notons également que le décès des animaux est dû à un collapsus cardio-vasculaire, comme c'est le cas chez l'homme lors des intoxications aiguës (88). Cela a permis de définir la dose létale de colchicine chez le cochon nain Göttingen, et d'avoir un modèle reproductible d'intoxication à la colchicine nécessaire à l'étude de l'antidote.



Figure 4. Animaux anesthésiés sous surveillance continue après administration de colchicine et de l'antidote à T4h.

Les doses de Fab administrées étaient équimolaires par rapport à la dose de colchicine administrée (1 fragment Fab neutralisant 1 molécule de colchicine). Pour les deux premiers animaux ayant reçu l'antidote, celui-ci a été administré 6 heures après la fin de la perfusion de colchicine. L'antidote a été administré par voie IV avec la moitié de la dose sur la première heure et l'autre moitié sur les 6 heures suivantes, afin d'éviter une élimination rénale rapide du Fab n'ayant pas fixé la colchicine. C'est le protocole qui a été suivi pour l'unique patient intoxiqué à la colchicine ayant été traité avec succès par Fab (93). L'administration de l'antidote a permis d'observer une redistribution importante de la colchicine du compartiment tissulaire vers le compartiment sanguin avec une augmentation importante de l'AUC, mais sans modification de la quantité éliminée dans les urines et sans amélioration de la survie. Afin d'objectiver l'efficacité de l'antidote les deux animaux suivants ont été traités à T1h après la fin de la perfusion de la colchicine et l'antidote a été administré intégralement sur une perfusion d'une heure. Dans ce cas également il y a eu une redistribution importante de la colchicine (AUC x 14 par rapport au contrôle) mais également une augmentation de l'excrétion urinaire et une survie des animaux. Deux animaux supplémentaires ont été traités à un horaire intermédiaire (T3h post-administration de colchicine) avec succès également. Ces résultats démontrent l'efficacité de l'antidote si celui-ci est administré précocement par rapport à l'exposition à la colchicine. Cette étude présente deux limites importantes. La première est la voie d'administration (intraveineuse) laquelle ne reflète pas celle utilisée chez l'homme (voie orale), et n'est donc pas comparable à celui-ci. La seconde est le délai d'administration de l'antidote permettant la survie des animaux, qui est très faible et difficilement réalisable en vie réelle. Cependant, l'absorption après administration par voie orale est absente lors de l'administration IV, ce qui ajoute un délai supplémentaire chez l'homme. Cela est d'autant plus vrai qu'elle est responsable de la variabilité inter-individuelle avec la présence de la glycoprotéine-P. Et le seul patient ayant été traité par immunothérapie en 1995 a reçu l'antidote 40 h après l'ingestion de colchicine. Ces éléments sont encourageants pour continuer l'étude chez l'homme, en définissant un délai d'administration précoce de l'antidote. Le nombre d'animaux utilisés dans cette étude reste faible, au total 6 animaux ont été traités avec l'antidote. Cela est uniquement lié au coût des expérimentations : fabrication de l'antidote, achat des animaux à la société danoise Ellengaard Göttingen Minipigs, livraison au Roslin Institute à Edimbourg, expérimentations avec au moins 2 vétérinaires présents en permanence pendant 48 heures (un chirurgien et un anesthésiste), autopsie des animaux, examens anatomo-pathologiques, examens de biologie médicale, dosage du Fab et dosage de la colchicine.

Cependant, malgré le faible nombre d'animaux utilisés, la très bonne reproductibilité de chaque expérience réalisée et la relation dose-temps/effet donne de la robustesse à l'étude.

Depuis la réalisation de l'étude préclinique, un article a été publié présentant une nouvelle approche visant à substituer les anticorps en toxicologie clinique par nouveau type de protéine, la lipocaline 2 (lcn 2) (98). Elle a un rôle dans l'immunité innée en fixant les sidérophores bactériennes. Les auteurs décrivent un procédé de bio-ingénierie permettant de modifier le site de fixation de la protéine *in vitro* et d'en créer une ayant une affinité très élevée pour la colchicine ($K_d=1,2 \cdot 10^{-10}$ M). Dans cet article, la protéine générée est utilisée pour développer une méthode de dosage de la colchicine en ELISA. Mais cette approche est très intéressante pour le futur développement d'antidotes, les lipocalines sont des protéines endogènes, elles n'entraînent pas de problèmes d'immunogénicité contrairement aux anticorps polyclonaux utilisés ici qui sont d'origine ovine. Leur production est possible en bioréacteurs diminuant le coût de production qui est la principale limite des antidotes de type anticorps actuellement utilisés. Et enfin, ces protéines sont de taille plus petite que les fragments Fab (25 KDa), permettant d'améliorer la diffusion tissulaire et facilitant l'élimination rénale. Ces arguments font de ce type de protéine une approche prometteuse pour le développement de futurs antidotes.

Concernant les intoxications à la colchicine, que ce soit chez l'homme ou chez l'animal il existe un délai important entre le moment où la distribution est terminée, et le moment où la toxicité cardiovasculaire se manifeste. La demi-vie de distribution retrouvée après administration par voie IV est de $0,21 \pm 0,12$ heures chez l'animal (modèle à deux compartiments) et $0,15 \pm 0,07$ heures chez l'homme après administration par voie IV (85). Et les manifestations toxiques apparaissent entre 20 et 25 heures chez l'animal après administration par voie IV, et entre 24 et 72 heures chez l'homme par voie orale (83). D'autre part, après administration de l'antidote à T6h chez l'animal, on observe une redistribution tissulaire importante, mais celle-ci n'est pas associée à une amélioration clinique. Ces observations ne sont pas en faveur d'une toxicité directe de la colchicine sur le système cardiovasculaire via un mécanisme pharmacologique, mais en faveur d'une toxicité lésionnelle. Cette hypothèse a été étayée récemment chez le rat avec deux poisons du fuseau : la colchicine et la vincristine (99). Les auteurs ont administré des doses élevées de ces deux molécules et excisé le cœur 24 heures après. Ils ont mis en évidence des signes de dégénérescence et de nécrose au niveau des cellules myocardiques après administration de la colchicine. Ils ont également observé des lésions de l'endothélium vasculaire et cellules endothéliales apoptotiques dans l'interstice vasculaire. Les

lésions cardiaques étaient positives au pimonidazole, un marqueur de l'hypoxie. Ces observations sont en faveur de lésions endothéliales à l'origine de troubles de la microcirculation ayant conduit à une hypoxie des cellules myocardiques. Ces mécanismes expliquent partiellement pourquoi malgré une administration précoce de l'antidote (T6h), à un moment où les animaux n'ont aucun trouble fonctionnel vasculaire ou cardiaque, il n'y a aucune amélioration de la survie. Après administration par voie intraveineuse, chez l'animal, les lésions doivent survenir entre 3 et 6 heures. Ce délai doit être défini chez l'homme afin de garantir un bénéfice de l'administration de l'antidote.

Deuxième Partie : Etude de l'efficacité du système de dialyse hépatique de type MARS dans l'épuration du vérapamil et du diltiazem à travers un modèle *in vitro*.

CONTEXTE ET RATIONNEL DE L'ÉTUDE

Le système de dialyse hépatique de type MARS a été développé dans les années 2000. C'est un système de dialyse à l'albumine permettant d'épurer l'organisme des métabolites éliminés par le foie, notamment la bilirubine, les acides biliaires ou l'ammoniac qui participent à la défaillance multi-viscérale dans l'insuffisance hépatique aiguë. La première étude clinique a été réalisée par Mitzner et al. chez des patients en insuffisance hépatique à haut risque (bilirubine > 15 mg/dL) (100). La mortalité à 7 jours était de 100% dans le groupe contrôle et de 62,5% dans le groupe traité par MARS. Le MARS est depuis indiqué dans la prise en charge transitoire de l'insuffisance hépatique aiguë primaire, ou secondaire chez un patient cirrhotique. Il a également été utilisé de façon empirique dans le traitement d'intoxications avec ou sans insuffisance hépatique. Dans la prise en charge d'intoxications médicamenteuses aux antagonistes calciques (vérapamil, diltiazem, amlodipine), à la théophylline, la lamotrigine, la phénytoïne et au paracétamol (35–43). Il a également permis de prendre en charge des patients intoxiqués à l'amanite phalloïde (*Amanita phalloides*) présentant une hépatite fulminante (44,45).

La dialyse à l'albumine est un principe permettant l'élimination conjointe des substances solubles avec les molécules liées à l'albumine. En effet, de nombreux toxiques sont liés à l'albumine ou aux protéines, rendant leur élimination par les techniques de dialyse classique limitée. Le système MARS est un système à deux circuits principaux, un circuit albumine et un circuit sang, séparés par une membrane. Le sang du patient va passer dans une première colonne appelée MARSflux où est présente cette membrane qui le sépare du circuit chargé en albumine, et où les molécules liées aux protéines vont passer préférentiellement selon un gradient de concentration. Le circuit albumine sera par la suite dialysé selon un système conventionnel de type hémodiafiltration continue (colonne DIAflux), permettant l'élimination des molécules hydrosolubles, puis l'albumine chargée en toxique sera par la suite régénérée par le passage dans deux colonnes adsorbantes, une colonne de charbon activé (AC250) et une résine échangeuse d'anions (IE250). L'albumine régénérée revient par la suite au niveau de la colonne MARSflux, assurant le maintien du gradient de concentration. Ces étapes de régénération ont donc un rôle à la fois dans l'élimination du toxique (hémodiafiltration puis fixation sur les colonnes adsorbantes) et dans la pérennité du gradient d'albumine, permettant à ce système de se distinguer d'autres méthodes de dialyse à l'albumine, comme le SPAD, dans lequel

l'albumine passée au contact du sang est directement éliminée. Malgré la présence du système MARS sur le marché depuis plus de dix ans, il n'existe pas à ce jour d'étude analytique permettant de quantifier avec précision l'efficacité épuratrice des différents compartiments du système MARS ainsi que ses avantages sur les autres méthodes de dialyse et de filtration utilisées dans les services de réanimation. De nombreuses études de cohorte sur le système mettent en avant une baisse de la concentration plasmatique de nombreuses molécules et une tendance vers une meilleure survie des patients, mais l'action directe du MARS sur ces paramètres n'est pas à ce jour démontrée (101).

Ce travail vise à apporter des connaissances nouvelles sur ce sujet. Les objectifs sont d'étudier l'épuration par différents systèmes de deux médicaments, le vérapamil et le diltiazem, à doses toxiques.

Publication n°3

**Molecular Adsorbent Recirculating System and Continuous Venovenous
Hemodiafiltration removal of verapamil: an ex vivo compartmental
analysis**

Nicolas Fabresse, Romain Jouffroy, Nicolas Caill, Frédéric Baud,

Jean-Claude Alvarez

Non encore soumis pour publication

Molecular Adsorbent Recirculating System and Continuous Venovenous Hemodiafiltration removal of verapamil: an ex vivo compartmental analysis

Nicolas Fabresse^{1,2}, Romain Jouffroy³, Nicolas Caill³, Frédéric Baud³, Jean-Claude Alvarez^{1,2}

¹*MassSpecLab, Plateforme de Spectrométrie de Masse, UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, Université Versailles Saint-Quentin, 2 Avenue de la Source de la Bièvre, 78180 Montigny le Bretonneux (France)*

²*Laboratoire de Pharmacologie – Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire Raymond Poincaré, AP-HP, 104 Boulevard R. Poincaré, 92380 Garches (France).*

Abstract:

Background: Molecular adsorbent recirculating system (MARS) and continuous venovenous hemodiafiltration (CVVHDF) have both shown to be suitable in patients with acute verapamil poisoning. No analytical studies have quantified the extractive efficiency of the different compartments of CVVHDF and MARS. The objective of the present study was to evaluate the efficacy of both system in an *ex vivo* model devoid of protein and erythrocytes to assess their maximum extractive capability. Verapamil poisoning was simulated in a central compartment consisting in a 5 liter dialysis solute spiked with verapamil at three different concentrations: 1, 2.5 and 5 mg/L.

Results: Mean CVVHDF Extraction coefficient ($EC = (\text{in concentration} - \text{out concentration}) / \text{in concentration}$) were always concentration-dependent becoming negative after 2 hours, suggesting late release from the cartridge. At the end of the sessions the mean amounts remaining in the central compartment were 6, 3 and 4% of the injected dose, respectively. The mean cumulative amounts found in the effluent were 16, 20 and 28% of the injected dose, respectively. The amounts “not found” accounted for 78, 79 and 69% of the injected dose, respectively. Ultrasonic desorption of the membranes revealed that verapamil was fixed by the membrane of the CVVHDF. In contrast, the different compartments of the MARS resulted in undetectable output concentration at the end of the session and even earlier. The mean concentrations of verapamil in the central compartment were undetectable at the end of the sessions. The mean ECs were concentration-dependent of about 20% of the injected dose. The mean amounts withdrawn by the activated charcoal compartment were 92, 82 and 89% of the injected dose. The mean charcoal ECs of the MARS cartridge was stable and in the order of 70% throughout the manipulations, independent of the concentration.

Conclusions: CVVHDF system in the developed model was efficient for verapamil removal, due to an ability of dialysis membrane to adsorb verapamil. Resin cartridge and hemodialysis components of MARS were useless in verapamil removal, both could be removed from the system allowing saving money and keeping a dialysis system available. Charcoal cartridge is responsible for almost all drug removal, replacing resin cartridge by a second charcoal cartridge could shorten and improve verapamil extraction.

Introduction

Poisonings are among the frequent causes of admission to intensive care units (ICUs) in the adult population in France [1]. A survey performed in ICUs located in the area of Ile-de-France, acute poisonings accounted for about 15% of the admission during the period from 1997 to 2008 [2].

Acute liver failure (ALF) is still associated with an important mortality rate. To date, the only treatment which permits significant survival in severe and irreversible liver failure is liver transplantation. To manage liver failure transiently or while awaiting transplantation, treatments aiming at replacing some liver functions were developed. Molecular Adsorbents Recirculating System (MARS) is an extracorporeal albumin dialysis system used in liver replacement in patients with primary or secondary ALF [3]. Albumin dialysis allows elimination of polar compounds but also albumin-bound toxins, poorly eliminated with conventional hemodialysis and hemofiltration. MARS was reported to be successful in *Amanita phalloides* poisonings as well as a limited number of albumin-bound drugs overdoses, including phenytoin, diltiazem, and paracetamol [4–7]. More recently, Wittebole and Hantson summarized the uses of MARS in the context of acute poisoning [8]. From a theoretical viewpoint, drugs that may benefit from MARS removal remain difficult to be defined. A logical way of thinking is to considerate as candidate for MARS a drug with a high affinity for human serum albumin (HSA). However, a publication investigating tacrolimus (a highly protein bound drug) removal using MARS system therapy showed no alteration induced by MARS system on tacrolimus blood concentrations [9].

The MARS system is a treatment aiming at increasing the elimination of unchanged drugs during the course of an overdose. In addition to the knowledge of the basic properties of the membrane used in the continuous veno-venous hemodiafiltration (CVVHDF) which is incorporated in the MARS system, the adsorptive capacities of the activated charcoal are also known to some extent. However, the global capability of the MARS system as well as the role of each extractive compartment in the process of drug elimination is a pending question that has never been addressed. Few studies have evaluated the role of the different components of MARS system for the treatment of drug poisoning [10,11]. These features highlighted the importance to develop an *ex vivo* model to address these questions and to compare the various modes of extracorporeal elimination including the CVVHDF alone and the MARS system.

Verapamil is a channel calcium blocker (CCB), highly bound to HSA and commonly involved in self-poisoning with a high mortality rate in spite of the development of various antidotes including insulin-glucose [12]. Furthermore, regarding optimization of supportive therapies, the results in a series of verapamil poisonings treated by means of arterio-venous extracorporeal life support, were rather disappointing. In contrast, a limited case series reported successful treatment with MARS of verapamil overdoses, meanwhile a case report using CVVHDF was also successful [13,14]. To date, there is no consensus to define the best extra-corporeal treatment for verapamil overdose. This issue underlines the importance to compare both system in term of efficacy and cost-effectiveness.

The aim of this study was to compare, *ex vivo*, the capability of CVVHDF and MARS system to promote the elimination of verapamil, with a particular emphasize of the respective role of the different extractive compartments of each extracorporeal device. In this *ex vivo* model, we selected a condition of experiment that would be the most advantageous for both extracorporeal systems resulting in the maximal capacities of each device to extract verapamil. To address this major issue, we selected a medium in the compartment figuring the patient devoid of proteins including albumin and of erythrocytes. Therefore, the results of the study should highlight what each device can maximally perform regarding the elimination of verapamil from a central compartment.

Materials and methods

1. Experimental protocol

a. CVVHDF System

CVVHDF dialysis was realized using a conventional hemodialysis system (Prismalflex®, Gambro, USA). The ST150 kit (Gambro, USA). Hemosol B0® (Gambro, USA) was used for dialysis, pre- and post-pump reinjection. Flow rate was 210 mL/min (12.6 L/H) for blood (Q_B), 2500 ml/H for dialysate (Q_D) with an effluent volume set at 4000 ml/H (Q_E). Liquid loss was hourly compensated with 500 ml/H for pre-injection ($Q_{pre-inj}$) and 1000 ml/H for post-injection ($Q_{post-inj}$). The resultant weight loss was ascertained to zero ml/H.

b. MARS system

Albumin dialysis was realized using the molecular adsorbents recirculating system (MARS®, Gambro, USA) as supplied in the MARS treatment kit, including the MARS® Flux and diaFlux dialyzers, diaMARS® AC250 charcoal unit, and diaMARS® IE250 ion exchanger. The device was coupled to a hemodialysis system (Prismalflex®, Gambro, USA) in the CVVHDF mode. MARS circuit was primed with 500 mL of HSA 200 g/L (Albunorm® 20%, Octapharma, Swiss). Flow rate was 210 mL/min for albumin circuit (Q_A), the other parameters were fixed at identical as those used in the CVVHDF system. There was neither net loss nor gain of weight in the central compartment during the complete session of MARS epuration.

c. Experimental conditions

A 5 liter dialysis solute (Hemosol B0®, Gambro, USA) was used as a central compartment representing the patient. Verapamil (Isoptine®, Abott, USA) was spiked into the central compartment at three different concentrations: 1, 2.5 and 5 mg/L, respectively. All experiments were performed in duplicate, without any anticoagulation. After an equilibration phase of 15 min, the central compartment was spiked with verapamil and was connected to the system. MARS and CVVHDF were run continuously except for minor breaks when effluents and dialysis solutes were changed every 1.25 h. The duration of the session for CVVHDF and MARS was set at 6 hours.

d. Location of solute samplings

i. Circuit linked to the central compartment

Samples were collected during the study period before and after the dialyzer for both the CVVHDF and the MARS systems.

ii. Circuit linked to the extractive system

During MARS dialysis, samples were drawn from the 6 ports located in the pre- and post-filter of the three extractive compartments of the extracorporeal circuit as presented in figure 1, and from the 2 circuit ports for CVVHDF dialysis (entering and leaving the dialyzer).

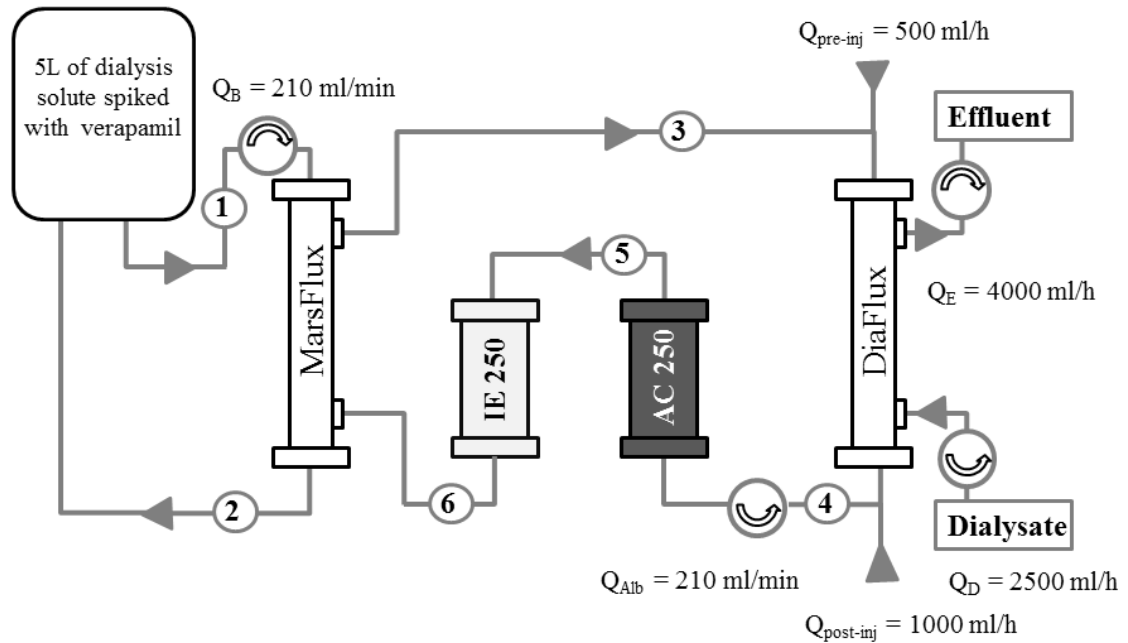


Figure 1. Schematic representation of MARS system with the 6 sampling sites and the different flow rates.

e. Timing of samplings

Samples were collected 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 and 360 min after treatment began. In the MARS system, albumin loss due to sampling was corrected at each time by albumin injection (3mL by sampling).

f. Tubes for sample collections and storage till analysis

Samples were realized in lithium heparinate tubes (BD Vacutainer[®], BD, USA) and stored at -20°C before analysis.

g. Substances measured in the samples

A previous study showed discrepancies in albumin concentrations measured in MARS circuit compared to theoretical concentration [15]. Consequently, albumin levels were evaluated in a MARS dialysis for the different samples sites. MARS kit and CVVHDF kit were conserved at the end of a test to evaluate the non-specific verapamil adsorption.

2. Verapamil concentration analysis

The HPLC grade acetonitrile, tert-buthylmethylether (TBME) and ethyl acetate were provided by Merck (Darmstadt, Germany). Ammonium formiate, protriptylin and verapamil standards were supplied by Sigma Aldrich (USA). Verapamil concentrations were measured using an UPLC system (Dionex Ultimate 3000, Thermo, USA) coupled with a tandem mass spectrometer (TSQ Quantiva, Thermo, USA). Analyte separation was carried out on a Hypersil GOLD Thermo column (100 x 2.1mm, 1.9µm) maintained at 40°C. The device was completed with a pre-column (Thermo Hypersil GOLD 10 x 2.1mm, 5µm). Mobile phase A was ammonium formiate 2 mM with formic acid 0.1%, and mobile phase B acetonitrile, the gradient was isocratic with 55% A and 45% B. 25µL of protriptylin 1µg/mL (internal standard) and 200µL of phosphate buffer pH = 5.9 were added to 100µL of sample. Albumin samples were previously deproteinized by 200µL of acetonitrile. Mixture was extracted using 500µL of organic solvent (TBME/ethyl acetate, 50:50 v:v). After evaporation of the organic phase and reconstitution with 1mL of the mobile phase, 5µL of the sample extract were injected in the UPLC system column. Verapamil peak area ratios were used for quantification (verapamil/internal standard). The method was validated according to EMA guidelines over the

concentration range 10-1000 ng/mL in albumin and in dialysate samples. Stability of verapamil at room temperature was also evaluated and confirmed over a period of one week.

a. Extraction of verapamil from solid parts

Dialyzers DiaFlux, MarsFlux and ST150 kit were analyzed following this procedure. Cartridges were sawn to liberate capillaries then they were sonicated 24h in methanol with 0.1% of hydrochloric acid. Charcoal and resin cartridges were eluted four times with 80 mL of the same solvent. Extract were quantified following the same procedure as dialysate and albumin samples.

3. Statistical analysis

Graphs and descriptive statistics were realized using GraphPad Prism version 6.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA). Verapamil removal during dialysis was evaluated using extraction coefficient (E): $E = \frac{Ca-Cv}{Ca}$, Ca is the concentration entering the extractive compartment (ng/mL) and Cv the concentration leaving the extractive compartment (ng/mL). E was evaluated for each extractive compartments of the MARS system in both circuits: the one connected to the central compartment the other one to the extractive system.

Measures in effluents were performed in each filled pocket when the pocket was full as signaled by each device, CVVHDF and MARS, by continuous weight measurement. The cumulative elimination was assessed by the sum of the product of the measured concentrations of verapamil with the exact volumes of effluent.

Assessment of elimination on the side of the central compartment figuring the patient was conducted by the calculation of the area under the curves (AUC) using concentrations measured at the input and output level. The difference between the input and output areas ($AUC_{\Delta 1-2} = AUC_1 - AUC_2$) was multiplied by the flow of the solute into the dialyzer. This method was used for the CVVHDF and MARS system. On the side of extractive device, global assessment was made using the method of AUC of input and output concentrations through the MARS Flux dialyzer as described above ($AUC_{\Delta 3-6} = AUC_3 - AUC_6$). The efficacy of the CVVHDF was performed by the method of AUC of the concentrations measured before and after the DiaFlux dialyzer ($AUC_{\Delta 3-4} = AUC_3 - AUC_4$) and using the cumulative elimination into the effluent. The efficacy of the activated charcoal was performed using the method of the difference of AUC in the input and output sites ($AUC_{\Delta 4-5} = AUC_4 - AUC_5$). The effect of the ion exchanger cartridge

was assessed using the method of the difference of areas under the curve in the input and output sites ($AUC_{\Delta 5-6} = AUC_5 - AUC_6$). Finally, at the completion of the session the concentration of verapamil remaining in the central compartment was measured and the pocket was weighted to assess the exact resting volume.

Assessment of elimination was also conducted using the balance between input and elimination of verapamil. With MARS system the amount of verapamil injected into the central compartment was compared to the amount of verapamil still persisting at the end of the session cumulated with the amount eliminated in the effluent, the amount adsorbed by activated charcoal and the amount eliminated by anion exchange resin. With CVVHDF, the amount of verapamil injected into the central compartment was compared to the amount of verapamil still persisting at the end of the session cumulated with the amount eliminated in the effluent.

Results

1. CVVHDF

Verapamil concentrations mean (n=2) evolution versus time in the sample port 1 is shown in figure 2. The CVVHDF induced a decrease in concentrations of verapamil from the solute in the in- and out- dialyzer at the three concentrations which occurred within the first hour of the session. However, the concentrations of verapamil were still detectable at the completion of the 6-hours session. C_{0H} and C_{6H} experimental values are presented in table 1. The time-courses of the values of the extraction coefficients between port 1 and 2 are presented in figure 3. In spite the flow of the solute coming from and returning to the central compartment was maintained at 210 ml/min, there was a sharp decline in the values of the extractive coefficient at the three concentrations, ranging from 75 % at the time of initiation of the session to 41 % one hour after for the 5mg/L verapamil concentration, 74 % and 46 % for the 2.5mg/L, and 69 % and 52 % for the 1 mg/L concentrations. There was even negative extraction coefficient at 2 h post injection and later suggesting a progressive release of verapamil from the dialyzer into the circuit of the central compartment.

Cumulative amounts of verapamil recovered at the end of simulations are presented in table 2. Amounts of verapamil remaining in dialysis solute and cumulative quantity recovered in effluents 2.5 hours after treatment began for CVVHDF are presented in table 3. Elimination assessments calculated from AUC_{Δ} are presented in table 4.

Stability of verapamil was tested in Hemosol B0 solute at room temperature over a week showing a variation of less than 15%.

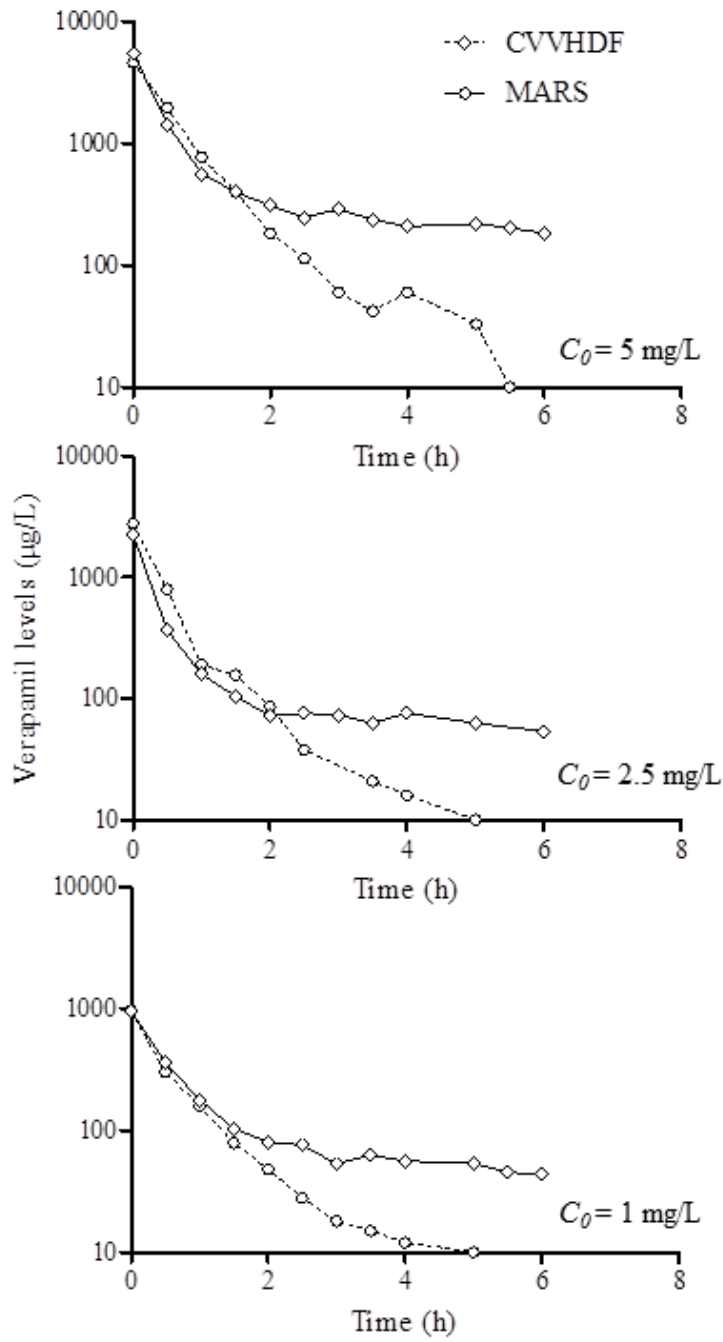


Figure 2. Verapamil concentrations evolution versus time in the sample port 1 at the three concentrations.

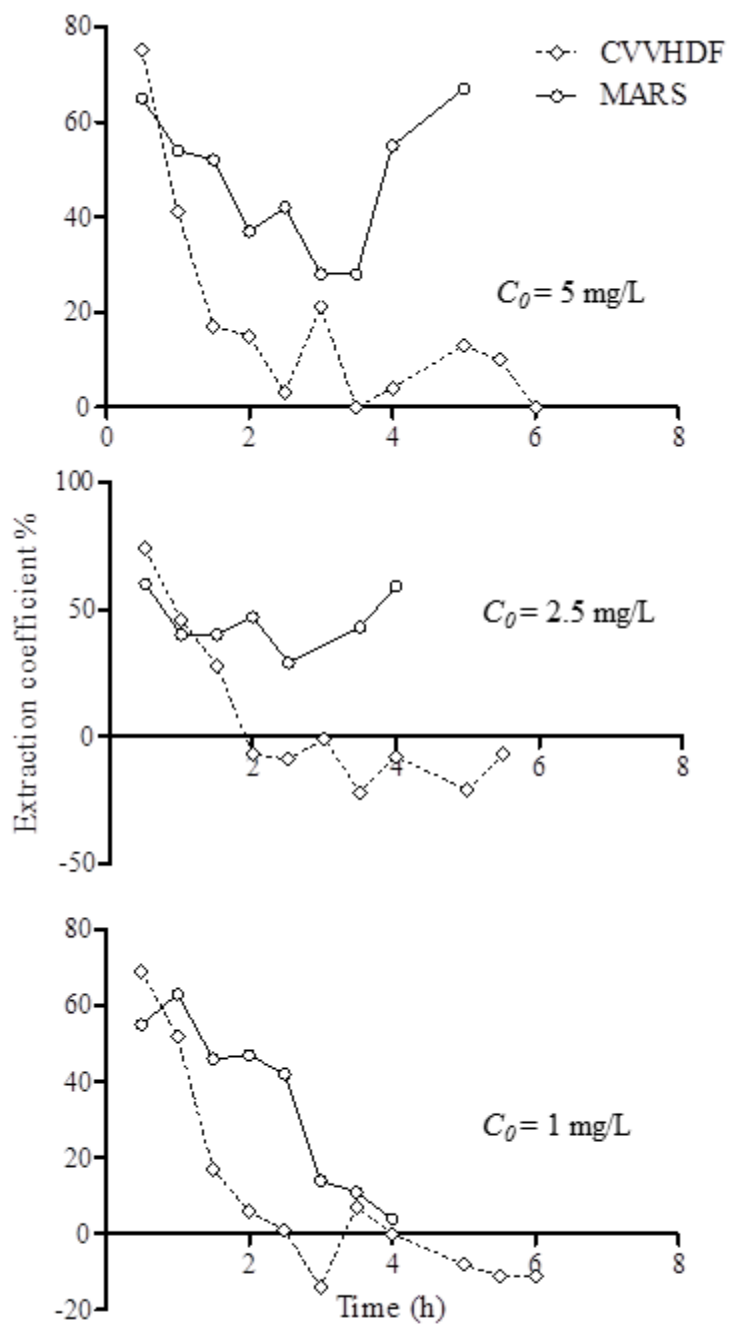


Figure 3. The time-courses of the values of the extraction coefficients between port 1 and 2.

	CVVHDF			MARS		
C₀ theoretical (µg/L)	1000	2500	5000	1000	2500	5000
C₀ measured (µg/L)	964	2271	5500	958	2761	4650
C_{6H} measured (µg/L)	44	54	184	0	0	0

Table 1. C₀ and C_{6H} experimental values measured with both systems.

	CVVHDF		
Initial dose (µg)	5000	12500	25000
Amount remaining in dialysis solute (µg)	230 (5%)	285 (2%)	918 (4%)
Amount recovered in effluent (µg)	1694 (34%)	2351 (19%)	8000 (32%)
Total amount recovered (µg)	1924 (39%)	2636 (21%)	8918 (36%)
Missing quantity (µg)	3076 (61%)	9864 (79%)	16083 (64%)

Table 2. Cumulative amounts of verapamil recovered at the end of the simulations with CVVHDF system.

2. MARS

In central compartment, verapamil elimination is presented in figure 2, concentrations mean (n=2) evolution versus time in the sample port 1 is shown. C_{0H} and C_{6H} experimental values are presented in table 1. The time-courses of the values of the extraction coefficients between port

1 and 2 are presented in figure 3. Elimination assessments calculated from AUC_{Δ} between port 1 and 2 are presented in table 4.

In albumin circuit, verapamil kinetics in the four sample ports is presented in figure 4. The time-courses of the values of the extraction coefficients for DiaFlux, charcoal and anion exchange resin are presented in figure 5. Amount eliminated by each component extrapolated from AUC_{Δ} are presented in table 5.

	CVVHDF		
Initial dose (μg)	5000	12500	25000
Cumulate amount in the effluent (μg)	927 (19%)	1185 (10%)	4477 (18%)
Residual amount in the spiked solute (μg)	378 (8%)	380 (3%)	1208 (5%)
Missing quantity (μg)	3695 (73%)	10935 (87%)	19315 (77%)

Table 3. Amount of verapamil remaining unknown in the dialysis solute compared to effluent analysis 2.5 hours after CVVHDF simulation began.

	CVVHDF			MARS		
Theoretical amount for 5L (μg)	5000	12500	25000	5000	12500	25000
$AUC_{\Delta 1-2}$ ($\mu\text{g/L/h}$)	419	720	2204	419	946	2236
Amount eliminated extrapolated from $AUC_{\Delta 1-2}$ (μg)	5282	9066	27770	5282	11922	28167
Fraction from theoretical initial amount (%)	106%	73%	111%	106%	95%	113%

Table 4. Amount eliminated with both systems extrapolated from $AUC_{\Delta 1-2}$.

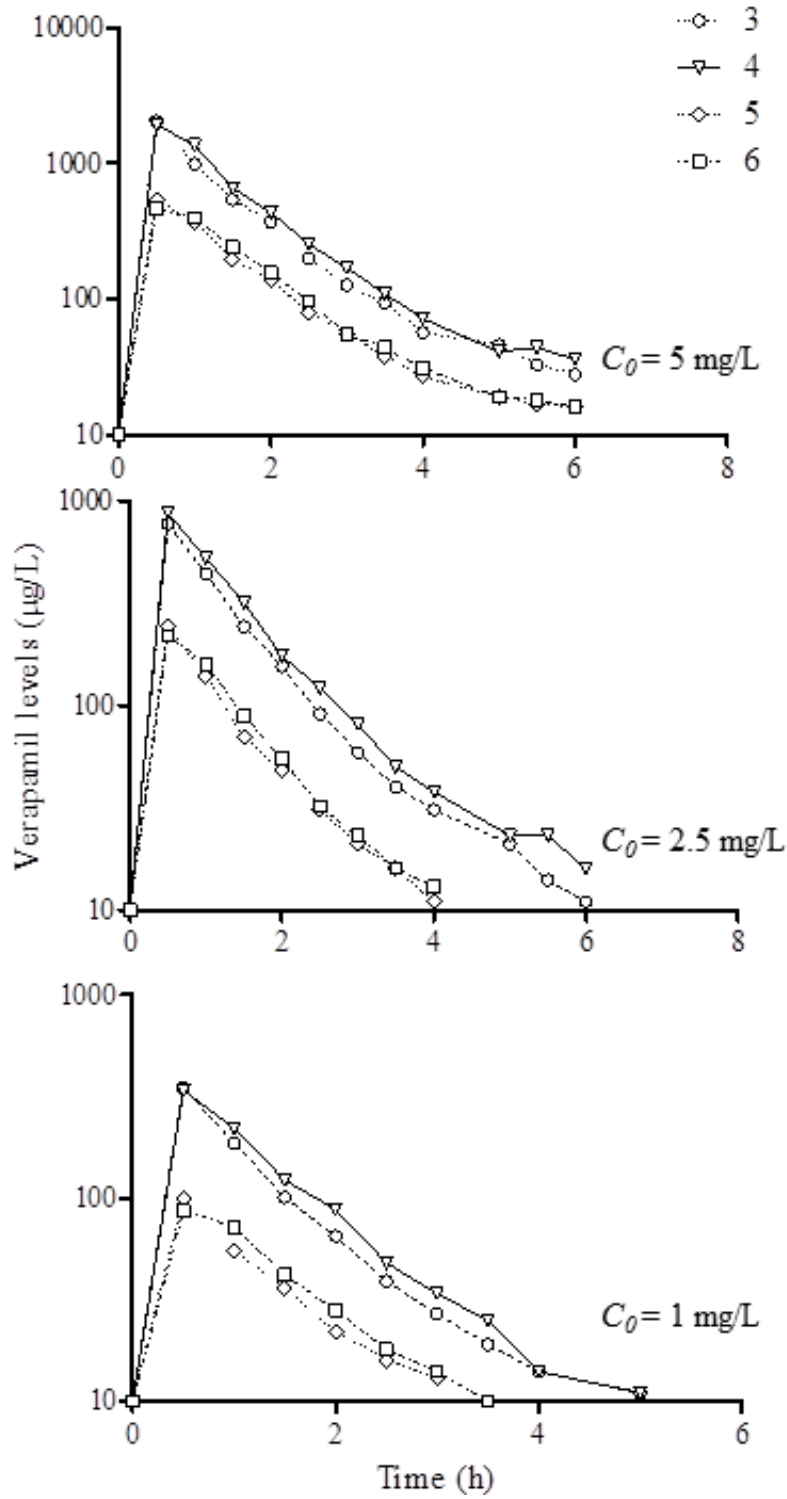


Figure 4. Evolution of verapamil concentrations for the four sample ports in albumin circuit.

3. Evaluation of non-specific adsorption

Non-specific adsorption was evaluated on a ST150 kit following a CVVHDF simulation with a theoretical initial amount of 12.5 mg. Cumulative verapamil amount found were 0.2 mg in tubings, and 5.6 mg in the dialysis membrane, representing respectively 1.6% and 45% of the initial amount. Adsorption on MARS circuit components was evaluated following a simulation with a theoretical initial amount of 25 mg. Amount recovered on MarsFlux capillaries, DiaFlux capillaries, charcoal cartridge and resin cartridge were respectively: 0.1, 0.4, 0.8 and 0.05 mg.

		MarsFlux Global amount entering the albumin circuit (AUC_{Δ3-6})	DiaFlux (AUC_{Δ3-4})	Charcoal (AUC_{Δ4-5})	Resin (AUC_{Δ5-6})	Effluent (cumulated amounts)
Qi 5000μg	Amount eliminated (μg)	3270	-573	3966	-123	198
	Fraction from initial amount	65%	-11%	79%	-2%	4%
Qi 12500μg	Amount eliminated (μg)	7938	-2277	10410	-195	970
	Fraction from initial amount	64%	-18%	83%	-2%	8%
Qi 25000μg	Amount eliminated (μg)	18919	-3629	22831	-284	900
	Fraction from initial amount	76%	-15%	91%	-1%	4%

Table 5. Amount eliminated in albumin circuit extrapolated from AUC_Δ before and after each MARS component and cumulated amounts measured in effluent.

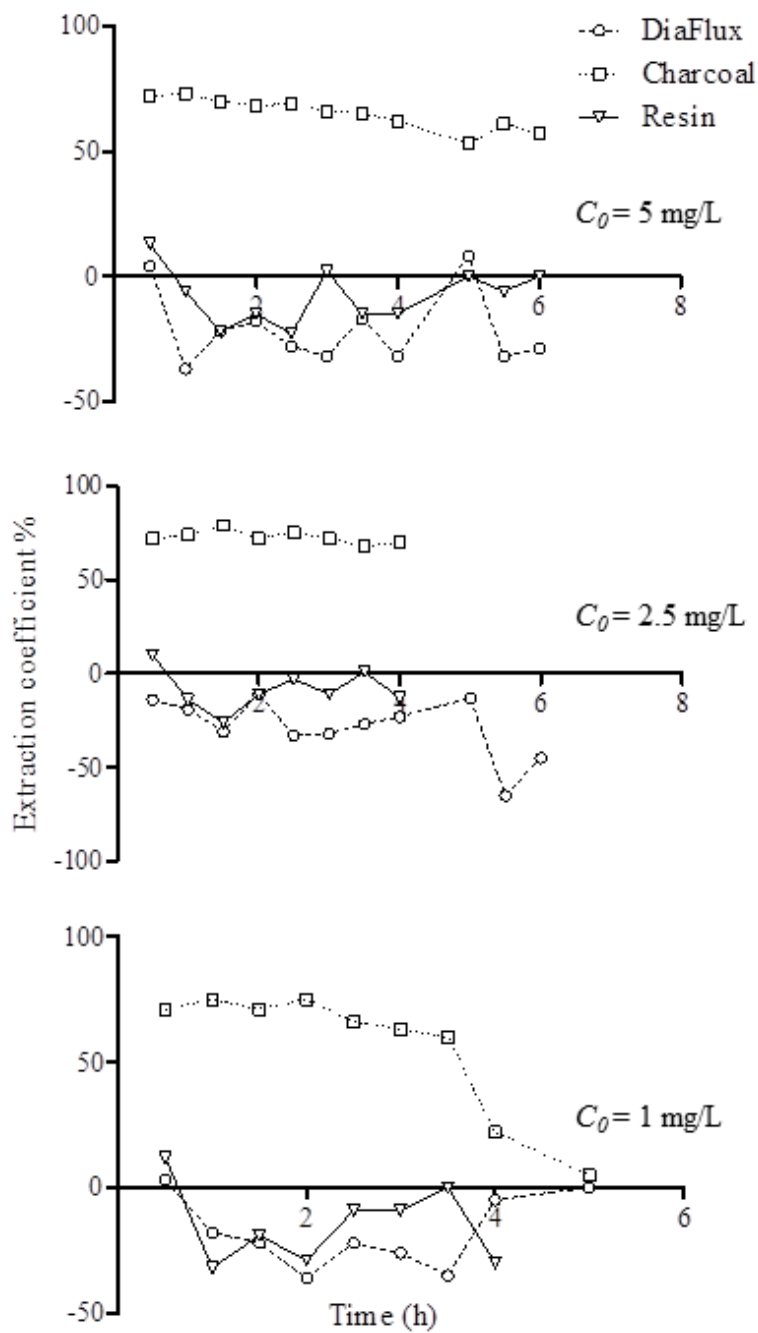


Figure 5. Evolution of extraction coefficients in albumin circuit for the three extractive parts.

Discussion

The present study investigated and compared the efficacy of two dialysis systems for a verapamil *ex vivo* therapy. We observed with both systems a rapid decrease in verapamil concentration over the first hour, with a faster elimination than observed in human after intravenous administration ($t_{1/2} = 5$ h) [16]. These observations corroborate clinical studies highlighting a good efficacy for both systems [13,14]. Verapamil initial amount in central compartment was checked by measuring the initial concentration in the 5L solute and by measuring the amount eliminated from AUC_{Δ} which were accurate.

Verapamil concentration with CVVHDF system decreases to reach a plateau after two hours proportional to the initial concentration, from 44 to 184 ng/mL. In the same way, extraction coefficient decreases quickly during the first hour, regardless to the initial concentration. After two hours, it oscillates between positive and negative values for CVVHDF sessions. An adsorption on dialysis membrane with CVVHDF followed by a slow release may explain these phenomena (plateau and oscillation). Effluent amounts for CVVHDF are much lower than expected, with a fraction of initial dose recovered ranging from 21% to 39%. The amount of verapamil missing 2.5 hours after the dialysis began underlines a quick adsorption of verapamil inside the CVVHDF system. To explore this hypothesis, solid parts of ST150 Kit were analyzed and they highlighted a non-specific adsorption on dialysis membrane higher than 45%. Extraction yield cannot be evaluated, as real quantity fixed on dialysis membrane remains unknown. However, stability of verapamil was previously evaluated to rule out the possibility of verapamil degradation in the dialysis solute, confirming that missing amount should be fixed to dialysis membrane. In CVVHDF system, 5 mechanisms are responsible for the molecular removal: osmosis, diffusion, ultrafiltration, convection and to a lesser extent adsorption. In our context, adsorption is the main mechanism responsible for the purification. To our knowledge this observation has never been presented in actual literature. Akinci et al. documented a case with a successful use of CVVHDF in verapamil poisoning, which probably do not rely on common dialysis, but adsorption like MARS [14].

Verapamil concentration with MARS system in central compartment decreases all along the simulation, and reaches a level under 10 ng/mL regardless to the initial amount. MARS simulations exhibited an extraction coefficient superior to CVVHDF staying over 30% all along the simulation, with a slower but positive decrease.

Verapamil concentration in albumin circuit were equivalent before and after DiaFlux and resin cartridge at the three different concentrations with E oscillating between positive and negative values (Figure 5). AUC_{Δ} calculated for Diaflux and anion exchange resin were negative, consequently amount eliminated from these two components were also negative. This observation indicates a release of verapamil from these two parts from 0.5 to 6 hours. Necessarily, a step of non-specific fixation of verapamil happened previously, from 0 to 0.5 hour. This step is not highlighted in our observations as no samples were drawn during this period. Cumulative amounts of verapamil found in effluent were lesser than amount released from Diaflux membrane into albumin circuit. These results bring out inefficacy of the two components in verapamil removal.

Conversely, charcoal cartridge is responsible for almost all verapamil removal, E remaining around 70% until verapamil reaches concentrations under 10 ng/mL post charcoal cartridge, except for 5 mg/L simulation where verapamil concentration is 16 ng/mL at 6 hours. Amount eliminated through charcoal cartridge extrapolated from AUC_{Δ} represent almost all verapamil removal: from 79% to 91%. This increase in verapamil removal was correlated to the initial amount in central compartment (table 5). Previous MARS studies using a compartmental approach convey to the same conclusion with midazolam, fentanyl, phenytoin, moxifloxacin, meropenem and paracetamol: charcoal remain the major site of removal [5,7,10,11]. These results suggest replacing anion exchange resin with an additional activated charcoal cartridge in case of treatment for albumin bound drug intoxication. The fact that verapamil (mainly bound to alpha-1-acid glycoprotein) was removed with MARS system corroborates the study of Sen et al. and implies that MARS may have the capacity to remove drugs from binding sites on others plasmatic protein [10]. We notice that verapamil amount entering in albumin circuit extrapolated from MarsFlux AUC_{Δ} is smaller than expected (Table 5). This point may be explained by an underestimation of AUC, indeed AUC between 0 and 0.5 hour was extrapolated to 0 ng/mL up to 0.5 hour concentrations for each part, although these concentrations were probably higher. A second explanation is the non-specific adsorption onto the MarsFlux membrane. A release from Diaflux membrane was observed, knowing that the composition of both membranes is similar, a non-specific adsorption may also happen with MarsFLux. However, this hypothesis remain difficult to prove using MarsFlux AUC_{Δ} as this component is the way of entrance of verapamil into the albumin circuit. Amounts recovered on MARS components are much lower than CVVHDF. Our results could be explained by a weak extraction yield and a lower verapamil adsorption onto these dialyzers. Dialysis membranes

(MarsFlux and DiaFlux) present a different composition and permeability from ST150 kit membrane. The liquid in contact with these membranes is also different (Albumin solute and Hemosol B0), albumin may limit the adsorption of verapamil to the membrane surface. In the same way, quantity eluted from charcoal and resin cartridges are lower than expected values, although charcoal is the main site for verapamil adsorption.

Regarding simulation duration, 2 hours of dialysis allowed achieving a removal superior to 90% regardless of the initial concentration. In our experimental conditions this period is sufficient to provide a satisfactory treatment. These observations are difficult to transpose in humans as albumin is absent in the dialysis solute representing patient compartment which should slow down removal, as verapamil is bound to plasmatic protein in a rate of 90% [16]. Furthermore, there is no release of verapamil from tissue as it should appear in clinical cases, verapamil presenting a large distribution volume ranging from 2.5 to 6.5 L/Kg [17].

One of the limitations of this study was the absence of HSA in the dialysis solute representing the patient compartment. This study was done in optimal conditions; further studies should be realized to investigate the impact of additional albumin in dialysis solute. To validate our *ex vivo* model, our results should be compared to a clinical treatment. Flow rates importance on drug removal was not evaluated in this study, although it is a parameter easily alterable. Flow rate modifications need to be done on a complete MARS session investigating that point, and constitute a study itself.

Conclusion

Both systems present a good and similar efficacy for verapamil removal. The main mechanism responsible for verapamil removal using CVVHDF is the adsorption on dialysis membrane, with a consecutive release of verapamil during the dialysis session. Charcoal cartridge is almost entirely responsible for verapamil removal in MARS system. Albumin concentrations into MARS circuit are lower than expected, but does not alter verapamil removal.

References:

- [1] R. Brandenburg, S. Brinkman, N.F. de Keizer, J. Meulenbelt, D.W. de Lange, In-Hospital Mortality and Long-Term Survival of Patients With Acute Intoxication Admitted to the ICU*, *Crit. Care Med.* 42 (2014) 1471–1479. doi:10.1097/CCM.0000000000000245.
- [2] F.J. Baud, P. Martel, P. Aergenter, B. Guidet, Evolution des intoxications admises en réanimation: données CUB-Réa 1997-2008, in: *Médicam. Psychotr. Consomm. Pharmacodépendances*, Les éditions Inserm, 2012: pp. 489–500.
- [3] G. Donati, G. La Manna, G. Cianciolo, V. Grandinetti, E. Carretta, M. Cappuccilli, L. Panicali, M. Iorio, F. Piscaglia, L. Bolondi, L. Coli, S. Stefoni, Extracorporeal detoxification for hepatic failure using molecular adsorbent recirculating system: depurative efficiency and clinical results in a long-term follow-up, *Artif. Organs.* 38 (2014) 125–134. doi:10.1111/aor.12106.
- [4] C. Lionte, L. Sorodoc, V. Simionescu, Successful treatment of an adult with *Amanita phalloides*-induced fulminant liver failure with molecular adsorbent recirculating system (MARS), *Romanian J. Gastroenterol.* 14 (2005) 267–271.
- [5] S. Sen, N. Ratnaraj, N.A. Davies, R.P. Mookerjee, C.E. Cooper, P.N. Patsalos, R. Williams, R. Jalan, Treatment of phenytoin toxicity by the molecular adsorbents recirculating system (MARS), *Epilepsia.* 44 (2003) 265–267.
- [6] N. Pichon, B. François, C. Chevreuil, J.M. Gaulier, Albumin dialysis: a new therapeutic alternative for severe diltiazem intoxication, *Clin. Toxicol. Phila. Pa.* 44 (2006) 195–196.
- [7] H. de Geus, R. Mathôt, B. van der Hoven, M. Tjoa, J. Bakker, Enhanced paracetamol clearance with molecular adsorbents recirculating system (MARS®) in severe autointoxication, *Blood Purif.* 30 (2010) 118–119. doi:10.1159/000319955.
- [8] X. Wittebole, P. Hantson, Use of the molecular adsorbent recirculating system (MARS™) for the management of acute poisoning with or without liver failure, *Clin. Toxicol.* 49 (2011) 782–793. doi:10.3109/15563650.2011.624102.

- [9] H.A. Personett, S.L. Larson, E.N. Frazee, S.L. Nyberg, N. Leung, Z.M. El-Zoghby, Impact of molecular adsorbent recirculating system therapy on tacrolimus elimination: a case report, *Transplant. Proc.* 46 (2014) 2440–2442. doi:10.1016/j.transproceed.2014.02.013.
- [10] S. Sen, L.M. Ytrebø, C. Rose, O.-M. Fuskevaag, N.A. Davies, G.I. Nedredal, R. Williams, A. Revhaug, R. Jalan, Albumin dialysis: a new therapeutic strategy for intoxication from protein-bound drugs, *Intensive Care Med.* 30 (2004) 496–501. doi:10.1007/s00134-003-2141-0.
- [11] G.A. Roth, W. Sipos, M. Höferl, M. Böhmendorfer, E.M. Schmidt, H. Hetz, K. Schebesta, D. Klaus, M. Motal, W. Jäger, C.G. Krenn, The effect of the molecular adsorbent recirculating system on moxifloxacin and meropenem plasma levels, *Acta Anaesthesiol. Scand.* 57 (2013) 461–467. doi:10.1111/aas.12041.
- [12] C.A. Hofer, J.K. Smith, M.F. Tenholder, Verapamil intoxication: a literature review of overdoses and discussion of therapeutic options, *Am. J. Med.* 95 (1993) 431–438.
- [13] N. Pichon, A. Dugard, M. Clavel, J.B. Amiel, B. François, P. Vignon, Extracorporeal albumin dialysis in three cases of acute calcium channel blocker poisoning with life-threatening refractory cardiogenic shock, *Ann. Emerg. Med.* 59 (2012) 540–544. doi:10.1016/j.annemergmed.2011.07.029.
- [14] E. Akıncı, N.B. Akıllı, R. Koylu, M.O. Gonen, Successful resuscitation of a patient with continuous venovenous hemodiafiltration following intoxication from verapamil and trandolapril, *Kaohsiung J. Med. Sci.* 30 (2014) 321–322. doi:10.1016/j.kjms.2013.04.008.
- [15] K. Drexler, C. Baustian, G. Richter, J. Ludwig, W. Ramlow, S. Mitzner, Albumin Dialysis Molecular Adsorbents Recirculating System: Impact of Dialysate Albumin Concentration on Detoxification Efficacy, *Ther. Apher. Dial.* 13 (2009) 393–398. doi:10.1111/j.1744-9987.2009.00757.x.
- [16] Abott, RCP verapamil, (2013).
- [17] R.C. Baselt, *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*, 9th ed., Biomedical Publications, 2011.

Publication n°4

**Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS) and Continuous
Veno-venous Hemodiafiltration (CVVHDF) for diltiazem removal: an ex
vivo compartmental analysis**

Nicolas Fabresse, Islam Amine Larabi, Elodie Lamy, Bruno Mégarbane,
Jean-Claude Alvarez

Soumis dans *Artificial Organs*

Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS) and Continuous Veno-venous Hemodiafiltration (CVVHDF) for diltiazem removal: an ex vivo compartmental analysis

Nicolas Fabresse^{1,2} Islam Amine Larabi^{1,2}, Elodie Lamy¹, Bruno Mégarbane³, Jean-Claude Alvarez^{1,2}

¹*MassSpecLab, Plateforme de Spectrométrie de Masse, UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, Université Versailles Saint-Quentin, 2 Avenue de la Source de la Bièvre, 78180 Montigny le Bretonneux (France)*

²*Laboratoire de Pharmacologie – Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire Raymond Poincaré, AP-HP, 104 Boulevard R. Poincaré, 92380 Garches (France)*

³*Réanimation Toxicologique, Centre Hospitalier Universitaire Lariboisière, 75010 Paris (France)*

Abstract:

Molecular adsorbent recirculating system (MARS) has shown to be suitable in patients with acute diltiazem poisoning. No analytical studies have quantified the extractive efficiency of the different compartments of MARS. The objective of the present study was to evaluate the efficacy of MARS vs continuous veno-venous hemodiafiltration (CVVHDF) systems after 6h-sessions in an *ex vivo* model devoid of protein and erythrocytes to assess their maximum extractive capability. Diltiazem poisoning was simulated in a central compartment consisting in a 5 L dialysis solute spiked with diltiazem at two different toxic concentrations: 750 and 5000 µg/L.

For CVVHDF, mean extraction coefficients ($EC = \frac{\text{in concentration} - \text{out concentration}}{\text{in concentration}}$) were concentration-dependent with a decrease all along the dialysis. At the end of the sessions the mean amounts remaining in the central compartment were 8% and 7% of the initial dose at 750 and 5000 µg/L, respectively. The mean cumulative amounts found in the effluent were 60% and 75% of the initial dose, respectively. The missing amounts accounted for 32% and 18% of the initial dose, respectively, corresponding probably to adsorption to membrane dialysis. In contrast, the different compartments of the MARS resulted in undetectable output concentration earlier than the end of the session. The mean concentrations of diltiazem remaining in the central compartment were <1 µg/L at the end of the sessions. Global ECs were around 50% all along the simulation at both concentrations. The mean charcoal ECs cartridge of the MARS was stable and in the order of 80% throughout the manipulations and independent of the concentration.

CVVHDF system in the developed model was efficient for diltiazem removal, mainly by diffusion, convection and to a lesser extent by adsorption to the dialysis membrane. Resin cartridge and hemodialysis components of MARS are useless in diltiazem removal, both could be removed from the system allowing saving money and keeping a dialysis system available. Charcoal cartridge in MARS seems to be responsible for almost all drug removal; replacing resin cartridge by a second charcoal cartridge could probably shorten the treatment and improve diltiazem epuration.

Introduction

Poisonings are among the frequent causes of admission to intensive care units (ICUs) in the adult population at least in France and in contrast with other countries including the Netherlands [1]. Indeed, a survey performed in ICUs located in the area of Ile-de-France, acute poisonings as defined by the International classification of Diseases, from various origins, including medicinal drugs and addictive and recreative substances, accounted for about 15% of the admission during the period from 1997 to 2008 [2].

Organs most frequently affected by poisonings are the central nervous system, the lung, and the cardio-circulatory system. Due to serious and persistent cardiovascular disturbances, kidney and liver dysfunctions or even failures can result, with the liver turning many drugs into inactive metabolites. Furthermore, several drugs and addictive/recreative substances exhibit direct hepatotoxicity, including acetaminophen, non-steroidal anti-inflammatory agents, and MDMA.

Acute liver failure (ALF) is still associated with an important mortality rate. To date, the only treatment which permits significant survival in severe and irreversible liver failure is liver transplantation. In order to manage severe but transient liver failure as well as irreversible liver failure waiting for transplantation, treatments aiming at replacing some liver functions were developed. Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS) is an extracorporeal albumin dialysis system used in liver replacement in patients with primary or secondary ALF [3]. Albumin dialysis allows elimination not only of polar compounds but also albumin-bound toxins, which are poorly eliminated with conventional hemodialysis and hemofiltration. MARS was reported to be successful in *Amanita phalloides* poisonings as well as a limited number of albumin-bound drugs overdoses, including phenytoin, diltiazem, and paracetamol [4–7]. More recently, Wittebole and Hantson summarized the uses of MARS in the context of acute poisoning [8]. From a theoretical viewpoint, drugs that may benefit from MARS removal remain difficult to be defined. A logical way of thinking is to considerate as candidate for MARS a drug with a high affinity for human serum albumin (HSA). However, a publication investigating tacrolimus (a highly protein bound drug: >98.8%) removal using MARS therapy showed no alteration induced by MARS on tacrolimus blood concentrations [9,10].

The MARS considered from a toxicological viewpoint is a treatment aiming at increasing the elimination of unchanged drugs during the course of an overdose. Consequently, MARS belongs to the class of toxicokinetic treatment in clinical toxicology. In addition to the

knowledge of the basic properties of the membrane used in the continuous veno-venous hemodiafiltration (CVVHDF) which is incorporated in the MARS system, the adsorptive capacities of the activated charcoal are also known to some extent. However, the global capability of the MARS system as well as the role of each extractive compartment in the process of drug elimination is a pending question that has never been addressed. Few studies realized a comprehensive evaluation of MARS system for the treatment of drug poisoning [11,12]. These features highlighted the importance to develop an *ex vivo* model to address these questions and to compare the various modes of extracorporeal elimination including the CVVHDF alone and the MARS system.

According to the 2017 American Association of Poison Control Centers annual rapport, cardiovascular drugs (calcium antagonists, beta blockers, miscellaneous cardiovascular drugs, angiotensin converting enzyme inhibitors) are the second pharmacological class associated with the largest number of fatalities [13]. Diltiazem is a channel calcium blocker (CCB), highly bound to HSA (80%) exhibiting a high distribution volume of 5.3 ± 1.7 L/kg [14,15]. Diltiazem is commonly involved in self-poisoning with a high mortality rate in spite of the development of various antidotes including insulin-glucose [16–18]. In contrast, a limited case series reported successful treatment with MARS of diltiazem overdoses [6,19,20]. Hemodialysis was also applied to manage a patient with a diltiazem poisoning, highlighting a net decrease in diltiazem concentration [21]. To date, there is no consensus to define the best extra-corporeal treatment for diltiazem overdose. This issue underlines the importance to compare both system in term of efficacy and cost-effectiveness.

The aim of this study was to compare, *ex vivo*, the capability of CVVHDF and MARS system to promote the elimination of diltiazem, with a particular emphasize of the respective role of the different extractive compartments of each extracorporeal device. In this *ex vivo* model, we selected a condition of experiment that would be the most advantageous for both extracorporeal systems resulting in the maximal capacities of each device to extract diltiazem. To address this major issue, we selected a medium in the compartment figuring the patient devoid of proteins including albumin and of erythrocytes. Therefore, the results of the study should highlight what each device can maximally perform regarding the elimination of diltiazem from a central compartment.

1. Materials and methods

a. Experimental protocol

i. CVVHDF System (fig 1A)

CVVHDF dialysis was realized using a conventional hemodialysis system (Prismalflex[®], Gambro, USA) and the ST150 kit (Gambro, USA). It contains a hollow fiber composite filter (tubing diameter: 240 μm and a thickness: 50 μm), the internal effective area is 1.5 m^2 and the volume is 150 mL. Hemosol B0[®] (Gambro, USA) was used for dialysis, pre- and post-pump reinjection. Flow rate was 12.6 L/h for blood (Q_B), 2.5 L/h for dialysate (Q_D) with an effluent volume set at 4 L/h (Q_E). Liquid loss was hourly compensated with 0.5 L/h for pre-injection ($Q_{\text{pre-inj}}$) and 1 L/h for post-injection ($Q_{\text{post-inj}}$). The resultant weight loss was ascertained to zero L/h.

ii. MARS system (fig 1B)

Albumin dialysis was realized using the molecular adsorbents recirculating system (MARS[®], Gambro, USA) as supplied in the MARS treatment kit, including the MARS[®] Flux (internal effective area 2.1 m^2) and DiaFlux dialyzers (internal effective area 1,4 m^2), diaMARS[®] AC250 charcoal unit, and diaMARS[®] IE250 ion exchanger. The device was coupled to a hemodialysis system (Prismalflex[®], Gambro, USA) in the CVVHDF mode. MARS circuit was primed with 500 mL of HSA 200 g/L (Albunorm[®] 20%, Octapharma, Swiss). Flow rate was 12.6 L/h for albumin circuit (Q_{Alb}), others parameters were fixed identical as those used in the CVVHDF system. There was neither net loss nor gain of weight in the central compartment during the complete session of MARS epuration.

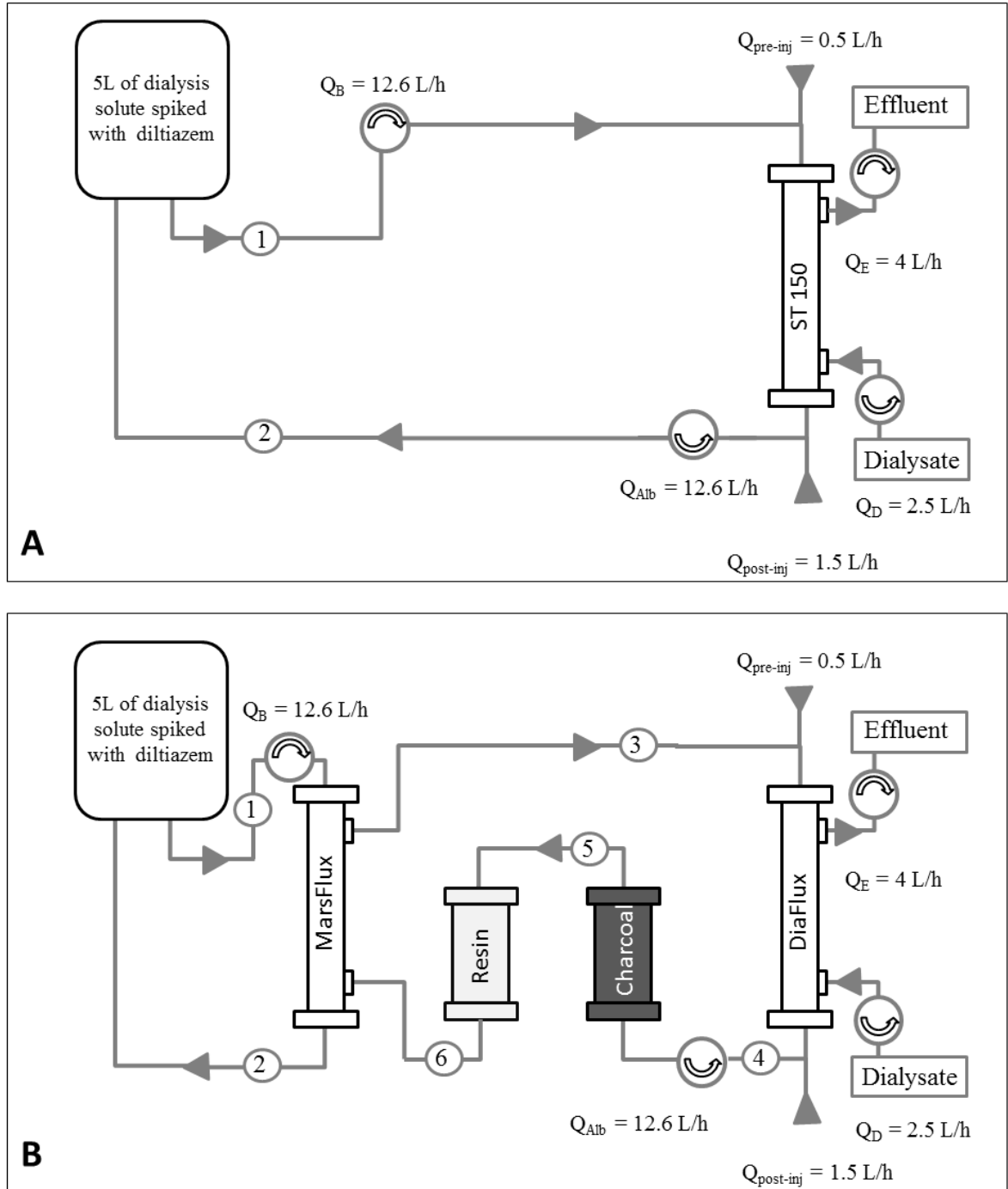


Figure 1. Schematic representation of CVVHDF (A) and MARS (B) systems with the sampling sites and the different flow rates.

iii. Experimental conditions

A 5 L dialysis solute (Hemosol B0[®], Gambro, USA) was used as a central compartment representing the patient. Diltiazem (Tildiem[®], Sanofi, France) was spiked into the central compartment at two different concentrations: 750 and 5000 µg/L. All experiments were performed in duplicate, without any anticoagulation. After an equilibration phase of 15 min, the central compartment was spiked with diltiazem and was connected to the system. MARS and CVVHDF were run continuously except for minor breaks when effluents and dialysis solutes were changed every 1.25 h. The duration of the session for CVVHDF and MARS was set at 6 h.

iv. Location of solute samplings

1. Circuit linked to the central compartment

Samples were collected during the study period before and after the dialyzer for both the CVVHDF and the MARS systems.

2. Circuit linked to the extractive system

During MARS dialysis, samples were drawn from the 4 ports located in the pre- and post-filter of the three extractive compartments of the extracorporeal circuit as presented in figure 1, and from the 2 circuit ports for CVVHDF dialysis (entering and leaving the dialyzer).

v. Timing of samplings

Samples were collected 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 and 360 min after treatment began. In the MARS system, albumin loss due to sampling was corrected at each time by albumin injection (3 mL by sampling).

vi. Tubes for sample collections and storage until analysis

Samples were realized in lithium heparinate tubes (BD Vacutainer[®], BD, USA) and stored at -20°C before analysis. Stability of diltiazem was tested in Hemosol B0 solute at room temperature over a week and after 3 freeze/thaw cycles.

vii. Substances measured in the samples

A previous study showed discrepancies in albumin concentrations measured in MARS circuit compared to theoretical concentration [22]. Consequently, albumin levels were evaluated in a single MARS dialysis for the different sample sites.

b. Diltiazem concentration analysis

The HPLC grade acetonitrile, tert-butylmethylether (TBME) and ethyl acetate were provided by Merck (Darmstadt, Germany). Ammonium formiate, protriptylin and diltiazem standards were supplied by Cerillant (Round Rock, USA). Diltiazem concentrations were measured using an UPLC system (Dionex Ultimate 3000, Thermo, Les Ulis, France) coupled with a tandem mass spectrometer (TSQ Quantiva, Thermo, Les Ulis, France). Analyte separation was carried out on a Hypersil GOLD Thermo column (100 x 2.1mm, 1.9 μ m) maintained at 40°C. The device was completed with a pre-column (Thermo Hypersil GOLD 10 x 2.1mm, 5 μ m). Mobile phase A was ammonium formiate 2 mM with formic acid 0.1%, and mobile phase B acetonitrile, the gradient was isocratic with 55% A and 45% B. 25 μ L of protriptylin 1 μ g/mL (internal standard) and 200 μ L of phosphate buffer pH = 5.9 were added to 100 μ L of sample. Albumin samples were previously deproteinized by 200 μ L of acetonitrile. Mixture was extracted using 500 μ L of organic solvent (TBME/ethyl acetate, 50:50; v:v). After evaporation of the organic phase and reconstitution with 1 mL of the mobile phase, 5 μ L of the sample extract were injected in the UPLC system. Diltiazem peak area ratios were used for quantification (diltiazem/internal standard). The method was validated according to EMA guidelines over the concentration range 1-1000 ng/mL in albumin and in dialysate samples. Stability of diltiazem at room temperature was also evaluated and confirmed over a period of one week, and after 3 freeze/thaw cycles.

c. Albumin assay

Albumin concentrations were measured during a MARS simulation with a theoretical diltiazem amount of 25 mg. The theoretical volume of MARS circuit is 600 mL; it is filled with 100 g of human albumin. Initial concentration without adsorption on surface membranes is supposed to be around 167 g/L. The measurement of albumin concentration was performed on a Dimension[®] EXL system (Siemens, Munich, Germany) using the bromocresol purple assay test kit (ALB flex, Siemens, Munich, Germany).

d. Statistical analysis

Graphs and descriptive statistics were realized using GraphPad Prism v. 5.01 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). Diltiazem removal during dialysis was evaluated using extraction coefficient (E): $E = \frac{Ca-Cv}{Ca}$, Ca is the concentration entering the extractive compartment ($\mu\text{g/L}$) and Cv the concentration leaving the extractive compartment ($\mu\text{g/L}$). E (%) was evaluated for each extractive compartments of the MARS system in both circuits: the one connected to the central compartment the other one to the extractive system. The cumulative elimination in effluent was assessed by the sum of the product of the measured concentrations of diltiazem with the exact volumes of effluent. Assessment of elimination was conducted using the balance between input and elimination of diltiazem. With MARS system, the amount of diltiazem injected into the central compartment was compared to the amount of diltiazem still persisting at the end of the session cumulated with the amount eliminated in the effluent, the amount adsorbed by activated charcoal and the amount eliminated by anion exchange resin. With CVVHDF, the amount of diltiazem injected into the central compartment was compared to the amount of diltiazem still persisting at the end of the session cumulated with the amount eliminated in the effluent.

2. Results

a. CVVHDF and MARS

Diltiazem concentrations mean ($n=2$) evolution versus time in the sample port 1 is shown in figure 2. CVVHDF induced a decrease in concentrations of diltiazem from the solute in the in- and out- dialyzer at the two concentrations which occurred within the first hour of the session. However, the concentrations of diltiazem were still detectable at the completion of the 6-hours session. C_{0H} and C_{6H} experimental values are presented in table 1. The time-courses of the values of the extraction coefficients between port 1 and 2 are presented in figure 3. For CVVHDF, in spite the flow of the solute coming from and returning to the central compartment was maintained at 210 ml/min, there was a sharp decline in the values of the extractive coefficient at the two concentrations, ranging from 56% at the time of initiation of the session to -11% one hour after for the 750 $\mu\text{g/L}$ diltiazem concentration, and 59% and 28% for the 5000 $\mu\text{g/L}$ concentrations. Cumulative amounts of diltiazem recovered at the end of CVVHDF simulations are presented in table 2. In albumin circuit, diltiazem kinetics in the four sample

ports are presented in figure 4. The time-courses of the values of the extraction coefficients for DiaFlux, charcoal and anion exchange resin are presented in figure 5. Stability of diltiazem showed a variation of less than 15%.

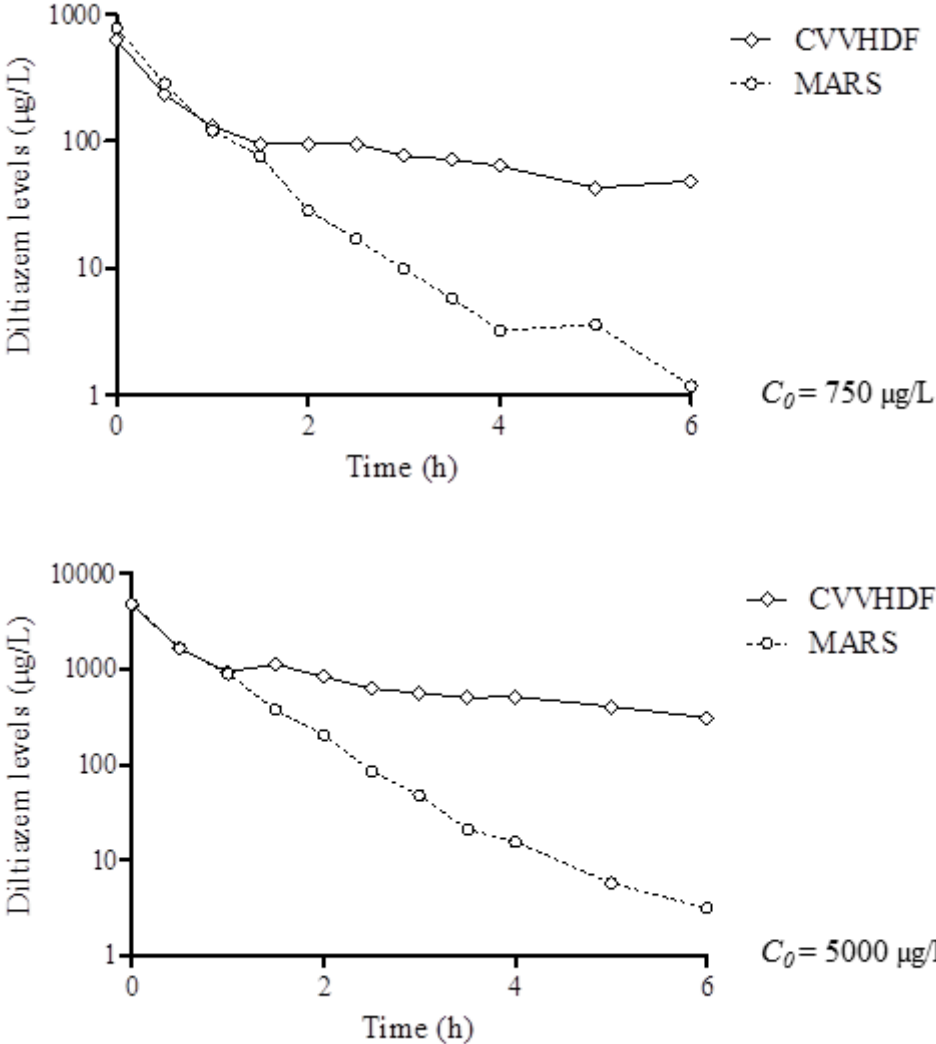


Figure 2. Diltiazem concentrations evolution in central compartment (sample port 1) versus time.

	CVVHDF		MARS	
C_0 theoretical ($\mu\text{g/L}$)	750	5000	750	5000
C_0 measured ($\mu\text{g/L}$)	631	4708	784	4791
C_{6H} measured ($\mu\text{g/L}$)	49	311	<1	<1

Table 1. C_0 and C_{6H} experimental values measured with both systems.

	CVVHDF	
Theoretical initial diltiazem dose (μg)	3750	25000
Measured initial diltiazem dose (μg)	3155	23540
Amount remaining in dialysis solute (μg)	240 (8%)	1550 (7%)
Amount recovered in effluent (μg)	1890 (60%)	17650 (75%)
Total amount recovered (μg)	2140 (68%)	19200 (82%)
Missing quantity (μg)	1010 (32%)	4300 (18%)

Table 2. Cumulative amounts of diltiazem recovered at the end of the simulations with CVVHDF system.

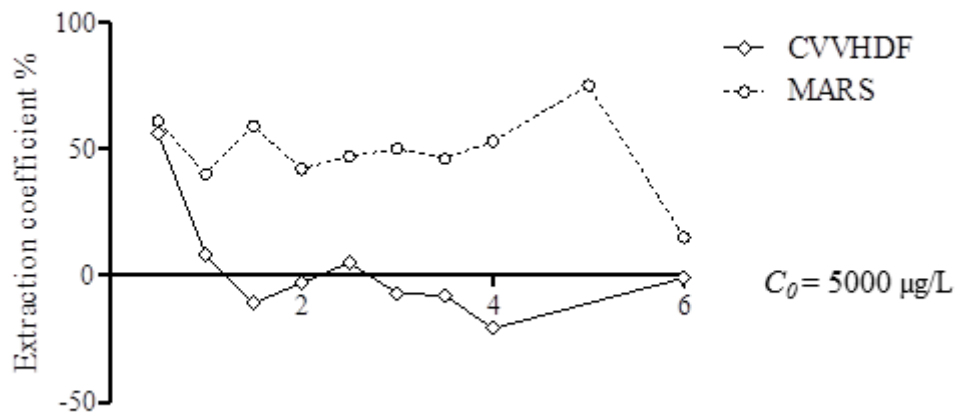
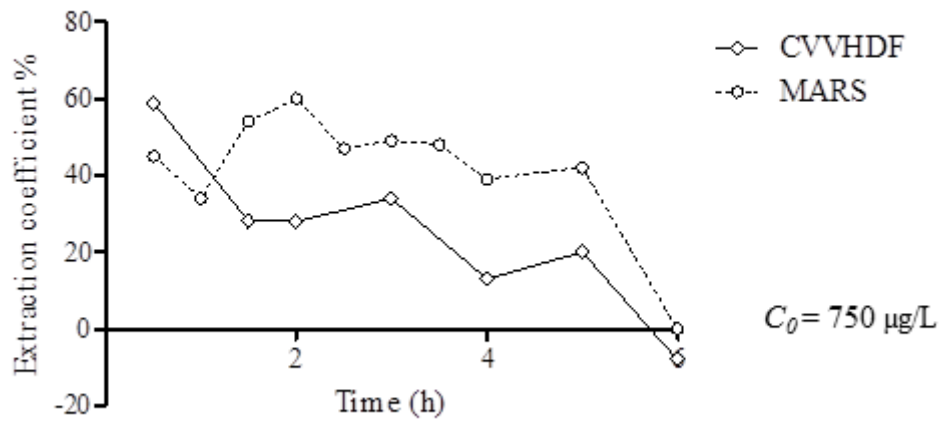


Figure 3. Extraction coefficients evolution versus time observed for both systems.

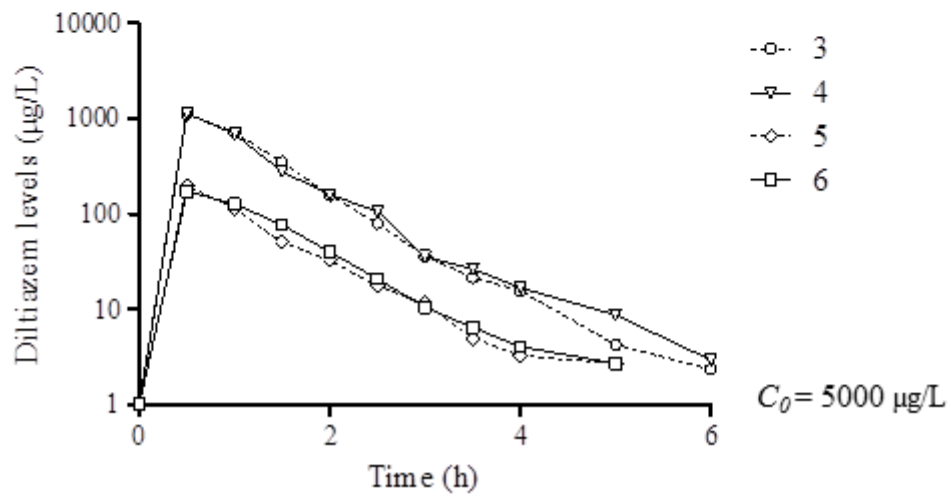
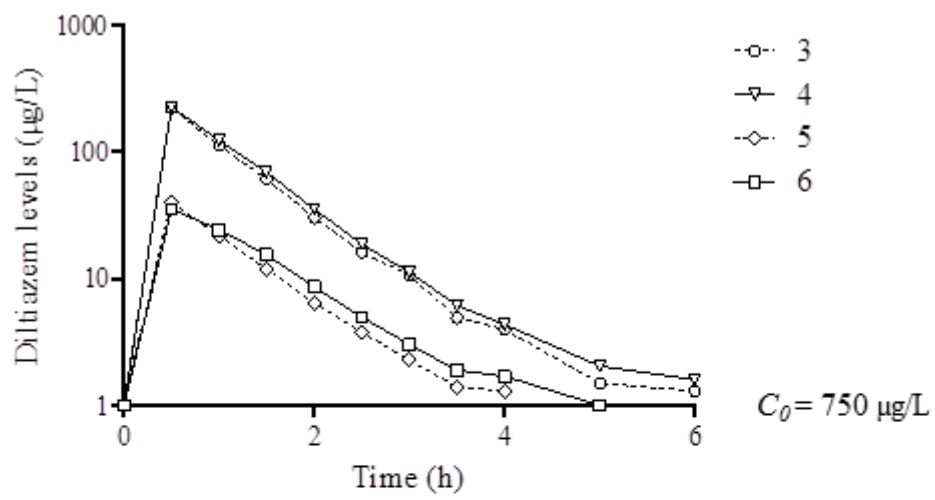


Figure 4. Diltiazem concentrations evolution in albumin circuit.

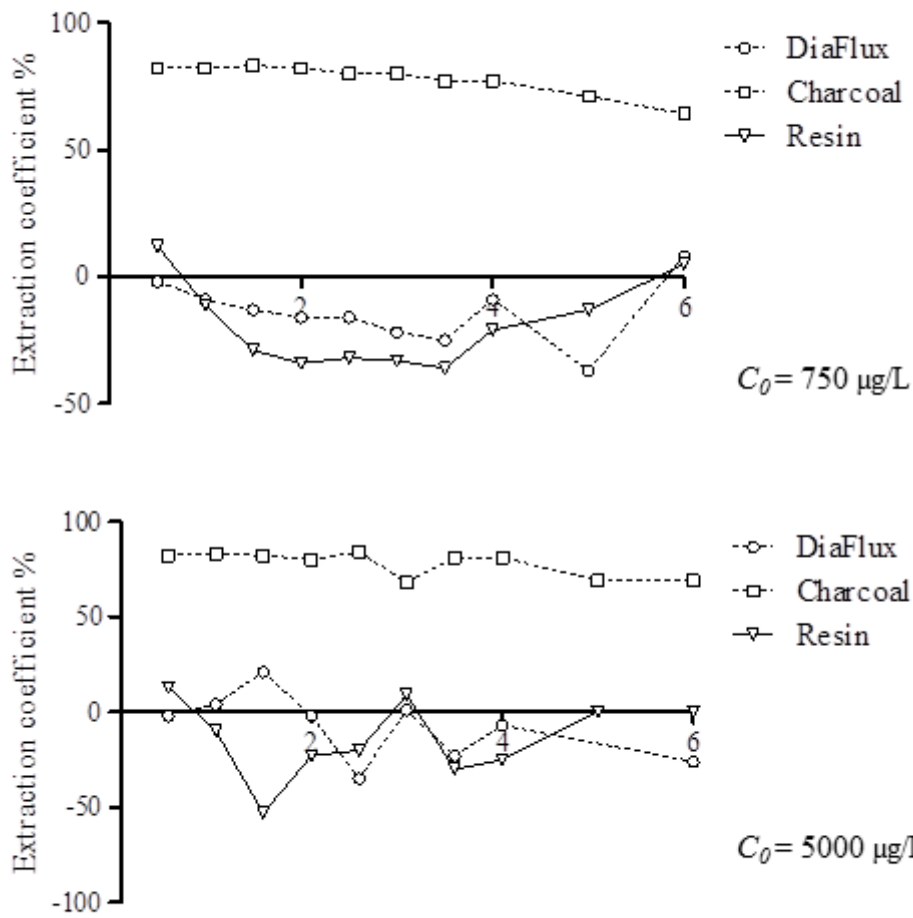


Figure 5. Extraction coefficients evolution versus time observed for MARS system in albumin circuit.

b. Albumin quantification

Concentrations at 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 hours were respectively 106, 101, 98, 97, 95, 98 and 92 g/L inside the albumin circuit and < 1, 1.9, 2.1, 2.6, 2.7 and 6 g/L in the dialysis solute. Effluent concentrations remained under 1 g/L during the simulation.

Discussion

The present study investigated and compared the efficacy of two dialysis systems for a diltiazem *ex vivo* therapy and the different compartment of MARS system. We observed with both systems a rapid decrease in diltiazem concentration over the first hour, with a faster elimination than observed in human after intravenous administration ($t_{1/2} = 4-7$ h) [23]. These observations corroborate clinical studies highlighting a good efficacy for both systems [19,24]. Diltiazem initial amount in central compartment was checked by measuring the initial concentration in the 5 L solute.

Diltiazem concentration with CVVHDF system decreases to reach a plateau after two hours proportional to the initial concentration, from 49 to 311 $\mu\text{g/L}$. In the same way, extraction coefficient decreases quickly during the first hour, regardless to the initial concentration. After two hours at low concentration, extraction coefficient oscillates between positive and negative values for CVVHDF sessions. An adsorption on dialysis membrane with CVVHDF followed by a slow release may explain these phenomena (plateau and oscillation). Effluent amounts for CVVHDF are lower than expected, with a fraction of initial dose recovered ranging from 60% to 75%. The amount of diltiazem missing at the end of dialysis suggests an adsorption of diltiazem inside the CVVHDF system. Stability of diltiazem was previously evaluated to rule out the possibility of diltiazem degradation in the dialysis solute, confirming that the missing amount should be fixed probably to dialysis membrane. In CVVHDF system, 3 mechanisms are responsible for the molecular removal: diffusion, convection and to a lesser extent adsorption. In our context, adsorption is an important mechanism responsible for the purification. To our knowledge this observation has never been presented in actual literature. Roberts et al. documented a case with a hemodialysis treatment of a patient following a diltiazem poisoning [24]. Hemodialysis provided a net decrease in the blood concentration of diltiazem despite no marked improvement in the patient clinical condition. In this case, diltiazem elimination probably does not rely only on common dialysis, but also adsorption.

Diltiazem concentration with MARS system in central compartment decreases all along the simulation, and reaches a level under 1 $\mu\text{g/L}$ regardless to the initial amount. MARS simulations exhibited an extraction coefficient superior to CVVHDF staying over 30% all along the simulation.

Diltiazem concentration in albumin circuit were equivalent before and after DiaFlux and resin cartridge at the two different concentrations with E oscillating between positive and negative values (Figure 5). Consequently, amount eliminated from these two components are low or inexistent. This observation indicates a release of diltiazem from these two parts from 0.5 to 6 h. Necessarily, a step of non-specific fixation of diltiazem happened previously, from 0 to 0.5 h. This step is not highlighted in our observations as no samples were drawn during this period. Cumulative amounts of diltiazem found in effluent were lower than that released from Diaflux membrane into albumin circuit. These results highlighted the inefficacy of the two components in diltiazem removal.

Conversely, charcoal cartridge is responsible for almost all diltiazem removal, E remaining around 80% until diltiazem reaches concentrations under 1 $\mu\text{g/L}$ post charcoal cartridge. Previous MARS studies using a compartmental approach convey to the same conclusion with midazolam, fentanyl, phenytoin, moxifloxacin, meropenem and paracetamol: charcoal remain the major site of removal [5,7,11,12]. These results suggest replacing anion exchange resin with an additional activated charcoal cartridge in case of treatment for albumin bound drug intoxication. The fact that diltiazem (mainly bound to alpha-1-acid glycoprotein) was removed with MARS system corroborates the study of Sen et al. and implies that MARS may have the capacity to remove drugs from binding sites on others plasmatic protein [11,25].

Regarding simulation duration, 2 hours of dialysis allowed achieving a removal superior to 90% regardless of the initial concentration. In our experimental conditions, this period is sufficient to provide a satisfactory treatment. These observations are difficult to transpose in humans as albumin is absent in the central compartment which should slow down removal, as diltiazem is bound to plasmatic protein in a rate of 77.4%-80.4% [14]. Furthermore, there is no release of diltiazem from tissue as it should appear in clinical cases, diltiazem presenting a large distribution volume around $5.3 \pm 1.7 \text{ L/kg}$ [15].

Albumin concentrations inside MARS circuit were lower than expected, and follow a progressive decrease all along the simulation. A small amount was found in dialysis solute, highlighting a slight passage of albumin through MarsFlux membrane, but this does not explain the loss of 36% of albumin before the simulation began. Drexler et al. observed the same phenomenon with four albumin concentrations ranging from 67 to 250 g/L [22]. At the test start 30% of albumin lacks and 40% at the test end (T6H) regardless to theoretical initial concentration. Albumin has been shown to be a major component of the plasma protein layer

adsorbed to any artificial surface [26]. Huang et al. showed that while low molecular weight protein adsorption is membrane-specific, the adsorption of larger molecular weight proteins like albumin is relatively non-specific [27]. In MARS circuit there is two dialysis membranes offering almost 4 square meters, and two cartridges, for which albumin fixation was not evaluated. MARS dialysis mechanism is based on a difference in albumin levels between blood (4%, 40 g/L) and albumin circuit (20%, 200 hg/L). Our observations corroborate Drexler et al. results, and demonstrate a lower albumin level inside the circuit in the conditions of clinical use of MARS, which do not alter drug removal efficacy [22].

One of the limitations of this study was the absence of HSA in the dialysis solute representing the patient compartment. This study was done in optimal conditions, in order to evaluate the effect of the different devices on extraction; further studies should be realized to investigate the impact of additional albumin in dialysis solute. To validate our *ex vivo* model, our results should be compared to a clinical treatment.

Conclusion

CVVHDF and MARS provide a good efficacy for diltiazem removal; however, the MARS system allows a more efficient and faster purification. The mechanisms responsible for diltiazem removal using CVVHDF are diffusion, convection and to a lesser extent adsorption to the dialysis membrane. MARS system has three components, but the charcoal cartridge is almost entirely responsible for diltiazem removal. The resin and dialysis cartridge could be removed from the system and replaced with a second charcoal cartridge in order to improve the efficiency of the system. Albumin concentrations into MARS circuit are lower than expected, but does not alter diltiazem removal.

References

- [1] R. Brandenburg, S. Brinkman, N.F. de Keizer, J. Meulenbelt, D.W. de Lange, In-Hospital Mortality and Long-Term Survival of Patients With Acute Intoxication Admitted to the ICU*, *Crit. Care Med.* 42 (2014) 1471–1479. doi:10.1097/CCM.0000000000000245.
- [2] F.J. Baud, P. Martel, P. Aergenter, B. Guidet, Evolution des intoxications admises en réanimation: données CUB-Réa 1997-2008, in: *Médicam. Psychotr. Consomm. Pharmacodépendances*, Les éditions Inserm, 2012: pp. 489–500.
- [3] G. Donati, G. La Manna, G. Cianciolo, V. Grandinetti, E. Carretta, M. Cappuccilli, L. Panicali, M. Iorio, F. Piscaglia, L. Bolondi, L. Coli, S. Stefoni, Extracorporeal detoxification for hepatic failure using molecular adsorbent recirculating system: depurative efficiency and clinical results in a long-term follow-up, *Artif. Organs.* 38 (2014) 125–134. doi:10.1111/aor.12106.
- [4] C. Lionte, L. Sorodoc, V. Simionescu, Successful treatment of an adult with *Amanita phalloides*-induced fulminant liver failure with molecular adsorbent recirculating system (MARS), *Romanian J. Gastroenterol.* 14 (2005) 267–271.
- [5] S. Sen, N. Ratnaraj, N.A. Davies, R.P. Mookerjee, C.E. Cooper, P.N. Patsalos, R. Williams, R. Jalan, Treatment of phenytoin toxicity by the molecular adsorbents recirculating system (MARS), *Epilepsia.* 44 (2003) 265–267.
- [6] N. Pichon, B. François, C. Chevreuil, J.M. Gaulier, Albumin dialysis: a new therapeutic alternative for severe diltiazem intoxication, *Clin. Toxicol. Phila. Pa.* 44 (2006) 195–196.
- [7] H. de Geus, R. Mathôt, B. van der Hoven, M. Tjoa, J. Bakker, Enhanced paracetamol clearance with molecular adsorbents recirculating system (MARS®) in severe autointoxication, *Blood Purif.* 30 (2010) 118–119. doi:10.1159/000319955.
- [8] X. Wittebole, P. Hantson, Use of the molecular adsorbent recirculating system (MARS™) for the management of acute poisoning with or without liver failure, *Clin. Toxicol.* 49 (2011) 782–793. doi:10.3109/15563650.2011.624102.

- [9] H.A. Personett, S.L. Larson, E.N. Frazee, S.L. Nyberg, N. Leung, Z.M. El-Zoghby, Impact of molecular adsorbent recirculating system therapy on tacrolimus elimination: a case report, *Transplant. Proc.* 46 (2014) 2440–2442. doi:10.1016/j.transproceed.2014.02.013.
- [10] K. Nagase, K. Iwasaki, K. Nozaki, K. Noda, Distribution and protein binding of FK506, a potent immunosuppressive macrolide lactone, in human blood and its uptake by erythrocytes, *J. Pharm. Pharmacol.* 46 (1994) 113–117. doi:10.1111/j.2042-7158.1994.tb03752.x.
- [11] S. Sen, L.M. Ytrebø, C. Rose, O.-M. Fuskevaag, N.A. Davies, G.I. Nedredal, R. Williams, A. Revhaug, R. Jalan, Albumin dialysis: a new therapeutic strategy for intoxication from protein-bound drugs, *Intensive Care Med.* 30 (2004) 496–501. doi:10.1007/s00134-003-2141-0.
- [12] G.A. Roth, W. Sipos, M. Höferl, M. Böhmendorfer, E.M. Schmidt, H. Hetz, K. Schebesta, D. Klaus, M. Motal, W. Jäger, C.G. Krenn, The effect of the molecular adsorbent recirculating system on moxifloxacin and meropenem plasma levels, *Acta Anaesthesiol. Scand.* 57 (2013) 461–467. doi:10.1111/aas.12041.
- [13] D.D. Gummin, J.B. Mowry, D.A. Spyker, D.E. Brooks, K.M. Osterthaler, W. Banner, 2017 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 35th Annual Report, *Clin. Toxicol. Phila. Pa.* 56 (2018) 1213–1415. doi:10.1080/15563650.2018.1533727.
- [14] D.C. Bloedow, R.W. Piepho, A.S. Nies, J. Gal, Serum binding of diltiazem in humans, *J. Clin. Pharmacol.* 22 (1982) 201–205.
- [15] Ph. Hermann, S.D. Rodger, G. Remones, J.P. Thenot, D.R. London, P.L. Morselli, Pharmacokinetics of diltiazem after intravenous and oral administration, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 24 (1983) 349–352. doi:10.1007/BF00610053.
- [16] L. Morini, M. Moretti, F. Brandolini, A.M.M. Osculati, A. Groppi, C. Vignali, Two Fatal Cases Involving Cardiovascular Drugs Diltiazem and Amlodipine, *J. Anal. Toxicol.* 42 (2018) e15–e19. doi:10.1093/jat/bkx087.
- [17] G. Romano, N. Barbera, C. Rossitto, G. Spadaro, Lethal diltiazem poisoning, *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 374–377.

- [18] F.C. Erickson, L.J. Ling, G.A. Grande, D.L. Anderson, Diltiazem overdose: Case report and review, *J. Emerg. Med.* 9 (1991) 357–366. doi:10.1016/0736-4679(91)90380-X.
- [19] N. Pichon, A. Dugard, M. Clavel, J.B. Amiel, B. François, P. Vignon, Extracorporeal albumin dialysis in three cases of acute calcium channel blocker poisoning with life-threatening refractory cardiogenic shock, *Ann. Emerg. Med.* 59 (2012) 540–544. doi:10.1016/j.annemergmed.2011.07.029.
- [20] M. Belleflamme, P. Hantson, T. Gougnard, J.-M. Minon, X. Wittebole, P.-F. Laterre, J. Mairesse, T. Dugernier, Survival despite extremely high plasma diltiazem level in a case of acute poisoning treated by the molecular-adsorbent recirculating system, *Eur. J. Emerg. Med. Off. J. Eur. Soc. Emerg. Med.* 19 (2012) 59–61. doi:10.1097/MEJ.0b013e3283474a9f.
- [21] F. Barrueto, W.J. Meggs, M.J. Barchman, Clearance of metformin by hemofiltration in overdose, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 40 (2002) 177–180.
- [22] K. Drexler, C. Baustian, G. Richter, J. Ludwig, W. Ramlow, S. Mitzner, Albumin Dialysis Molecular Adsorbents Recirculating System: Impact of Dialysate Albumin Concentration on Detoxification Efficacy, *Ther. Apher. Dial.* 13 (2009) 393–398. doi:10.1111/j.1744-9987.2009.00757.x.
- [23] V. Rovei, R. Gomeni, M. Mitchard, J. Larribaud, C. Blatrix, J.J. Thebault, P.L. Morselli, Pharmacokinetics and metabolism of diltiazem in man, *Acta Cardiol.* 35 (1980) 35–45.
- [24] D.M. Roberts, J.A. Roberts, R.J. Boots, R. Mason, J. Lipman, Lessons learnt in the pharmacokinetic analysis of the effect of haemoperfusion for acute overdose with sustained-release diltiazem, *Anaesthesia.* 63 (2008) 714–718. doi:10.1111/j.1365-2044.2008.05477.x.
- [25] F.M. Belpaire, M.G. Bogaert, Binding of diltiazem to albumin, alpha 1-acid glycoprotein and to serum in man, *J. Clin. Pharmacol.* 30 (1990) 311–317.
- [26] J.D. Andrade, V. Hlady, Plasma protein adsorption: the big twelve, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 516 (1987) 158–172.
- [27] Z. Huang, D. Gao, J.J. Letteri, W.R. Clark, Blood-membrane interactions during dialysis, *Semin. Dial.* 22 (2009) 623–628. doi:10.1111/j.1525-139X.2009.00658.x.

DISCUSSION

Le système de dialyse MARS a été commercialisé dans les années 2000, il est indiqué dans le traitement de l'insuffisance hépatique aiguë primaire ou secondaire. Le MARS repose sur un système de dialyse à l'albumine permettant l'épuration de composés lipophiles fortement liés aux protéines plasmatiques, son utilisation a rapidement été détournée pour être appliqué comme traitement épurateur dans les intoxications aux composés fortement liés aux protéines plasmatiques (102). Le MARS est approuvé par la FDA depuis 2012 dans le traitement des intoxications (« *The MARS® is indicated for the treatment of drug overdose and poisonings. The only requirement is that the drug or chemical be dialyzable (in unbound form) and bound by charcoal and/or ion exchange resins* »). Il a été utilisé avec succès dans différents types d'intoxications notamment avec des antagonistes calciques : vérapamil, diltiazem et amlodipine (38,39,43–45,103). Dans ces intoxications l'efficacité a été validée sur le plan clinique, avec une amélioration des signes de gravité biologiques et cliniques. Cependant, aucune étude analytique n'a été réalisée visant à démontrer la supériorité du MARS sur les systèmes de dialyse conventionnels, et évaluer les quantités éliminées par les différentes composantes du circuit.

Dans les deux études réalisées ici, le MARS a montré une nette supériorité par rapport à la CVVHDF. Etant donné l'absence d'éléments permettant de retenir les deux molécules dans le compartiment représentant le patient (protéines ou cellules), les deux systèmes fonctionnaient dans des conditions idéales, pouvant permettre à la CVVHDF d'être aussi efficace que le MARS. Cependant, nous avons observé une baisse plus rapide et plus importante des concentrations de vérapamil et de diltiazem avec le MARS, avec des concentrations indétectables au terme des sessions de 6 heures.

Pour la CVVHDF, l'élimination du vérapamil est principalement liée à une adsorption de celui-ci à la surface de la membrane de dialyse et minoritairement par diffusion et convection. A l'inverse le diltiazem est principalement éliminé par diffusion/convection et de façon minoritaire par adsorption. Ces différences sont difficilement explicables à partir des propriétés physico-chimiques des deux molécules (vérapamil : $\log P = 3,8$, $Pka = 8,9$; diltiazem : $\log P = 3,1$, $Pka = 8,1$). Le vérapamil est fortement lié aux protéines plasmatiques (90%), par conséquent la fraction libre et adsorbable chez les patients traités par CVVHDF reste très

minoritaire (104). Une seule publication rapporte le cas d'un patient intoxiqué au vérapamil, chez lequel la CVVHDF semble avoir eu un bénéfice (105). Cependant, aucun dosage n'a été réalisé dans ce cas, rendant les données difficilement interprétables. Un cas a également été publié pour le diltiazem chez un patient intoxiqué traité par hémodialyse (106). Celle-ci a permis une diminution nette des concentrations plasmatiques sans rebond, mais sans amélioration clinique. Dans ces deux cas, l'efficacité de l'hémodialyse peut être expliquée par une saturation de la liaison aux protéines plasmatiques et une augmentation de la fraction libre dialysable.

Concernant le MARS, il a permis une épuration rapide et complète des deux molécules. L'intérêt du MARS chez les patients intoxiqués au diltiazem et au vérapamil a été documenté à travers plusieurs articles (43,44). Dans les 4 cas documentés (diltiazem n=3 et vérapamil n=1), il a été observé une diminution significative des concentrations plasmatiques en diltiazem, désacétyldiltiazem et vérapamil, une augmentation de la pression artérielle et une baisse des lactates permettant un sevrage progressif des amines vasopressives. Cependant aucun prélèvement n'a été réalisé à l'intérieur du circuit de dialyse afin d'apprécier le rôle des 3 éléments responsables de l'épuration. Notre étude a permis de mettre en avant l'efficacité de la cartouche de charbon, responsable de plus de 80% de l'élimination avec les deux molécules. En comparaison, la résine et le Diaflux ont intérêt négligeable.

Quelques études compartimentales ont été réalisées. Pour le paracétamol chez un patient traité pour une intoxication les auteurs ont évalué les concentrations avant/après le DiaFlux, et avant/après les deux cartouches. L'efficacité de l'hémodialyse est modeste en comparaison aux deux bobines mais les auteurs n'ont pas individualisé l'analyse des deux cartouches ce qui ne nous permet pas de dire laquelle est responsable de l'épuration du paracétamol (40). Dans une deuxième étude réalisée chez le cochon dans un modèle d'insuffisance hépatique aiguë, les auteurs ont étudié l'efficacité du système dans l'épuration du fentanyl et du midazolam (107). Dans ce travail, la partie Diaflux était clampée afin de n'évaluer que le charbon et la résine. La cartouche de charbon était responsable de l'intégralité d'épuration. La troisième et dernière étude a évalué l'épuration du méropénème et de la moxifloxacine chez un patient et dans un modèle expérimental où le compartiment patient était représenté par une poche de 5 L de sang bovin hépariné. Dans cette étude le rôle des différentes parties du système est partagé. Pour la moxifloxacine 20% sont extraits par le DiaFlux, 74% par le charbon, et 5% par la résine. Pour le méropénème 41% sont extraits par le DiaFlux, 47% par le charbon, et 8% par la résine. Les différences observées sont en grande partie expliquées par la liaison aux protéines plasmatique

des molécules étudiées. Le diltiazem, le vérapamil, le fentanyl et le midazolam sont fortement liés aux protéines, tandis que la moxifloxacine et le méropénème le sont très peu, 30-50% et 2% respectivement (107). De plus, la moxifloxacine et le méropénème sont dialysables par les systèmes de dialyse conventionnels (108,109). Pour toutes les molécules étudiées, nous notons l'inutilité de la résine. Celle-ci a un rôle chez le sujet insuffisant hépatique ou elle permet d'extraire la bilirubine libre (résine échangeuse d'anion). Pour les molécules lipophiles, fortement liées aux protéines plasmatiques, pour lesquelles le MARS présente un vrai intérêt, la résine et le DiaFlux semblent être inefficaces comparées au charbon. Afin d'améliorer l'efficacité du système il serait intéressant à minima d'ôter résine et DiaFlux. Le passage de l'albumine à travers les trois composantes crée des deltas de pressions importants, à l'origine d'arrêt de la pompe. La dialyse MARS mobilise un appareil de dialyse conventionnelle (Prismaflex). Enlever cette partie permettrait aux services de réanimation de rendre une machine supplémentaire disponible. Enfin, cela diminuerait considérablement le temps de préparation du système (actuellement 1h-1h30 pour une personne bien formée) et dans ce type d'intoxications le temps est le plus souvent précieux. Afin d'améliorer les capacités épuratrices du système, le DiaFlux et la résine pourrait être remplacés par une seconde cartouche de charbon.

Cette étude a permis d'étudier le système d'une façon difficilement réalisable *in vivo*. Cependant, ce travail présente plusieurs limites inhérentes au modèle utilisé. Il n'y a aucun élément dans le soluté de dialyse représentant le compartiment patient permettant de retenir les molécules. D'autre part, le vérapamil et le diltiazem sont deux médicaments fortement distribués, et l'épuration génère une redistribution tissulaire qui n'est pas représentée dans notre modèle. Enfin, le vérapamil et le diltiazem sont métabolisés (désacetyldiltiazem et norvérapamil), cela n'est également pas simulé. Un aspect qui n'a encore jamais été évalué est la capacité maximale de fixation de la cartouche de charbon. Les traitements suivent les recommandations et durent 6 h ou 8 h, mais dans ces études les quantités extraites diminuent de façon linéaire tout au long de la dialyse, indiquant que la saturation n'est pas atteinte.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce travail a permis d'étudier deux approches permettant de prendre en charge les intoxications pour trois molécules dont il n'existe pas de traitement spécifique à ce jour.

La première partie a permis d'évaluer l'efficacité d'un nouvel antidote permettant la prise en charge des intoxications à la colchicine dans un modèle animal proche de l'homme et validé pour les études de toxicologie : le cochon nain Göttingen. La première partie a permis de définir quelle est la dose létale chez le cochon : 0,25 mg/Kg par voie IV, et de développer un modèle reproductible d'intoxication aiguë à la colchicine. Dans ce modèle l'administration de l'antidote permet une redistribution importante de la colchicine du compartiment tissulaire vers le compartiment sanguin. Administré avant T3h post-injection celui-ci permet d'accroître la quantité de colchicine éliminée dans les urines, et la survie des animaux. A T6h post-administration de colchicine celui n'est plus efficace, et n'améliore que très faiblement la durée de survie par rapport aux animaux contrôles. Les deux principales limites sont la voie d'administration IV qui ne reflète pas l'administration chez l'homme et le délai d'administration à respecter pour garantir l'efficacité de l'antidote qui est très court. L'efficacité de cet antidote et les délais réels d'efficacité doivent maintenant être évalués cliniquement dans un protocole strict ou l'administration précoce est recommandée.

L'étude des deux systèmes de dialyse a démontré la supériorité du MARS par rapport à la CVVHDF pour le vérapamil et le diltiazem. L'épuration du vérapamil en CVVHDF est très majoritairement liée à une adsorption à la membrane de dialyse, tandis que le diltiazem est épuré par diffusion/convection. Dans le circuit MARS, le charbon est responsable de plus de 80% de l'épuration. La résine et le DiaFlux sont inutiles. Afin d'améliorer l'efficacité du système dans le traitement des intoxications il serait intéressant de proposer le remplacement de ces deux parties par une seconde cartouche de charbon.

BIBLIOGRAPHIE

1. JO du 16.02.2014. Décret n° 2014-128 du 14 février 2014 relatif à la toxicovigilance [Internet]. 2014 [cité 7 août 2019]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000028600707&categorieLien=id>
2. Singh SP, Aggarwal AD, Oberoi SS, Aggarwal KK, Thind AS, Bhullar DS, et al. Study of poisoning trends in north India--a perspective in relation to world statistics. *J Forensic Leg Med.* janv 2013;20(1):14-8.
3. Wang L, Wu Y, Yin P, Cheng P, Liu Y, Schwebel DC, et al. Poisoning deaths in China, 2006–2016. *Bull World Health Organ.* 1 mai 2018;96(5):314-326A.
4. Mew EJ, Padmanathan P, Konradsen F, Eddleston M, Chang S-S, Phillips MR, et al. The global burden of fatal self-poisoning with pesticides 2006-15: Systematic review. *J Affect Disord.* 2017;219:93-104.
5. Mann JJ, Apter A, Bertolote J, Beautrais A, Currier D, Haas A, et al. Suicide prevention strategies: a systematic review. *JAMA.* 26 oct 2005;294(16):2064-74.
6. Hawton K, Bergen H, Simkin S, Wells C, Kapur N, Gunnell D. Six-year follow-up of impact of co-proxamol withdrawal in England and Wales on prescribing and deaths: time-series study. *PLoS Med.* 2012;9(5):e1001213.
7. Boëlle PY, Flahault A. Suicide trends in France and UK. *Lancet Lond Engl.* 17 avr 1999;353(9161):1364.
8. Adnet F, Atout S, Galinski M, Lapostolle F. Évolution des intoxications médicamenteuses volontaires en France. *Réanimation.* 1 déc 2005;14(8):721-6.
9. Sinno-Tellier S, Daoudi J, Manel J. Epidémiologie en France: Etude des cas d'exposition enregistrés par les centres antipoison français en 2013. In: *Toxicologie clinique.* 6ème. Lavoisier Médecine Sciences; 2017. p. 112-32.

10. Legout C, Villa A, Baud F, Baffert E, Eftekhari P, Langrand J, et al. OBSERVATOIRE MULTISOURCES DES INTOXICATIONS AIGUËS EN ÎLE-DE-FRANCE : UNE ÉTUDE EXPLORATOIRE.
11. Rapport annuel 2017 Tox Info Suisse [Internet]. 2017 [cité 7 août 2019]. Disponible sur: https://toxinfo.ch/customer/files/691/9181408_Tox_JB-2017_FR_Website.pdf
12. Rapport d'Activité 2018 du centre antipoisons belge. [Internet]. 2018 [cité 7 août 2019]. Disponible sur: <https://www.centreantipoisons.be/folders-et-publications/rapports-annuels>
13. Lindqvist E, Edman G, Hollenberg J, Nordberg P, Ösby U, Forsberg S. Intensive care admissions due to poisoning. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2017;61(10):1296-304.
14. Gummin DD, Mowry JB, Spyker DA, Brooks DE, Osterthaler KM, Banner W. 2017 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 35th Annual Report. *Clin Toxicol Phila Pa.* déc 2018;56(12):1213-415.
15. Huynh A, Cairns R, Brown JA, Lynch A-M, Robinson J, Wylie C, et al. Patterns of poisoning exposure at different ages: the 2015 annual report of the Australian Poisons Information Centres. *Med J Aust.* 16 2018;209(2):74-9.
16. United Nations. UN Population Data Search Engine [Internet]. 2017 [cité 22 avr 2018]. Disponible sur: <http://data.un.org/Default.aspx>
17. Food and Agriculture Organisation of the United Nations [Internet]. 2015 [cité 5 févr 2018]. Disponible sur: <http://faostat3.fao.org/browse/R/RP/E>
18. Srivastava A, Peshin SS, Kaleekal T, Gupta SK. An epidemiological study of poisoning cases reported to the National Poisons Information Centre, All India Institute of Medical Sciences, New Delhi. *Hum Exp Toxicol.* 1 juin 2005;24(6):279-85.
19. Ghodsi Z, Moghaddam SS, Saadat S, Yoosefi M, Rezaei N, Ostadrahimi H, et al. Trend of fatal poisoning at national and provincial levels in Iran from 1990 to 2015. *Public Health.* 1 mai 2019;170:78-88.

20. Alinejad S, Zamani N, Abdollahi M, Mehrpour O. A Narrative Review of Acute Adult Poisoning in Iran. *Iran J Med Sci.* juill 2017;42(4):327-46.
21. Titidez V, Arefi M, Taghaddosinejad F, Behnoush B, Akbar Pour S, Mahboobi M. Epidemiologic profile of deaths due to drug and chemical poisoning in patients referred to Baharloo Hospital of Tehran, 2011 to 2014. *J Forensic Leg Med.* mai 2019;64:31-3.
22. Baud F. Traitement des intoxications. In: *Toxicologie clinique*. 6ème. Lavoisier Médecine Sciences; 2017. p. 182-221.
23. Haute Autorité de Santé. Prise en charge des surdosages en antivitamines K, des situations à risque hémorragique et des accidents hémorragiques chez les patients traités par antivitamines K en ville et en milieu hospitalier [Internet]. 2008 [cité 8 août 2019]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2008-09/surdosage_en_avk_situations_a_risque_et_accidents_hemorragiques_-_synthese_des_recommandations_v2.pdf
24. Zellner T, Prasa D, Färber E, Hoffmann-Walbeck P, Genser D, Eyer F. The Use of Activated Charcoal to Treat Intoxications. *Dtsch Arzteblatt Int.* 3 mai 2019;116(18):311-7.
25. Proudfoot AT, Krenzelok EP, Brent J, Vale JA. Does urine alkalization increase salicylate elimination? If so, why? *Toxicol Rev.* 2003;22(3):129-36.
26. Liermain A. [Theoretical basis for alkalization treatment in barbiturate poisoning]. *J Med Bord.* déc 1966;143(12):1947-8.
27. Roberts DM, Buckley NA. Urinary alkalisation for acute chlorophenoxy herbicide poisoning. *Cochrane Database Syst Rev.* 24 janv 2007;(1):CD005488.
28. Frenia ML, Schauben JL, Wears RL, Karlix JL, Tucker CA, Kunisaki TA. Multiple-dose activated charcoal compared to urinary alkalization for the enhancement of phenobarbital elimination. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1996;34(2):169-75.

29. Pitman SW, Frei E. Weekly methotrexate-calcium leucovorin rescue: effect of alkalization on nephrotoxicity; pharmacokinetics in the CNS; and use in CNS non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Treat Rep.* juill 1977;61(4):695-701.
30. Pont A-C de. Extracorporeal treatment of intoxications. *Curr Opin Crit Care.* 1 déc 2007;13(6):668-73.
31. Orłowski J, Hou S, Leikin J. Extracorporeal removal of drugs and toxins. In: *Clinical toxicology.* WB Saunders Company. St Louis: Ford M, Delaney KA, Ling L, et al.; 2001. p. 43-50.
32. Mégarbane B, Borron SW, Baud FJ. Current recommendations for treatment of severe toxic alcohol poisonings. *Intensive Care Med.* févr 2005;31(2):189-95.
33. Vodovar D, El Balkhi S, Curis E, Deye N, Mégarbane B. Lithium poisoning in the intensive care unit: predictive factors of severity and indications for extracorporeal toxin removal to improve outcome. *Clin Toxicol Phila Pa.* sept 2016;54(8):615-23.
34. Feinfeld DA, Rosenberg JW, Winchester JF. Three controversial issues in extracorporeal toxin removal. *Semin Dial.* oct 2006;19(5):358-62.
35. Lee WM. Acute liver failure in the United States. *Semin Liver Dis.* août 2003;23(3):217-26.
36. Ghannoum M, Hoffman RS, Gosselin S, Nolin TD, Lavergne V, Roberts DM. Use of extracorporeal treatments in the management of poisonings. *Kidney Int.* 2018;94(4):682-8.
37. Barshes NR, Gay AN, Williams B, Patel AJ, Awad SS. Support for the Acutely Failing Liver: A Comprehensive Review of Historic and Contemporary Strategies. *J Am Coll Surg.* 1 sept 2005;201(3):458-76.
38. Belleflamme M, Hantson P, Gougnard T, Minon J-M, Wittebole X, Laterre P-F, et al. Survival despite extremely high plasma diltiazem level in a case of acute poisoning treated by the molecular-adsorbent recirculating system. *Eur J Emerg Med Off J Eur Soc Emerg Med.* févr 2012;19(1):59-61.

39. Gérard L, Galloy A-C, Capron A, Hantson P. Mixed amlodipine/valsartan overdose treated by the molecular adsorbent recirculating system (MARSTM). *Clin Toxicol*. 3 juill 2015;53(6):573-7.
40. de Geus H, Mathôt R, van der Hoven B, Tjoa M, Bakker J. Enhanced paracetamol clearance with molecular adsorbents recirculating system (MARS®) in severe autointoxication. *Blood Purif*. 2010;30(2):118-9.
41. Korsheed S, Selby NM, Fluck RJ. Treatment of severe theophylline poisoning with the molecular adsorbent recirculating system (MARS). *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. mars 2007;22(3):969-70.
42. Mecarelli O, Pulitano P, Mingoia M, Ferretti G, Rossi M, Berloco PB, et al. Acute Hepatitis Associated with Lamotrigine and Managed with the Molecular Adsorbents Recirculating System (MARS). *Epilepsia*. 1 oct 2005;46(10):1687-9.
43. Pichon N, François B, Chevreuil C, Gaulier JM. Albumin dialysis: a new therapeutic alternative for severe diltiazem intoxication. *Clin Toxicol Phila Pa*. 2006;44(2):195-6.
44. Pichon N, Dugard A, Clavel M, Amiel JB, François B, Vignon P. Extracorporeal albumin dialysis in three cases of acute calcium channel blocker poisoning with life-threatening refractory cardiogenic shock. *Ann Emerg Med*. juin 2012;59(6):540-4.
45. Pinto VL, Wenderfer SE, Morris J, Akcan-Arikan A. Treatment of Severe Amlodipine Toxicity With Molecular Adsorbent Recirculating System. *Kidney Int Rep*. févr 2019;4(2):346-9.
46. Sen S, Ratnaraj N, Davies NA, Mookerjee RP, Cooper CE, Patsalos PN, et al. Treatment of phenytoin toxicity by the molecular adsorbents recirculating system (MARS). *Epilepsia*. févr 2003;44(2):265-7.
47. Lionte C, Sorodoc L, Simionescu V. Successful treatment of an adult with Amanita phalloides-induced fulminant liver failure with molecular adsorbent recirculating system (MARS). *Romanian J Gastroenterol*. sept 2005;14(3):267-71.

48. Zhang J, Zhang Y, Peng Z, Maberry D, Feng X, Bian P, et al. Experience of Treatments of *Amanita phalloides*–Induced Fulminant Liver Failure with Molecular Adsorbent Recirculating System and Therapeutic Plasma Exchange: *ASAIO J.* 2014;60(4):407-12.
49. Covic A, Goldsmith D, Gusbeth-Tatomir P, Volovat C, Dimitriu A, Cristogel F, et al. Successful use of Molecular Adsorbent Regenerating System (MARS) dialysis for the treatment of fulminant hepatic failure in children accidentally poisoned by toxic mushroom ingestion. *Liver.* juin 2003;23(3):21-7.
50. Marrs TC, Thompson JP. The efficacy and adverse effects of dicobalt edetate in cyanide poisoning. *Clin Toxicol Phila Pa.* sept 2016;54(8):609-14.
51. World Health Organization. Guidelines for Iodine Prophylaxis following Nuclear Accidents - Update 1999 [Internet]. 1999 [cité 9 août 2019]. Disponible sur: https://www.who.int/ionizing_radiation/pub_meet/Iodine_Prophylaxis_guide.pdf
52. Zbigniew S. Iodine Prophylaxis in the Case of Nuclear Accident. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.* 2017;11(1):43-6.
53. Chan BSH, Buckley NA. Digoxin-specific antibody fragments in the treatment of digoxin toxicity. *Clin Toxicol Phila Pa.* oct 2014;52(8):824-36.
54. Gottlieb M, Khishfe B. Idarucizumab for the Reversal of Dabigatran. *Ann Emerg Med.* 1 mai 2017;69(5):554-8.
55. Boels D, Hamel JF, Bretaudeau Deguigne M, Harry P. European viper envenomings: Assessment of ViperfavTM and other symptomatic treatments. *Clin Toxicol Phila Pa.* mars 2012;50(3):189-96.
56. Jollivet V, Hamel JF, de Haro L, Labadie M, Saporì JM, Cordier L, et al. European viper envenomation recorded by French poison control centers: A clinical assessment and management study. *Toxicol Off J Int Soc Toxinology.* 15 déc 2015;108:97-103.
57. Nicholson WT, Sprung J, Jankowski CJ. Sugammadex: a novel agent for the reversal of neuromuscular blockade. *Pharmacotherapy.* août 2007;27(8):1181-8.

58. Gracia RC, Snodgrass WR. Lead toxicity and chelation therapy. *Am J Health Syst Pharm.* 1 janv 2007;64(1):45-53.
59. Treatment guidelines for lead exposure in children. American Academy of Pediatrics Committee on Drugs. *Pediatrics.* juill 1995;96(1 Pt 1):155-60.
60. Mohr I, Weiss KH. Current anti-copper therapies in management of Wilson disease. *Ann Transl Med [Internet].* avr 2019 [cité 10 août 2019];7(Suppl 2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6531644/>
61. Chang TP-Y, Rangan C. Iron poisoning: a literature-based review of epidemiology, diagnosis, and management. *Pediatr Emerg Care.* oct 2011;27(10):978-85.
62. Sokolowska E, Kalaska B, Miklosz J, Mogielnicki A. The toxicology of heparin reversal with protamine: past, present and future. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2 août 2016;12(8):897-909.
63. Ng PCY, Long BJ, Davis WT, Sessions DJ, Koyfman A. Toxic alcohol diagnosis and management: an emergency medicine review. *Intern Emerg Med.* 1 avr 2018;13(3):375-83.
64. McMartin K, Jacobsen D, Hovda KE. Antidotes for poisoning by alcohols that form toxic metabolites. *Br J Clin Pharmacol.* mars 2016;81(3):505-15.
65. Klein-Schwartz W, Doyon S. Intravenous acetylcysteine for the treatment of acetaminophen overdose. *Expert Opin Pharmacother.* janv 2011;12(1):119-30.
66. Widemann BC, Balis FM, Murphy RF, Sorensen JM, Montello MJ, O'Brien M, et al. Carboxypeptidase-G2, thymidine, and leucovorin rescue in cancer patients with methotrexate-induced renal dysfunction. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* mai 1997;15(5):2125-34.
67. Leveau P. Intoxications aiguës par des produits phytosanitaires chez l'enfant. *Arch Pédiatrie.* 1 juill 2016;23(7):775-80.

68. Lotti M, Becker CE. Treatment of acute organophosphate poisoning: evidence of a direct effect on central nervous system by 2-PAM (pyridine-2-aldoxime methyl chloride). *J Toxicol Clin Toxicol.* avr 1982;19(2):121-7.
69. Wright RO, Lewander WJ, Woolf AD. Methemoglobinemia: Etiology, Pharmacology, and Clinical Management. *Ann Emerg Med.* 1 nov 1999;34(5):646-56.
70. Łukasik-Głębocka M, Sommerfeld K, Teżyk A, Zielińska-Psuja B, Panieński P, Żaba C. Flubromazolam--A new life-threatening designer benzodiazepine. *Clin Toxicol Phila Pa.* 2016;54(1):66-8.
71. Fleming SW, Cooley JC, Johnson L, Frazee CC, Domanski K, Kleinschmidt K, et al. Analysis of U-47700, a Novel Synthetic Opioid, in Human Urine by LC-MS-MS and LC-QToF. *J Anal Toxicol.* 1 avr 2017;41(3):173-80.
72. Helander A, Bäckberg M, Beck O. MT-45, a new psychoactive substance associated with hearing loss and unconsciousness. *Clin Toxicol Phila Pa.* oct 2014;52(8):901-4.
73. Jones MJ, Hernandez BS, Janis GC, Stellpflug SJ. A case of U-47700 overdose with laboratory confirmation and metabolite identification. *Clin Toxicol Phila Pa.* janv 2017;55(1):55-9.
74. Domanski K, Kleinschmidt KC, Schulte JM, Fleming S, Frazee C, Menendez A, et al. Two cases of intoxication with new synthetic opioid, U-47700. *Clin Toxicol.* 2 janv 2017;55(1):46-50.
75. Armenian P, Olson A, Anaya A, Kurtz A, Ruegner R, Gerona RR. Fentanyl and a Novel Synthetic Opioid U-47700 Masquerading as Street « Norco » in Central California: A Case Report. *Ann Emerg Med.* 2017;69(1):87-90.
76. Schneir A, Metushi IG, Sloane C, Benaron DJ, Fitzgerald RL. Near death from a novel synthetic opioid labeled U-47700: emergence of a new opioid class. *Clin Toxicol.* 2 janv 2017;55(1):51-4.
77. Rambaran KA, Fleming SW, An J, Burkhart S, Furmaga J, Kleinschmidt KC, et al. U-47700: A Clinical Review of the Literature. *J Emerg Med.* oct 2017;53(4):509-19.

78. Gussow L. Toxicology Rounds: Who Said the Opioid Crisis Couldn't Get Any Worse? *Emerg Med News*. nov 2016;38(11):1.
79. Graudins A, Lee HM, Druda D. Calcium channel antagonist and beta-blocker overdose: antidotes and adjunct therapies. *Br J Clin Pharmacol*. mars 2016;81(3):453-61.
80. Thanacoody HKR, Thomas SHL. Tricyclic antidepressant poisoning : cardiovascular toxicity. *Toxicol Rev*. 2005;24(3):205-14.
81. Larabi IA, Fabresse N, Etting I, Abe E, Alvarez J-C. Rapid and simultaneous screening of new psychoactive substances and conventional drugs of abuse - The use of Biochip Array Technology in whole blood and urine: A comparative study. *TIAFT Bulletin*. 49(2).
82. Hartung EF. History of the use of colchicum and related medicaments in gout; with suggestions for further research. *Ann Rheum Dis*. sept 1954;13(3):190-200.
83. Ben-Chetrit E, Levy M. Colchicine: 1998 update. *Semin Arthritis Rheum*. août 1998;28(1):48-59.
84. Wallace SL, Omokoku B, Ertel NH. Colchicine plasma levels. Implications as to pharmacology and mechanism of action. *Am J Med*. avr 1970;48(4):443-8.
85. Rochdi M, Sabouraud A, Girre C, Venet R, Scherrmann JM. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of colchicine after i.v. and oral administration in healthy human volunteers and elderly subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 1994;46(4):351-4.
86. Walaszek EJ, Kocsis JJ, Leroy G., Geiling EMK. Studies on the excretion of radioactive colchicine. *Arch Int Pharm*. 1960;125:371-92.
87. Niel E, Scherrmann J-M. Rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitation of colchicine in human plasma. *Rev Rhumatisme*. 2006;73:1338-45.
88. Gaultier M, Bismuth C. [Acute colchicine poisoning]. *Rev Prat*. 11 déc 1978;28(57):4545-54.

89. Luduena R. Biochemistry of tubulin. In: Microtubules. Academic press. New York: Robert K, Hyams JS; 1979. p. 65-93.
90. Scherrmann JM, Boudet L, Pontikis R, Nguyen HN, Fournier E. A sensitive radioimmunoassay for colchicine. *J Pharm Pharmacol.* nov 1980;32(11):800-2.
91. Sabouraud A, Urtizbera M, Grandgeorge M, Gattel P, Makula ME, Scherrmann JM. Dose-dependent reversal of acute murine colchicine poisoning by goat colchicine-specific Fab fragments. *Toxicology.* 1991;68(2):121-32.
92. Sabouraud AE, Urtizbera M, Cano NJ, Grandgeorge M, Rouzioux JM, Scherrmann JM. Colchicine-specific Fab fragments alter colchicine disposition in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther.* 3 janv 1992;260(3):1214-9.
93. Baud FJ, Sabouraud A, Vicaut E, Taboulet P, Lang J, Bismuth C, et al. Treatment of Severe Colchicine Overdose with Colchicine-Specific Fab Fragments. *N Engl J Med.* 9 mars 1995;332(10):642-5.
94. Peake PW, Pianta TJ, Succar L, Fernando M, Buckley NA, Endre ZH. Fab fragments of ovine antibody to colchicine enhance its clearance in the rat. *Clin Toxicol Phila Pa.* juin 2015;53(5):427-32.
95. Bollen P, Ellegaard L. The Göttingen minipig in pharmacology and toxicology. *Pharmacol Toxicol.* 1997;80 Suppl 2:3-4.
96. Smith TW, Haber E, Yeatman L, Butler VP. Reversal of advanced digoxin intoxication with Fab fragments of digoxin-specific antibodies. *N Engl J Med.* 8 avr 1976;294(15):797-800.
97. Halkin H, Dany S, Greenwald M, Shnaps Y, Tirosh M. Colchicine kinetics in patients with familial Mediterranean fever. *Clin Pharmacol Ther.* juill 1980;28(1):82-7.
98. Barkovskiy M, Ilyukhina E, Dauner M, Eichinger A, Skerra A. An engineered lipocalin that tightly complexes the plant poison colchicine for use as antidote and in bioanalytical applications. *Biol Chem.* 25 2019;400(3):351-66.

99. Tochinai R, Ando M, Suzuki T, Suzuki K, Nagata Y, Hata C, et al. Histopathological studies of microtubule disassembling agent-induced myocardial lesions in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 1 sept 2013;65(6):737-43.
100. Mitzner SR, Stange J, Klammt S, Risler T, Erley CM, Bader BD, et al. Improvement of hepatorenal syndrome with extracorporeal albumin dialysis MARS: results of a prospective, randomized, controlled clinical trial. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* mai 2000;6(3):277-86.
101. Mitzner SR, Stange J, Klammt S, Koball S, Hickstein H, Reisinger EC. Albumin Dialysis MARS: Knowledge from 10 Years of Clinical Investigation: *ASAIO J.* sept 2009;55(5):498-502.
102. Wittebole X, Hantson P. Use of the molecular adsorbent recirculating system (MARSTM) for the management of acute poisoning with or without liver failure. *Clin Toxicol.* 1 nov 2011;49(9):782-93.
103. St-Onge M, Dubé P-A, Gosselin S, Guimont C, Godwin J, Archambault PM, et al. Treatment for calcium channel blocker poisoning: A systematic review. *Clin Toxicol Phila Pa.* nov 2014;52(9):926-44.
104. Abbott. RCP verapamil. 2013.
105. Akıncı E, Akıllı NB, Koylu R, Gonen MO. Successful resuscitation of a patient with continuous venovenous hemodiafiltration following intoxication from verapamil and trandolapril. *Kaohsiung J Med Sci.* juin 2014;30(6):321-2.
106. Roberts DM, Roberts JA, Boots RJ, Mason R, Lipman J. Lessons learnt in the pharmacokinetic analysis of the effect of haemoperfusion for acute overdose with sustained-release diltiazem. *Anaesthesia.* juill 2008;63(7):714-8.
107. Sen S, Ytrebø LM, Rose C, Fuskevaag O-M, Davies NA, Nedredal GI, et al. Albumin dialysis: a new therapeutic strategy for intoxication from protein-bound drugs. *Intensive Care Med.* 21 janv 2004;30(3):496-501.

108. Stass H, Bührmann S, Mitchell A, Kubitza D, Möller J-G, Kribben A, et al. The influence of continuous venovenous haemodialysis on the pharmacokinetics of multiple oral moxifloxacin administration to patients with severe renal dysfunction. *Br J Clin Pharmacol.* déc 2007;64(6):745-9.
109. Deshpande P, Chen J, Gofran A, Murea M, Golestaneh L. Meropenem removal in critically ill patients undergoing sustained low-efficiency dialysis (SLED). *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* août 2010;25(8):2632-6.

Titre : Traitement des intoxications. Étude de deux approches : un système d'épuration extra-rénale de type MARS et un antidote de type Fab anti-colchicine

Mots clés : Antidote ; Épuration extra-rénale ; Intoxication ; Toxicologie Clinique ; Colchicine ; *Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS)*.

Résumé : L'objectif de ce travail a été d'étudier deux approches permettant le traitement des intoxications. La première est un antidote de type Fab, permettant de prendre en charge les intoxications aiguës à la colchicine. L'étude pré-clinique a été réalisée chez le cochon nain Göttingen. Un modèle d'intoxication reproductible a préalablement été défini. L'efficacité de l'antidote a ensuite été évaluée à différents horaires post-administration de colchicine (T+1h, T+3h et T+6h). Chez tous les animaux traités (n=6), il a été observé une redistribution tissulaire importante des tissus vers le compartiment sanguin. Seule l'administration précoce de l'antidote (T+1h et T+3h) permet la survie des animaux à T48h, cela souligne l'importance d'une administration précoce afin de garantir une efficacité chez l'homme.

La deuxième partie de ce travail a consisté à évaluer l'efficacité du système de dialyse hépatique MARS dans l'épuration du vérapamil et du diltiazem dans un modèle *in vitro*. Le système MARS a également été comparé à un système de dialyse conventionnelle (CVVHDF). L'efficacité des deux systèmes a été évaluée à trois concentrations pour le vérapamil (1, 2,5 et 5 mg/L) et 2 concentrations pour le diltiazem (0,75 et 5 mg/L), sur des sessions de 6 heures. Le MARS est le système le plus efficace pour les deux molécules. L'épuration du vérapamil par la CVVHDF est principalement liée à l'adsorption de la molécule à la surface de la membrane de dialyse. Concernant le système MARS, la cartouche de charbon est responsable de l'épuration des deux molécules.

Title : Treatment of poisoning. Study of two strategies: an extracorporeal purification system and anti-colchicine Fab fragments

Keywords : Antidote ; Extracorporeal Treatment ; Poisoning ; Clinical Toxicology ; Colchicine ; *Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS)*.

Abstract : The objective of this work was to study two approaches allowing the treatment of intoxications. The first is an antidote (anti-colchicine Fab fragments), allowing the management of acute poisoning with colchicine. The pre-clinical study was carried out using Göttingen minipigs. A reproducible intoxication model has been defined. The effectiveness of the antidote was then evaluated at different schedules (T +1h, T +3h and T +6h). In all treated animals (n = 6), significant tissue redistribution to the blood compartment was observed. Only the early administration of the antidote (T + 1h and T + 3h) allows the survival of animals at T48h, this underlines the importance of early administration to ensure efficacy in humans.

The second part of this work was dedicated to the evaluation of the effectiveness of the MARS hepatic dialysis system in the removal of verapamil and diltiazem in an *in vitro* model. The MARS system was also compared to a conventional dialysis system (CVVHDF). The efficacy of both systems was evaluated at three concentrations for verapamil (1, 2.5 and 5 mg/L) and 2 concentrations for diltiazem (0.75 and 5 mg/L), on 6-hour sessions. MARS is the most efficient system for both molecules. Purification of verapamil by CVVHDF is mainly related to the adsorption of the molecule on the surface of the dialysis membrane. Concerning the MARS system, the carbon cartridge is responsible for the removal of the two molecules.

