

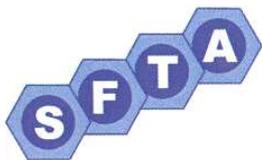


# Difficultés d'interprétation des concentrations des cyanures dans les prélèvements post-mortem

A.-L. Pélissier-Alicot<sup>1</sup>, P. Kintz<sup>2</sup>

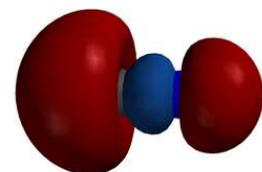
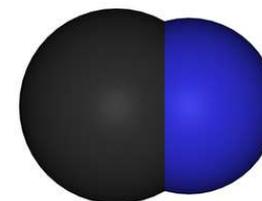
<sup>1</sup>Service de Médecine Légale, CHU Marseille

<sup>2</sup>X-Pertise Consulting, Oberhausbergen



# Généralités

- Intoxications dues à la libération d'ions cyanures ( $\text{CN}^-$ ) dans l'organisme
- 4 groupes de composés suivant la quantité d'ions  $\text{CN}^-$  susceptibles d'être libérés
  - **Groupe I** : composés très toxiques
  - **Groupe II** : composés de toxicité intermédiaire
  - **Groupe III** : composés peu toxiques
  - **Groupe IV** : composés dont la toxicité n'est pas due à la libération d'ions  $\text{CN}^-$



# Composés très toxiques

- Acide cyanhydrique (HCN) ou acide prussique
  - Acide fort
  - Très rapidement actif
  - Liquide incolore et volatil
  - Même densité que l'air (→ diffusion facile)
  - Odeur d'amande amère entre 0,2 et 5 ppm
- Cyanogène (CN<sub>2</sub>)
  - Gaz incolore qui se combine à l'hydrogène pour donner de l'HCN (toxicité comparable)
- Sels élémentaires solubles de l'acide cyanhydrique
  - Cyanure de potassium, cyanure de sodium, cyanure de calcium etc.
  - Bases fortes
- Sels élémentaires peu solubles de l'acide cyanhydrique
  - Cyanure ferreux ou ferrique, cyanure d'argent, de cuivre, de cobalt, de mercure, d'or...

# Sources d'exposition

- Manipulation de produits à usage agricole
  - Rodenticides (acide cyanhydrique)
  - Insecticides (acétone cyanhydrique)
  - Herbicides (cyanamide de calcium)
  - Engrais (cyanamide de sodium)
- Manipulation de produits à usage industriel
  - Synthèse de matières plastiques
    - HCN
    - Acrylonitrile
    - Polyamide
  - Solvants
  - Extraction de l'or (sels d'HCN)
  - Décapage, trempage et raffinage des métaux
    - Sels d'HCN pour argentage
    - Cadmiage, cuivrage...

# Sources d'exposition

- Pollution atmosphérique
  - **Fumées incendie (HCN)**
    - Pyrolyse de matières plastiques (polyuréthane, polyacryliques, etc.)
    - Combustion de polymères naturels (laine, soie)
  - Emissions industrielles (cockerie, hauts fourneaux)
  - Activités agricoles
  - Gaz d'échappement
  - Tabac (30 à 200  $\mu\text{g}$  / cigarette)
- Usage médical
  - Nitroprussiate de sodium (Nitriate®)
    - Vasodilatateur artériel et veineux
    - Partiellement métabolisé en HCN
    - Risque d'intoxication en cas de surdosage



# Sources d'exposition

- Apport alimentaire d'hétérosides cyanogénétiques
  - Amygdaline
    - Hydrolyse (émulsine) → gentobiose + HCN + benzaldéhyde
    - Amande amère
    - Noyaux de cerises, pêches, abricots, prunes
    - Feuilles de Laurier-Cerise
  - Linamarine
    - Hydrolyse (linamarase) → glucose + cyanhydrine d'acétone
    - Racines sèches de manioc amer (cassava)
    - Pois sabre
    - Haricot de Java
- Eau de boisson
  - N < 50 µg/L
- Environnement
  - Bactéries, algues, moisissures...



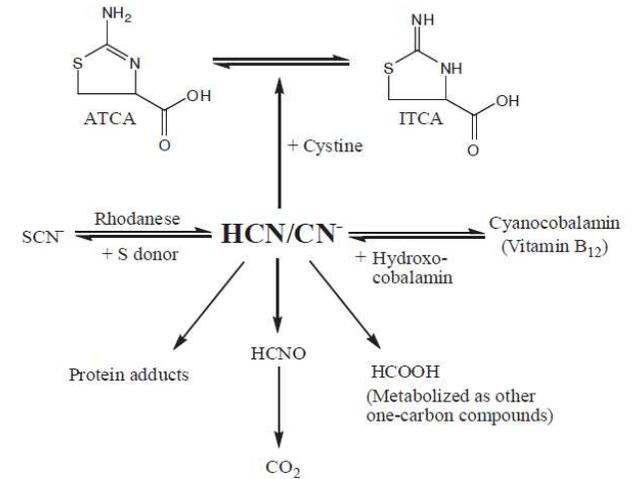
# Circonstances de l'intoxication

- Catastrophes de masse
  - Incendies
  - Accidents industriels
  - Armes de guerre
  - Actes de terrorisme
- Accidents
  - Exposition aux vapeurs de produits cyanogènes (milieu industriel)
  - Ingestion d'une quantité importante glucosides cyanogénétiques
  - Exposition à du fumier, moisissures etc.
  - Intoxications médicamenteuses
- Suicides
  - Professions ayant accès aux produits (chimistes, biologistes etc.)
  - Achats de « kits de suicide » sur le dark web
- Crimes
  - Cas d'euthanasie active par nitroprussiate de sodium
  - Cas particulier des chambres à gaz



# Toxicocinétique

- Absorption très rapide
  - Qq secondes → voie respiratoire
  - Qq minutes → voie digestive
- Fixation hématies (98 %)
- Distribution tissulaire très rapide
- Métabolisation au niveau hépatique et rénal
  - Formation de thiocyanate  $\text{SCN}^-$  (80%)
    - En présence de rhodanèse mitochondriale :  $\text{CN}^- + \text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{SCN}^- + \text{SO}_3^{2-}$
    - Éliminé dans l'urine
  - Formation d'acide 2-aminothiazolidine-4-carboxylique (**ATCA**) (15%)
    - Réaction avec la cystine
    - Éliminé dans l'urine
  - Formation de cyanocobalamine (vitamine B12) (5%)
    - Combinaison réversible à l'hydroxocobalamine
    - Éliminée dans l'urine

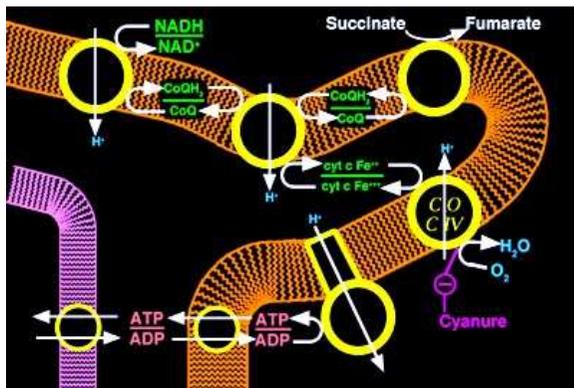


*In: Logue BA et al. Crit Rev Anal Chem;2010;40:122-47*

# Modes d'action toxique

- Ions  $\text{CN}^-$  : toxiques cellulaires non spécifiques d'organes
  - Fixation au  $\text{Fe}^{3+}$  de la cytochrome-oxydase  $a_3$  (dernier transporteur  $\text{O}_2$ )
    - Complexe stable
      - Déficit en ATP
      - Hypoxie cellulaire
      - Dysfonctionnement pompes et enzymes ATP-dépendantes
      - Déviation aérobie en anaérobie
      - Acidose lactique sévère
  - Fixation au  $\text{Fe}^{2+}$  /  $\text{Fe}^{3+}$  (hémoglobine/méthémoglobine)
    - Défaut de transport de l'oxygène
  - Le cerveau et le cœur sont les organes les plus sensibles

} Blocage de la respiration cellulaire



# Aspects autopsiques

- Signes spécifiques inconstants
  - Odeur d'amende amère : estomac, poumon et cerveau
  - Rigidités précoces et durables
  - Lividités violacées
  - Putréfaction retardée
  - Sang rouge vif ou noir et fluide
  - Muqueuse œsophagienne rouge écarlate
  - Muqueuse gastrique d'aspect savonneux
  - Paroi gastrique rétractée, épaissie, infiltrée
  - Lésions du noyau lenticulaire comparables à celles observées dans l'intoxication au CO
- Des signes d'asphyxie non spécifiques
  - Ecchymoses de la face, du cou, de la poitrine
  - Suffusions sanguines sur le tube digestif
  - Hémorragies méningées
  - Œdème cérébral avec piqueté hémorragique de l'encéphale
  - Œdème pulmonaire

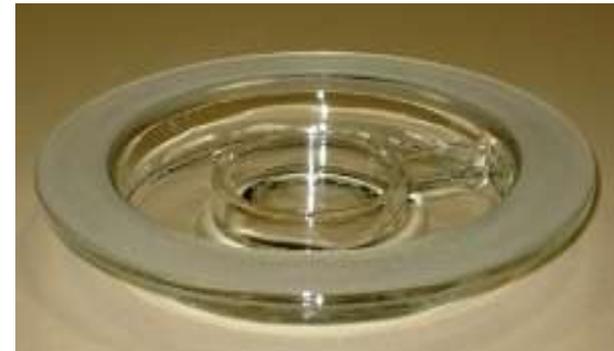
# Aspects analytiques

- Réaction colorimétrique

- Distillation pour éliminer les interférences et dissocier les complexes cyanurés
- Conversion  $\text{CN}^- \rightarrow \text{CNCl}$  par la chloramine-T
- Addition de pyridine + acide barbiturique : solution rouge-bleue
- Lecture en spectrophotométrie
- LOD  $\approx 1 \mu\text{g/mL}$

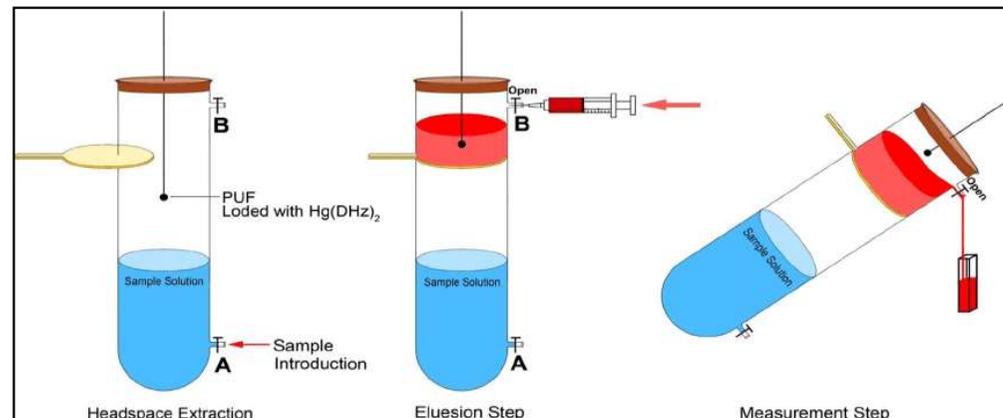
- Microdiffusion (cellule de Conway)

- Conversion  $\text{CN}^- \rightarrow \text{HCN}$  par acidification
- Puit externe : sang + acide
- Puit interne : base diluée
- 2 heures à température ambiante
- Mesure de l'absorbance
- LOD  $\approx 1 \mu\text{g/mL}$



# Aspects analytiques

- Chromatographie en phase gazeuse
  - Préparation : SPME, HS, couplage HS-SPME\*
  - Détection : ECD, FID, NPD, MS
  - LOD : 10 ng/mL
- Chromatographie liquide
  - Préparation : micro-extraction, extraction en ligne
  - Détection : MS, MS<sup>2</sup>
  - LOD : 5 ng/mL



*In: Al-Saidi HM et al. Talanta 2016;159:137-42*

# Aspects analytiques

- Difficultés

- Demi-vie extrêmement courte
- Extrême volatilité de l'HCN
- Extrême réactivité du  $\text{CN}^-$

- Dosage des thiocyanates

- Trop grande variation des concentrations physiologiques
  - Alimentation
  - Tabagisme
  - Production bactérienne dans le colon (in vivo)
  - Déficit en rhodanèse
  - Implication dans de nombreuses voies métaboliques

- Instabilité in vitro

→ *Peu d'intérêt dans le diagnostic d'intoxication aux cyanures !*

# Difficultés d'interprétation

- Multiples!
  - Problème des valeurs de référence
  - Dégradation *post-mortem*
  - Néof ormation *post-mortem*
  - Redistribution *post-mortem*
  - Contamination *post-mortem*
  - Artefacts
  - Cas particulier des décès en foyer d'incendie

**Compte-rendu de la réunion du groupe de travail  
TOXICOLOGIE JUDICIAIRE  
du 27 janvier 2005 à Paris**

**Responsable :** G. Pépin

**Présents :** V. Dumestre, M. Lhermitte, C. Coquel (suppléante de M-H. Ghysel), Y. Ricordel, A. Lebouil, M. Mercerolle (remplacant JM Gaulier) P. Mura, M. Perrin, H. Eysseric,

**Excusés :** C. Charlier, P. Kintz, J-P. Goullé, A. Gruson

**1. Stabilité des cyanures dans le sang de cadavre et dans les prélèvements (+4°C et – 20°C) M. Lhermitte et G. Pépin**

D'après une étude de 7 cas réels sur sang post-mortem sans NaF (G. Pépin), 5 cas réels sur sang fluorés avec NaF (JP Goullé) et 4 cas sur sang hépariné ou fluoré (JM Gaulier) la stabilité des cyanures est variable : chute au bout de 2 mois, augmentation brusque ou stabilité relative pour d'autres cas. Cependant, on observe le plus souvent que globalement, **si la valeur de départ est faible, elle reste stable et que si la valeur de départ est forte, elle chute.**

# Problème des valeurs de référence

- Absence de consensus

	$[C]_{ST}$ physiologiques	$[C]_{ST}$ toxiques	$[C]_{ST}$ létales
Barillo, 1994		$\geq 500 \mu\text{g/L}$	$\geq 3000 \mu\text{g/L}$
Dehon, 1998			500 à 2500 $\mu\text{g/L}$
Baselt, 2004	Non fumeurs : 16 $\mu\text{g/L}$ Fumeurs : 41 $\mu\text{g/L}$		$\geq 170 \mu\text{g/L}$
Clarke, 2011	$\leq 26 \mu\text{g/L}$	$\geq 500 \mu\text{g/L}$	$\geq 4000 \mu\text{g/L}$
Schulz, 2012		$\geq 500 \mu\text{g/L}$	$\geq 1000 \mu\text{g/L}$
Rużycka, 2017		$\geq 1000 \mu\text{g/L}$	$\geq 3000 \mu\text{g/L}$

# Diminution des concentrations

- Phénomène précoce<sup>1</sup>
  - Entre le décès et le prélèvement
  - Entre le prélèvement et l'analyse
  - Plus intense dans les tissus / sang total
  - D'autant plus intense que la concentration initiale est élevée
  - Plusieurs mécanismes impliqués
    - Conversion des cyanures en thiocyanates
    - Hydrolyse en acide formique
  - Influence du délai d'analyse
  - Influence de la température in vitro<sup>1,2</sup> ?
    - Décroissance rapide quelle que soit la température de conservation (-80°C, -20°C, 4°C, 20°C)

<sup>1</sup>McAllister JL et al. *J Anal Toxicol* 2008; 32:612-20

<sup>2</sup>Rużycka M et al. 2017. doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00219

# Augmentation des concentrations

- Conversion des thiocyanates en cyanures<sup>1</sup>

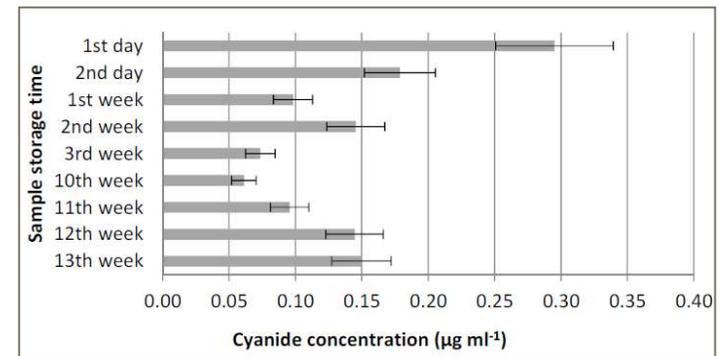
- Sujets présentant un pool endogène de thiocyanates
- Phénomène généralement peu intense
- Favorisé par l'acidification post-mortem du pH

- Néof ormation d'origine bactérienne<sup>1,2,3</sup>

- Entre le décès et le prélèvement
- In vitro après une période de décroissance
- *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *C. violaceum*
- Néof ormation d'intensité variable, parfois élevée
- Limitée par l'adjonction de NaF à **2%**

- Augmentation de la température<sup>1,2</sup>

- Températures très élevées
- Entre le décès et le prélèvement (victimes d'incendies, crashes aériens)
- In vitro



In: Rużycka M et al. 2017<sup>3</sup>

<sup>1</sup>McAllister JL et al. *J Anal Toxicol* 2008; 32:612-20

<sup>2</sup>Knowles CJ, Bunch AW. *Adv Microb Physiol*. 1986;27:73-111

<sup>3</sup>Rużycka M et al. 2017. doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00219

# Augmentation des concentrations

- Lors de l'analyse
  - Oxydation des thiocyanates en cyanures
    - Lors de la dénaturation de l'hème
      - Production d'anion superoxyde  $O_2^-$
      - En milieu très acide ( $pH < 4$ ) et à température élevée
      - Réaction dépendante du pool initial de thiocyanates
      - Réaction bloquée par l'adjonction d'acide ascorbique
    - Sous l'action de nitrites ou de peroxyde d'hydrogène en milieu acide
    - Sous l'action de nitrites lors de l'étape de distillation
  - Synthèse de cyanures à des températures très élevées
  - Transformation des ferrocyanures en cyanures en milieu très acide
  - Interférences avec les thiocyanates / techniques colorimétriques

# Redistribution *post-mortem*

- Variations de concentrations SC/SP
  - Ratios C/P extrêmement variables selon les études
  - Influence de la voie d'absorption
    - 21 suicides par ingestion<sup>1</sup>
      - [CG]m = 859 µg/L
      - [C]m = 38,1 µg/L
      - [P]m = 17,1 µg/L
      - Ratio (C/P)m : 3,4
    - 9 suicides par inhalation<sup>2</sup>
      - Ratio (C/P)m : 1,3

→ *Redistribution majeure depuis le contenu gastrique*

<sup>1</sup>Rhee J. et al. *J Forensic Sci* 2011; 210: e12-15

<sup>2</sup>Dalpe-Scott M. et al. *Can Soc Forensic Sci J* 1995; 28: 113-21

# Contamination post-mortem

- Possibilité d'une absorption passive chez des victimes présentant des délabrements massifs
- Ratio C/P sur 16 décès pour lesquels<sup>1</sup>
  - [SC] : 108 à 3430 µg/L, moyenne 823 µg/L, médiane 625 µg/L
  - [SP] : 74 à 3050 µg/L, moyenne 851 µg/L, médiane 577 µg/L
  - Graduation des blessures de 0 (aucune) à 4 (dilacérations viscérales)
- Ratios C/P élevés chez des victimes présentant un score à 4
- Hypothèse également évoquée lors de crashes aériens<sup>2</sup>
- Données in vitro concordantes<sup>1,2</sup>
- A distinguer du passage transcutané<sup>3</sup>

Atteintes lésionnelles	Risque contamination passive	Score de gravité des blessures
Corps intègre	Aucun	1
Brûlure 1 <sup>er</sup> degré	Faible	2
Brûlures 2 <sup>e</sup> /3 <sup>e</sup> degré sur faible surface	Moyen	3
Dilacérations viscérales	Fort	4

<sup>1</sup>Allibe N. et al. TOXAC 2016;28:164-9

<sup>2</sup>Thoren TM et al. J Anal Toxicol 2013;37:203-7

<sup>3</sup>Seidl S et al. Legal Med 2003;5:238-41

# Concentrations/mécanisme létal

- Suicides par ingestion : concentrations très élevées<sup>1</sup>
  - 21 décès par ingestion de cyanures
    - [SC]m = 38, 1 ± 0,56 µg/L
    - [SP]m = 17, 1 ± 0,45 µg/L
- Décès par inhalation : concentrations/circonstances<sup>2</sup>
  - 92 décès par inhalation
  - [CN<sup>-</sup>] dans SC

Feux fermés (n=45)	m : 1,5 µg/L ; Md : 1 µg/L ; max : 8 µg/L	Toxiques/létales
Incendies de véhicules (n=8)	m : 1 µg/L ; Md : 0,3 µg/L	Toxiques/létales
Immolations (n=12)	m < 0,25 µg/L (0,01 à 0,4 µg/L , 1 cas à 1,8 µg/L )	Variables
Vapeurs de charbon (n=17)	m < 0,25 µg/L	Faibles
Gaz d'échappement (n=6)	m < 0,25 µg/L	Faibles
Autres (n=4)	m < 0,25 µg/L	Faibles

<sup>1</sup>Rhee J. et al. *J Forensic Sci* 2011; 210: e12-15

<sup>2</sup>Stoll S et al. *Int J Legal Med* 2017;131:123-9

# Décès en foyer d'incendie

- Concentrations en cyanures souvent élevées<sup>1,2</sup>
  - Phénomène inconstant
- Facteurs favorisants<sup>2-4</sup>
  - Espaces confinés
  - Milieu industriel ou domestique
  - Nature des matériaux de combustion
    - Matières plastiques contenant des polymères azotés (polyuréthane, polyacrylonitrile...)
  - Victime proche du point de départ
  - Température très élevée favorisant une néoformation
  - Temps d'exposition à la chaleur long
  - Délai entre l'incendie et l'autopsie important
  - Dilacérations majeures

<sup>1</sup>Stoll S et al. *Int J Legal Med* 2017;131:123-9

<sup>2</sup>Ferrari LA & Giannuzzi L. *Forensic Sci Int* 2015;256:46-52

<sup>3</sup>Moriya F & Hashimoto Y. *Legal Med* 2003;5:S113-7

<sup>4</sup>Michiue T et al. *Legal Med* 2015;17:43-7

# Décès en foyer d'incendie

- Relations entre  $\text{CN}^-$ , HbCO et MetHb<sup>1,2</sup>?
  - Pas de corrélation entre HbCO et  $\text{CN}^-$
  - Relation entre  $\text{CN}^-$  et MetHb ?
    - 2 hypothèses évoquées lors des incendies
      - Dégagement important de  $\text{NO}_x$  → conversion d'Hb en MetHB
      - élévation de la température ( $> 75^\circ\text{C}$ ) → dénaturation d'Hb en MetHB
    - Conséquences
      - Fixation des cyanures sur MetHb → formation de cyanmethémoglobine non toxique
      - Diminution des  $\text{CN}^-$
      - Augmentation de la MetHb totale (MetHb libre + MetHB liée aux cyanures) :  $\geq 18\%$
      - Disparition de la MetHb libre
    - En pratique
      - MetHB totale élevée et  $[\text{CN}^-]$  faible : probable diminution des cyanures par combinaison à la méthémoglobine

<sup>1</sup>Moriya F & Hashimoto Y. *Legal Med* 2003;5:S113-7

<sup>2</sup>Ferrari LA & Giannuzzi L. *Forensic Sci Int* 2015;256:46-52

# Artefacts

- Production de  $\text{CN}^-$  indépendante de toute absorption
  - Production d'origine métabolique<sup>1</sup>
    - Métabolisme du nitroprussiate
    - Dégradation de l'hypothiocyanate
    - Oxydation de nitriles aliphatiques par le CYP-450
  - Transformation chimique avant l'absorption<sup>2</sup>
    - Adjonction de nitrite d'isobutyle (poppers) dans une boisson type café/thé
    - Hydrolyse en nitrite + alcool isobutylique
    - Acidification de la boisson
    - Production de  $\text{NO}_3^-$
    - Interaction avec certains composants (polyphénols?)
    - Production de  $\text{CN}^-$

<sup>1</sup>Seto Y. *Anal Chem* 2002;74:134A-41A

<sup>2</sup>Seto Y et al. *Anal Chem* 2000;72:5187-92

# En pratique...

- Pré-analytique

- Prélèvements très précoces
- Adjonction de fluorure de sodium à 2%
- Conservation au froid (pas de température recommandée)

- Analytique

- Dosages immédiats
- Eviter les températures très élevées
- Eviter les conditions analytiques susceptibles de provoquer la transformation des cyanures en thiocyanates
- Doser différents milieux (SC, SP, CG etc.) pour documenter une redistribution

- Interprétation

- Circonstances du décès (absorption, inhalation, incendie)
- Existence de plaies contuses ou délabrantes
- Délai entre le décès et le prélèvement

# Perspectives

- Dosage de l'ATCA
  - 15% des cyanures absorbés
  - Pas de métabolisme ultérieur
  - Stable plusieurs mois à différentes températures
  - Adjonction de NaF facultative
  - Concentrations physiologiques / apport alimentaire de cyanures
  - Pas de difficulté analytique particulière
    - Dosage par GC-MS dans le plasma et l'urine (LOQ à 10 ng/mL)<sup>1</sup>
    - Dosage par LC-MS/MS dans le sang post-mortem (LOQ 1,5 ng/mL)<sup>2</sup>
    - Dosage par LC-MS/MS dans le sang et les tissus post-mortem (LOQ 1,5 ng/mL)<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Logue BA et al. *Toxicol Mech Methods* 2009;19:202-8

<sup>2</sup>Giebułtowicz J et al. *Talanta* 2016;150:586-92

<sup>3</sup>Rużycka M et al. 2017. doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00219

# Perspectives

- Dosage de l'ATCA dans les fluides

Plasma <sup>1</sup>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Non fumeurs (n=3) : <math>11,8 \pm 0,88 \mu\text{g/L}</math></li><li>• Fumeurs (n=3): <math>17,2 \pm 1 \mu\text{g/L}</math></li></ul>
Urine <sup>2</sup>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Non fumeurs (n=21) : <math>85 \pm 47 \mu\text{g/L}</math></li><li>• Fumeurs (n=19): <math>283 \pm 237 \mu\text{g/L}</math></li></ul>
Sang <i>post-mortem</i> <sup>3</sup>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Décès en soins intensifs (n=33): <math>30 - 394 \mu\text{g/L}</math> , <math>134 \pm 135 \mu\text{g/L}</math></li><li>• Décès par intoxication cyahydrique (n=1) : <math>530 \mu\text{g/L}</math></li></ul>
Sang <i>post-mortem</i> <sup>4</sup>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Victimes d'incendies (n=32)*<ul style="list-style-type: none"><li>▪ 27 avec <math>[\text{CN}^-] &lt; 1000 \mu\text{g/L}</math> et <math>[\text{ATCA}] : 107 \pm 66 \mu\text{g/L}</math></li><li>▪ 5 avec <math>1000 &lt; [\text{CN}^-] &lt; 3000 \mu\text{g/L}</math> et <math>[\text{ATCA}] : 191 \pm 78 \mu\text{g/L}</math></li></ul></li><li>• Intoxications pures (n=3): <math>[\text{CN}^-] &gt; 3000 \mu\text{g/L}</math> ET <math>[\text{ATCA}] : 1430 \pm 640 \mu\text{g/L}</math></li></ul>

*\*Site de prélèvement sanguin non renseigné*

<sup>1</sup>Logue BA et al. *Toxicol Mech Methods* 2009;19:202-8

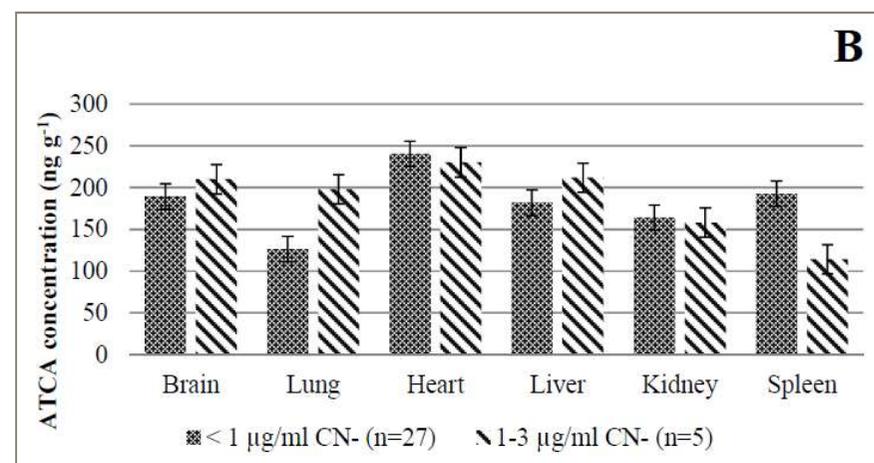
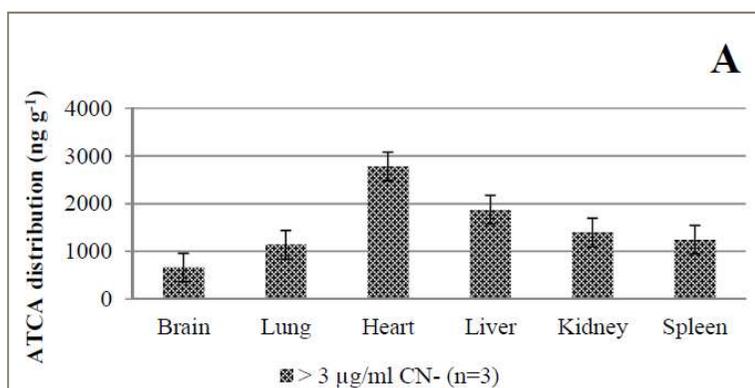
<sup>2</sup>Logue BA et al. *J Chrom B.* 2005;819:237-44

<sup>3</sup>Giebułtowicz J et al. *Talanta* 2016;150:586-92

<sup>4</sup>Rużycka M et al. 2017. doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00219

# Perspectives

- Dosage de l'ATCA dans les tissus post-mortem
  - Individus décédés non-exposés aux cyanures
    - Rate > foie > cœur > cerveau > poumon > rein
  - Individus décédés par intoxication « pure » (A)
    - Cœur > foie > rein > rate > poumon > cerveau
    - Redistribution depuis le CG ?
  - Individus décédés dans un foyer d'incendie (B)
    - Distribution plus homogène entre les différents organes
    - Concentrations plus élevées dans les poumons / intoxications « pures » / autres causes



# En conclusion

- L'interprétation des concentrations de cyanures reste un challenge
- Il est impératif de respecter les recommandations afin de limiter les erreurs d'interprétation
- Le dosage de l'ATCA est-il une voie d'avenir ?
- Nécessité de travaux complémentaires...