

Intoxication aiguë mortelle par un herbicide, la bentazone

Fatal acute poisoning by bentazon

Alain TURCANT^{* (1)}, Michel PUECH⁽²⁾, Annie CAILLEUX⁽¹⁾, Patrick HARRY⁽³⁾,
Corinne BRUHAT⁽³⁾, Nathalie VICQ⁽²⁾, Anne LE BOUIL⁽¹⁾, Pierre ALLAIN⁽¹⁾

(1) Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, CHU, 4, rue Larrey - 49033 ANGERS Cedex

(2) SAMU 61, CH ALENÇON 61000

(3) Centre Anti-Poison, CHU - ANGERS

*Auteur à qui adresser la correspondance : Alain TURCANT, Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie,
CHU, 4, rue Larrey - 49033 ANGERS Cedex - Tél : +33 (0) 241 35 45 52 - Fax : +33 (0) 241 35 48 77

(Reçu le 20 décembre 2000 ; accepté le 2 février 2001)

RÉSUMÉ

Un agriculteur de 56 ans est transporté en ambulance vers l'hôpital 1h (H1) après l'ingestion volontaire de 500 ml de FIGHTER® (bentazone, 480 g/L eau). Il présente une vigilance normale, une polypnée, une diarrhée profuse et des vomissements. Pendant le trajet, le patient devient très agité, transpire beaucoup et présente une brutale difficulté respiratoire conduisant à un arrêt cardiaque. Une hypertonie musculaire généralisée extrême rend impossible l'intubation trachéale (H1,5). Les gestes de réanimation sur place sont sans succès et le patient décède environ 2h après l'ingestion. L'analyse d'un échantillon de plasma et d'urine péri-mortem, par CLHP-UV-DAD après extraction par le dichlorométhane, ne montre ni strychnine ni autres médicaments ou toxiques à l'exception du citalopram ([plasma] <0,1 mg/L) et de la bentazone. Les concentrations plasmatique et urinaire de bentazone, mesurées soit par CPG, soit par CLHP après précipitation des protéines (plasma) ou simple dilution (urine), sont respectivement égales à 1500 et 1000 mg/L. L'identification de la bentazone (P.M. 240) est confirmée par ses spectres de masse sous forme non dérivée (ESI⁻, m/z 239, 197, 175, 132) et sous forme méthylée (EI⁺, m/z 254, 212, 175). Le métabolite 6-hydroxylé (EI⁺, m/z 284, 242, 163 ; ESI⁻, m/z 255, 213, 191, 148) ainsi que le dérivé N-glucuronide de la bentazone (ESI⁻, m/z 415, 239) sont mis en évidence dans l'urine.

MOTS-CLÉS

Fighter®, Bentazone, Métabolites, CLHP-SM-SM, Intoxication aiguë.

SUMMARY

A 56-year old farmer was transported by ambulance to hospital 1h after voluntary ingestion of 500 ml FIGHTER® (bentazon, 480 g/L water). He presented a Glasgow score 15, polypnea, diarrhea, vomiting. During the transport, he was tossing, sweating and suddenly presented a breathing difficulty followed by heart failure. An extreme general muscle rigidity prevented any tracheal intubation (H1.5). All attempts at resuscitation failed. HPLC-DAD on peri-mortem plasma and urine, showed neither strychnine nor other drugs or toxicants except citalopram ([plasma] < 0.1 mg/L) and bentazon. Plasma and urine levels of bentazon, measured after GC-MS or HPLC-protein precipitation or dilution, were respectively 1500 and 1000 mg/L. Bentazon presence (M.W. 240) was confirmed by the mass spectra of the underivatized (ESI⁻, m/z 239, 197, 175, 132) and methylated (EI⁺, m/z 254, 212, 175) molecule. An hydroxylated metabolite (ESI⁻, m/z 255, 213, 191, 148 ; EI⁺, m/z 284, 242, 163) and the N-glucuronide of bentazon (ESI⁻, m/z 415, 239) were also detected in urine.

KEY-WORDS

Fighter®, Bentazon, Bentazone, LC-DAD, GC-MS, LC-MS-MS, Acute poisoning.

Introduction

La bentazone ou 3-isopropyl-(1H)-benzo-2, 1,3-thiadiazin-4-one 2,2-dioxyde est un acide faible (pKa 3,3) de type benzothiadiazole (figure 1) utilisé comme herbicide de contact sélectif de postlevée surtout dans les cultures céréalières. Elle inhibe la photosynthèse en empêchant la fixation du CO₂ chez les plantes sensibles (dicotylédones)(1). Cette substance est commercialisée soit seule (Basagran®, Fighter®) soit en association avec des herbicides de type phénoxyacide (dichlorprop) ou autre (atrazine, bromoxynil)(2).

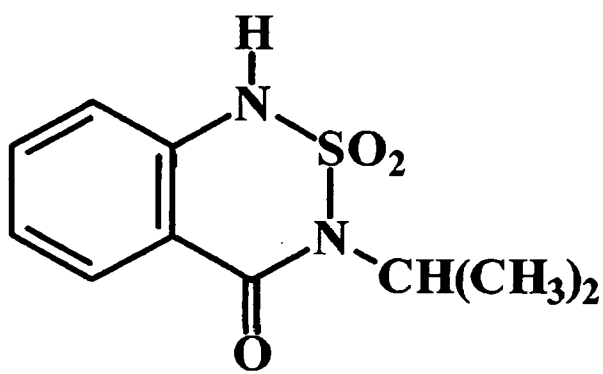


Figure 1 : Formule chimique de la bentazone

La toxicité de cette substance pour les mammifères diffère selon l'espèce avec des DL50 égales à 1100 mg/kg chez le rat mais seulement 400 et 500 mg/kg chez la souris et le chat respectivement. Un seul cas d'intoxication humaine a été retrouvé dans la littérature (3). Les symptômes, tels vomissements, fièvre, sueurs, obnubilation ainsi qu'une rigidité musculaire, sont apparus 10 min après l'ingestion de 132 g de Basagran® (solvant : eau). Après lavage gastrique, traitement par charbon, un traitement par la bromocriptine 2,5 mg deux fois par jour a été instauré pendant 3 jours. Une rhabdomyolyse a été observée à J1 (créatine phospho-kinase 1009 U/L), s'est majorée à J2 (4600 U/L) avant de revenir à la normale. L'évolution du patient a été favorable. Aucune donnée d'analyse toxicologique n'a été décrite.

Nous rapportons un cas d'intoxication mortelle après ingestion de bentazone (FIGHTER®). Le produit a été analysé par chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à un détecteur UV à barrette de diodes (UV-DAD) selon notre technique habituelle de dépistage des toxiques (4) et sa nature a été confirmée par CPG et CLHP couplées à la spectrométrie de masse (CPG-SM et CLHP-SM-SM). La structure de 2 métabolites observés a pu être déterminée.

Observation

Un agriculteur de 56 ans, dépressif, ingère à 13h, 500 ml d'un herbicide (FIGHTER®) contenant 480g de bentazone par litre d'eau. Le médecin traitant constate 45 min plus tard une polypnée, un score de Glasgow à 15, une tension artérielle systolique à 160/80 mm Hg, un pouls à 120/min. Le patient a déjà eu une diarrhée profuse et des vomissements. Il est immédiatement conduit par ambulance vers l'hôpital distant de 37 km. Le SAMU et le centre anti-poison sont informés. Vers 14h10, le patient présente un nouvel épisode diarrhéique. Il est très agité, indique qu'il va mourir et transpire énormément. A 14h25, il présente une brutale dépression respiratoire puis en 5 min une perte de conscience. L'ambulancier constate un arrêt cardiaque, une rigidité musculaire et commence un massage cardiaque jusqu'à l'arrivée du médecin urgentiste 7 min plus tard. Le malade est alors en arrêt cardio-respiratoire avec une rigidité de marbre, une cyanose et une mydriase bilatérale aréactive. Le massage cardiaque externe et la ventilation au masque à 100 % de FiO₂ n'ont aucun effet. L'intubation trachéale tant par voie buccale que nasale est impossible malgré l'utilisation de sondes de différents calibres. L'ECG ne montre aucune activité électrique. Les chocs avant et après administration intracardiaque d'adrénaline ne donnent aucun résultat. La réanimation est arrêtée à 16h soit 3h après l'ingestion. Deux échantillons sanguin et urinaire ont été prélevés environ 2h après l'heure supposée de l'ingestion. Un bilan toxicologique initial (éthanol, benzodiazépines, antidépresseurs tricycliques) a été complété par une analyse chromatographique de type "screening" par CPG-NPD et CLHP-UV-DAD (4) ainsi que par des analyses orientées vers les pesticides (chloralose, cholinestérases). Des analyses complémentaires notamment par couplage à la spectrométrie de masse ont été effectuées.

Matériels et Méthodes

Réactifs

L'éther éthylique (Merck), le méthanol, le dihydrogénophosphate de sodium, le carbonate de potassium, l'acétate de sodium, le diméthylsulfate (Prolabo) sont de qualité "pour analyses" et le formiate d'ammonium (Merck), l'acétonitrile (Carlo Erba) "pour chromatographie". La bentazone (B) et l'acide 2-méthyl-4-chlorophénoxyacétique (MCPA), utilisé comme étalon interne (EI), ont été obtenus respectivement chez PROMOCHEM (Molsheim) et ALDRICH Chemical Company (Lyon). La 6-hydroxy bentazone (6-OHB) a été gracieusement fournie par BASF France. Les solutions-mères sont préparées à 1 g/L dans le méthanol ou l'acétonitrile (MCPA) et conservés à 4° C.

Instrumentation

Trois appareillages différents ont été utilisés :

1- Ensemble de chromatographie HP1090 équipé d'un détecteur UV à barrette de diodes (DAD) et du logiciel HP Chemwin. La séparation chromatographique est effectuée sur une colonne Hypersil ODS 5 μ m (100 x 2,1 mm d.i.) munie d'une précolonne (20 x 2,1 mm d.i.). Le débit est égal à 400 μ l/min. La phase mobile est un mélange de tampon phosphate 20mM (contenant 0,5 ml de triéthylamine par litre) et d'acétonitrile. L'analyse est effectuée en gradient selon des conditions précédemment décrites (4).

2- Chromatographe en phase gazeuse (UNICAM,) couplé à un spectromètre de masse AUTOMASS (UNICAM) équipé d'une colonne capillaire HP Ultra 2 (25 m x 0,32 mm d.i.). La pression en tête de colonne est réglée à 6 p.s.i.. L'analyse est effectuée en mode splitless (1 min) avec une programmation de température (60° pendant 1 min puis 30° C/min jusqu'à 170° et 10° C/min jusqu'à 240°). Les températures de l'injecteur, de l'interface et de la source sont respectivement égales à 275° C, 250° C et 150° C. L'ionisation est faite en mode positif à 70 eV et l'acquisition en mode balayage de 40 à 500 u.m.a.

3- Spectromètre de masse API 300 (Perkin Elmer Sciex, Thornhill, Canada) équipé de 2 pompes à micro-débit, d'une source d'ionisation à pression atmosphérique de type "turbo ionspray". L'ensemble est piloté par un micro-ordinateur Power Macintosh équipé du logiciel Sciex. La séparation chromatographique est effectuée sur une colonne Spheri5 RP8S (100 x 2,1 mm d.i., Applied Biosystems). Le débit est égal à 400 μ l/min sans split en sortie de colonne. La phase mobile est composée de tampon formiate d'ammonium (2mM) – acide formique (0,1 %) et d'acétonitrile en conditions isocratiques 60/40 v/v. Les principaux paramètres de réglage sont les suivants : la tension d'ionisation est fixée à 5000 V en mode négatif, la tension d'orifice à -31 V, le gaz de nébulisation (air) est de 1,1 l/min et le gaz rideau (azote) de 0,9 l/min. L'acquisition en mode tandem est faite avec une énergie de collision de 20 eV et un débit de gaz de collision (azote) égal à 0,3 l/min. Un ion-parent est sélectionné dans le 1^{er} quadrupôle, fragmenté dans la chambre de collision et les ions-fils sont observés par balayage entre 90 u.m.a. et la masse de l'ion-parent dans le 2^{ème} quadrupôle.

Préparation de l'échantillon

Pour le dosage par CLHP-DAD : L'extraction en milieu alcalin est faite en 10 min par 5 ml de dichlorométhane sur 500 μ l de plasma ou d'urine après ajout de 25 μ l de prazépam (20 mg/L) et de 30 μ l de soude 1N (plasma)

ou 500 μ l de NaHCO₃ 1N (urine) selon des conditions précédemment décrites (4). L'extraction en milieu acide est faite en 10 min par 5 mL de dichlorométhane sur 500 μ l de plasma ou d'urine après ajout de 25 μ l de MCPA (50 mg/L) et 500 μ l de tampon acétate de sodium 0,2 M pH 4,0. Après centrifugation 2 min à 3500 tours/min dans les 2 cas, la phase organique est évaporée à 50° C sous azote et l'extrait sec est repris par 50 μ l de méthanol puis 20 μ l d'eau. Le volume d'injection est égal à 10 μ l.

Pour le dosage par CPG-SM : Le plasma et l'urine sont préparés selon des conditions préalablement décrites pour le dosage des barbituriques (5). A 100 μ l d'échantillon sont ajoutés 25 μ l de méthohexital à 0,1 mg/ml, 250 μ l de solution saturée de carbonate de potassium dans un mélange méthanol-eau (90/10) et 10 μ l de diméthylsulfate. L'ensemble est porté à 56° C pendant 10 min puis extrait après ajout de 250 μ l de tampon acétate de sodium 0,2 M pH 4,0 par 1 ml d'hexane. Le volume d'injection est 1 μ l.

Pour le dosage par CLHP-SM-SM : Le plasma et l'urine ont été analysés après simple précipitation des protéines (100 μ l échantillon + 100 μ l MCPA à 50 mg/L dans l'acétonitrile) puis dilution au 1/2 du surnageant de centrifugation et injection de 25 μ l.

Résultats

L'alcoolémie, le dépistage immunochimique, la recherche de chloralose sont négatifs et l'activité des cholinestérases plasmatiques est normale. L'analyse CLHP-DAD du prélèvement sanguin a mis en évidence seulement la présence de citalopram (<0,1 mg/L) et d'un produit élué précocement (Tr = 1,5 min) dont le spectre UV avec un maximum d'absorption à 225 nm (figure 2) n'a pas été initialement identifié par notre base de données spectrales (500 médicaments et 150 pesticides). Ce spectre a été confirmé après obtention de la substance pure comme étant bien celui de la bentazone. La bentazone a été détectée avec les conditions d'extraction alcaline bien que cette molécule soit un acide faible donc faiblement extrait ce qui laissait supposer des concentrations très importantes. La même analyse après extraction à pH 4,0 a montré un pic chromatographique beaucoup plus intense.

L'analyse par CPG-SM après méthylation a permis de confirmer la présence de B (Tr = 7,5 min, figure 3). L'ion 212 observé pour B correspond à M-42, c'est à dire à la perte du groupement isopropyle. Un 2^{ème} pic d'intensité beaucoup plus faible (1/50) est détecté dans l'urine avec un temps de rétention plus important (Tr = 9,2 min). Un décalage de masse de +30 est observé et cette molécule pourrait être un métabolite hydroxylé de

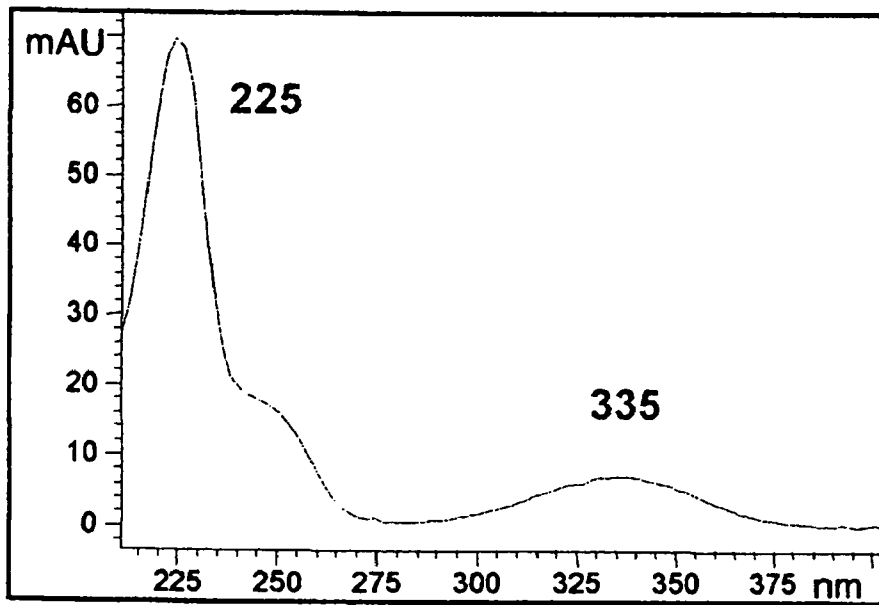


Figure 2 : Spectre UV de la bentazone.

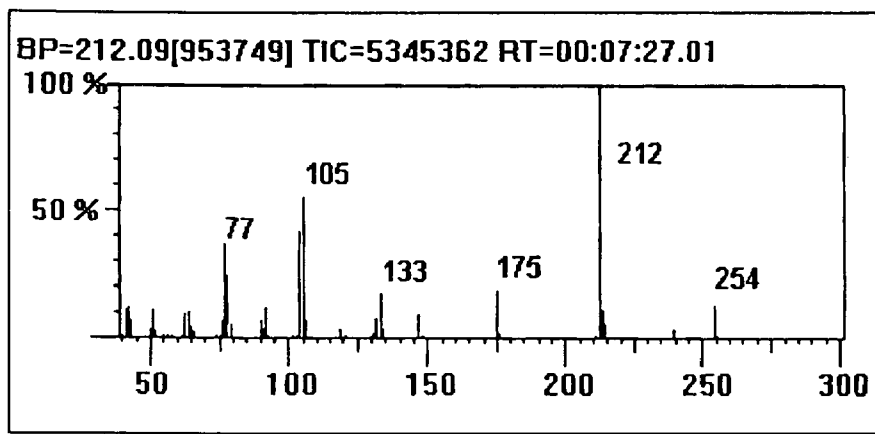


Figure 3 : Spectres de masse en impact électronique et ionisation positive de la bentazone sous forme de dérivé méthylé après CPG.

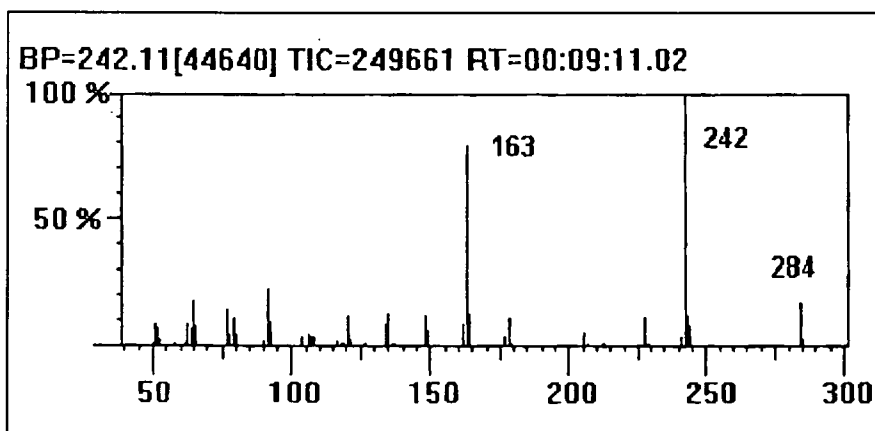


Figure 4 : Spectres de masse en impact électronique et ionisation positive du métabolite hydroxylé de la bentazone sous forme de dérivé diméthylé après CPG.

Tableau I : Ions caractéristiques de la bentazone et de ses métabolites N1-glucuronide (BG) et hydroxylé (6-OHB) en CLHP/SM après ionisation négative.

	Tr (min)	M-1	Ions-Fils
Métabolite 1 (BG)	0,95	415	239
Métabolite 2 (6-OHB)	1,5	255	213, 191, 148, 149
Bentazone	2,2	239	197, 175, 132, 133

B sous forme diméthylé (figure 4).

L'analyse par CLHP-SM-SM confirme ces résultats avec la mise en évidence de l'ion 239 (M-1) de la bentazone (Tr = 2,2 min), d'un produit avec un ion pseudomoléculaire 255 soit B+16 compatible avec un dérivé hydroxylé (Tr = 1,5 min) mais également d'un produit de temps de rétention plus court (0,95 min) avec un ion 415. Les fragmentations de ces différents ions sont présentées dans le tableau I. L'ion 197 observé pour B correspond au départ du groupement isopropyle et un décalage de masse de +16 est observé pour l'ensemble des ions-fils du métabolite supposé hydroxylé. Ce produit a été confirmé comme étant la 6-OHB par comparaison avec la substance pure. Le produit de rapport m/z 415 se fragmente en donnant seulement l'ion 239 : ce décalage de +176 par rapport à l'ion pseudomoléculaire supposé ainsi que le temps de rétention plus court sont en faveur du métabolite N1-glucuronide de B.

Les concentrations de B mesurées sur des échantillons dilués ($\geq 1/10e$) de plasma et d'urine par CLHP et précipitation ou dilution et par CPG sont respectivement égales à 1450 et 1550 mg/L pour le plasma et 950 et 1100 mg/L pour l'urine. La quantification du métabolite hydroxylé n'a pas été effectuée.

Discussion

Les données analytiques sur la bentazone concernent essentiellement l'analyse de traces dans les eaux de ruissellement et/ou de rivières (6-9). Dans tous les cas il s'agit de méthodes par CLHP couplée à une détection UV à barrette de diodes ou à la spectrométrie de masse. Dans ce dernier cas, c'est l'ionisation en mode négatif qui donne la meilleure sensibilité en raison du caractère acide faible de la bentazone. Les fragmentations décrites sont équivalentes à celles que nous avons observées. Aucune donnée n'a été retrouvée concernant l'analyse de la bentazone par CPG bien que cette molécule soit aisément identifiable sous forme de dérivé méthylé. Cette méthode a permis de compléter l'identification de la molécule et de son métabolite hydroxylé.

La bentazone peut conduire par hydroxylation à deux dérivés hydroxylés sur le cycle phényl soit en position

6, c'est à dire en méta à l'opposé du groupement -NH, soit en position 8 (en ortho du côté de la fonction -NH). Ces deux métabolites présentant les mêmes caractéristiques chromatographiques, le même spectre de masse et des fragmentations identiques (6) sont donc difficiles à différencier. Seul le métabolite 6-OH a pu être testé, le métabolite 8-OH n'étant pas disponible auprès des laboratoires BASF. Une hydroxylation en position 8 ne peut donc être exclue mais une étude *in vivo* (10) indique que le métabolite 6-OH est le produit majeur du métabolisme de phase I au moins chez les végétaux. La présence des 2 dérivés est cependant confirmée dans les eaux de rivières (6). Une étude chez le rat, avec analyse en chromatographie couche mince, indique la présence dans l'urine de 2 métabolites mineurs dont l'un pourrait être le dérivé N1-glucuronide (11). La limite de détection des méthodes utilisées dans le cas présent n'a pas été étudiée mais des concentrations voisines de 1 mg/L sont détectables avec une prise d'essai de seulement 100 µl.

Conclusion

L'étude de ce cas d'intoxication mortelle observée après ingestion volontaire de bentazone illustre les intérêts de chacune des techniques utilisées. Le diagnostic de l'intoxication a pu être effectué rapidement par la CLHP-DAD. L'identification formelle de 2 métabolites a été possible, grâce à la spectrométrie de masse, par la comparaison des ions caractéristiques de la bentazone et de ses métabolites tant à partir de la CPG qu'après CLHP. Les concentrations plasmatiques et urinaires très élevées sont en relation avec la dose très importante ingérée (240 g) et sont à relier aux symptômes cliniques précoces et graves avec notamment la rigidité musculaire. Toutefois, le mécanisme de toxicité reste à démontrer. Ce premier cas d'intoxication par la bentazone pour lequel des dosages ont été effectués complètement ainsi le cas précédemment décrit sur cet herbicide et les informations disponibles sur la cinétique et le métabolisme de cette substance chez l'animal ou dans les végétaux.

Remerciements

Les auteurs remercient S. Beduneau et M. Serrano pour leur contribution technique à certaines des analyses effectuées et pour la qualité du travail quotidien concernant l'analyse toxicologique des médicaments et autres toxiques.

Références

1. Scalla R., Gauvrit C. Mécanismes d'action phytotoxique des autres familles d'herbicides. In : Scalla R., Les Herbicides : mode d'action et principes d'utilisation. INRA, 1991 ; 115-91.
2. The agrochemicals handbook, 2nd ed. Royal Society of Chemistry : Hartley D. ed. 1987.
3. Lin T.J., Hung D.Z., Hu W.H., Yang D.H., Wu T.C. Acute basagran poisoning mimicking neuroleptic malignant syndrome. Human & Experimental Toxicology 1999 ; 18 : 493-4.
4. Turcant A., Premel-Cabic A., Cailleux A., Allain P., Toxicological screening of drugs by microbore high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection and ultraviolet spectral library searches. Clin. Chem. 1991 ; 37 : 1210-5.
5. Turcant A., Premel-Cabic A., Cailleux A., Allain P., Micromethod for automated identification and quantitation of fifteen barbiturates in plasma by gas-liquid chromatography. J. Chromatogr. 1982 ; 229 : 222-6.
6. Chiron S., Papilloud S., Haerdi W., Barceló D. Automated on-line liquid-solid extraction followed by liquid chromatography-high flow pneumatically assisted electrospray mass spectrometry for the determination of acidic herbicides in environmental waters. Anal. Chem. 1995 ; 67 : 1637-43.
7. Pinto G.M., Jardim I.C. Determination of bentazon residues in water by high-performance liquid chromatography. Validation of the method. J. Chromatogr. A. 1999 ; 846 : 369-74.
8. Baglio D., Kotzias D., Larsen B.R. Atmospheric pressure ionisation multiple mass spectrometric analysis of pesticides. J. Chromatogr. A. 1999 ; 854 : 207-20.
9. Steen R.J., Hogenboom A.C., Leonards P.E., Peerboom R.A., Cofino W.P., Brinkman U.A. Ultra-trace-level determination of polar pesticides and their transformation products in surface and estuarine water samples using column liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 1999 ; 857 : 157-66.
10. McFadden J.J., Gronwald J.W., Eberlein C.V. In vitro hydroxylation of bentazon by microsomes from naphthalic anhydride-treated corn shoots. Bioch. Biophys. Res. Com. 1990 ; 168 : 206-13.
11. Chasseaud L.F., Hawkins D.R., Cameron B.D., Fry B.J., Saggars V.H. The metabolic fate of bentazon in the rat. Xenobiotica 1972 ; 2 : 269-76.