

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE



ANNEE UNIVERSITAIRE 2008 - 2009

THESE N° 3336 ¹¹

D.P.

**L'ETHYL-GLUCURONIDE, MARQUEUR DE L'ETHYLISME :
MISE AU POINT DU DOSAGE DANS LES CHEVEUX ET
APPLICATIONS**

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

obtenue après soutenance du

MEMOIRE

du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Pharmacie hospitalière et des collectivités

présenté et soutenu publiquement

le 21 octobre 2008 à Limoges

par

Fabien LAMOUREUX

né le 12 février 1980 à Rouen



JURY

Mr le Professeur Gérard LACHÂTRE.....Président
Mme le Docteur Marie-Françoise DREYFUSS.....Juge
Mme le Docteur Christine VALLEJOJuge
Mr le Docteur Jean-Michel GAULIER.....Directeur de thèse
Mr François-Ludovic SAUVAGE.....Membre invité

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences

ASSESEURS Monsieur le Professeur **CARDOT** Philippe
Madame **FAGNERE** Catherine, Maître de Conférences

PROFESSEURS

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE - CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DREYFUSS Gilles	PARASITOLOGIE-MYCOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE - HYDROLOGIE - ENVIRONNEMENT
LOUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES

ALLAIS Daovy	PHARMACOGNOSIE
BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BILLET Frabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUES, INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DELEBASSEE Sylvie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LARTIGUE Martine	PHARMACODYNAMIE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE A LA THERAPEUTIQUE
ROUSSEAU Annick	BIOMATHEMATIQUES
SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE PHARMACEUTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE
VIGNOLES Philippe	BIOMATHEMATIQUES

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Michel ANGLAIS

ATER A MI-TEMPS

GIRY Karine
Sce de Pharmacie Galénique
(du 01/09/2008 au 31/08/2009)

REMERCIEMENTS

A M. le Professeur Gérard LACHÂTRE

Vous nous faites l'honneur de présider ce jury de thèse. Nous connaissons votre droiture et votre rigueur. Nous avons également pu découvrir, durant ces semestres d'internat passés dans votre laboratoire, votre énergie exceptionnelle, vos connaissances et surtout quelqu'un de formidablement sympathique. Nous vous remercions infiniment de la confiance que vous nous avez accordée pour la réalisation de ce travail. Vous avez toujours su trouver les mots appropriés pour puiser en nous une motivation « inespérée ». Nous garderons un excellent souvenir de notre passage dans votre service. Soyez assuré de notre plus profond respect.

A Mme le Docteur Marie-Françoise DREYFUSS

Vous nous faites l'honneur de participer à ce jury de thèse. Nous avons beaucoup de respect pour votre rigueur et apprécions votre constante bonne humeur. Nous avons pu découvrir grâce à vous un système d'assurance qualité performant, en particulier durant les nombreuses nuits de garde passées dans le Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie du C.H.U. de Limoges. En tant que Responsable Assurance Qualité dans ce laboratoire, votre avis sur ce travail compte beaucoup pour nous.

A Mme le Docteur Christine VALLEJO

Vous nous faites l'honneur de participer à ce jury de thèse. Nous avons pu apprécier votre disponibilité durant l'élaboration de ce travail et votre accueil dans le service des urgences du C.H.U. de Limoges, abusant certainement de votre temps précieux de médecin urgentiste et chef de service. Nous vous remercions sincèrement de votre collaboration et de l'intérêt que vous porterez à cette étude.

A M. le Docteur Jean-Michel GAULIER

Jean-michel, je te remercie sincèrement pour tout ce que j'ai appris à tes côtés au cours des semestres d'internat passés dans le laboratoire. C'est toujours avec un réel plaisir que j'ai eu la chance de travailler avec toi. J'ai pu apprécier ta rigueur, tes compétences et ta passion communicative pour la toxicologie. Merci également d'avoir accepté de m'encadrer pour ce travail avec tant de disponibilité et de gentillesse.

A M. François-Ludovic SAUVAGE

Je te remercie sincèrement pour tes conseils techniques et ton savoir-faire d'ingénieur « émérite », indispensables à la réalisation de ce travail. Tes connaissances dans le domaine de la LC-MS/MS m'ont apporté beaucoup et travailler avec toi est toujours un plaisir. Je salue également ta bonne humeur, ton sens de l'humour et ta disponibilité.

A Mlle Magali MERCEROLLE

Magali, je garde un excellent souvenir de mon passage dans le secteur de toxicologie médico-légale. J'ai pu profiter de tes connaissances et de tes conseils avisés d'ingénieur lors de nos premières tentatives de dosage de l'EtG dans les cheveux par GC-MS/MS. Je te remercie sincèrement pour ton encadrement et ta disponibilité dans la mise au point de ce travail.

A Stéphanie,
Merci pour tout ce que tu m'apportes au quotidien, tes encouragements et ta patience.

A Jeanne,
14 mois déjà, tu nous combles de bonheur (de bonne heure aussi !) et ce n'est encore qu'un début...

A mes parents Jean-Paul et Louise, mes frères Julien et Olivier,
Merci de votre amour, de votre soutien et de votre confiance si précieux. J'aimerais tant que nous soyons géographiquement réunis...

A ma « petite » mamie, à Bruno / Sophie / Anna, Michel / Jocelyne/ Pierre et François,
Merci pour votre soutien durant ces années d'études et pour tous ces bons moments passés à vos côtés.

A mon Papy, à Mamie et Maxime,
Nous aurions tant aimé que vous rencontriez Jeanne...

A Guiguite et Jean-Pierre, Manou, Léo, Zoé et Imanol,
Je vous apprécie énormément, merci pour ces petits instants de bonheur passés à vos côtés...à tous ces messieurs « sagouins » et autres olibrius dans le genre que nous croiserons !

A Cécile,
Ma cousine adorée, tu nous as quitté bien trop tôt et nous ne t'oublions pas, j'aurais tant voulu que tu voies Jeanne.

A Stéphane, Jules et Lisa, avec toute mon affection.

A Claudine, Jacky et Christophe

A toute la famille Hardeman,
Merci de votre accueil chaleureux et votre gentillesse.

A Mes Amis Guillaume (Chips, le C... qui F...) et Florence, merci pour votre soutien, pour tous ces excellents moments passés ensemble, nous attendons le petit Louis avec impatience...

A Karim, je te souhaite tout le bonheur que tu mérites, merci de ton amitié et de ton soutien.

A JB et Marie-Lo, merci de votre amitié et de votre constante bonne humeur.

A Pierre, Seb, Cédric, Axel, Natch et Amaury, Seb et Christelle, Jean-Luc et Amélie sans oublier leurs deux bouts'd'chou, Justine et Vincent félicitations aux jeunes mariés, Fred, Alex et Théo, Sophie et Daniel, Pierre-Yves et Charlotte, Anne-Laure, Alex from Limoges, Patrick et Céline et tant d'autres... pour tous les bons moments passés ensemble et à venir !

A mes co-internes actuels et passés qui ont dû me supporter et qui seraient amenés à continuer si cette thèse n'était pas acceptée...pour ne citer que les meilleur(e)s : Géraldine (best-of), Pierre, Charlotte, Laure, Séverine, Caroline, Audrey, Anne-Charlotte Sophie, Guillaume, Catherine, Coralie, Laurent...Merci !

**Aux praticiens, techniciens, et aux ingénieurs du Service de Pharmacologie-Toxicologie-Pharmacovigilance du C.H.U. de Limoges,
Vous citer tous serait trop long et je risque d'en oublier... J'apprécie beaucoup votre professionnalisme et votre bonne humeur. Vous m'avez beaucoup appris.**

Un remerciement tout particulier à Huguette Faubert, cadre de santé du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, pour son organisation remarquable des plannings de gardes...

Merci à Julien Morichon pour sa participation à l'amélioration de cette technique analytique et ses conseils techniques.

TABLE DES MATIERES

I.	INTRODUCTION.....	10
II.	EPIDEMIOLOGIE DE L'ETHYLISME	11
II.1.	GENERALITES.....	11
II.2.	DEFINITIONS	11
II.3.	DOMMAGES SANITAIRES ET SOCIAUX ATTRIBUABLES A L'ALCOOL EN FRANCE	12
II.3.1.	<i>Dommages sanitaires engendrés par l'alcoolisme</i>	<i>12</i>
II.3.2.	<i>Evaluation de l'impact médico-social de l'éthylisme</i>	<i>15</i>
III.	INTERET TOXICOLOGIQUE DES CHEVEUX.....	18
III.1.	STRUCTURE DES CHEVEUX.....	18
III.2.	INCORPORATION DES XENOBIOTIQUES DANS LES CHEVEUX.....	22
III.3.	ANALYSE TOXICOLOGIQUE DES CHEVEUX.....	26
IV.	LES MARQUEURS BIOLOGIQUES DE L'ETHYLISME.....	28
IV.1.	GENERALITES.....	28
IV.2.	METABOLISME DE L'ETHANOL	29
IV.3.	MARQUEURS INDIRECTS DE L'ETHYLISME.....	32
IV.3.1.	<i>Gamma Glutamyl Transferase (GGT).....</i>	<i>32</i>
IV.3.2.	<i>Volume Globulaire Moyen (VGM).....</i>	<i>33</i>
IV.3.3.	<i>Alanine et Aspartate Amino Transferases (ASAT et ALAT).....</i>	<i>34</i>
IV.3.4.	<i>Transferrine déficiente en carbohydrates (CDT).....</i>	<i>35</i>
IV.4.	MARQUEURS DIRECTS DE L'ETHYLISME.....	39
IV.4.1.	<i>L'éthanol.....</i>	<i>39</i>
IV.4.2.	<i>L'Ethyl-Glucuronide (EtG).....</i>	<i>40</i>
IV.4.3.	<i>Les Ethyl-Ester d'Acides Gras (FAEE)</i>	<i>44</i>
IV.4.4.	<i>Autres marqueurs directs de l'éthylisme.....</i>	<i>45</i>
IV.4.4.1.	<i>L'Ethyl-sulfate</i>	<i>45</i>
IV.4.4.2.	<i>Les congénères de l'éthanol</i>	<i>46</i>
V.	MISE AU POINT DU DOSAGE DE L'ETHYL-GLUCURONIDE DANS LES CHEVEUX..	47
V.1.	MATERIELS ET METHODES	47
V.1.1.	<i>Matériels.....</i>	<i>47</i>
V.1.2.	<i>Procédure de décontamination et d'extraction des échantillons capillaires.....</i>	<i>47</i>
V.1.3.	<i>Système chromatographique et conditions analytiques.....</i>	<i>48</i>
V.1.4.	<i>Calibration et procédure de validation de la méthode analytique</i>	<i>50</i>
V.1.4.1.	<i>Préparation de la gamme de calibration pour le dosage de l'EtG</i>	<i>50</i>
V.1.4.2.	<i>Procédure de validation de la méthode analytique</i>	<i>51</i>
V.2.	VALIDATION DE LA TECHNIQUE ANALYTIQUE	52
VI.	MISE EN APPLICATION DU DOSAGE DE L'ETHYL-GLUCURONIDE DANS LES CHEVEUX AU C.H.U. DE LIMOGES.....	59
VI.1.	ETUDE PRELIMINAIRE.....	59
VI.1.1.	<i>Objectifs.....</i>	<i>59</i>
VI.1.2.	<i>Patients étudiés.....</i>	<i>59</i>
VI.1.3.	<i>Résultats.....</i>	<i>62</i>
VI.2.	EXEMPLE D'APPLICATION : CAS MEDICO-LEGAUX.....	65
VII.	DISCUSSION	67
VIII.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	69
IX.	BIBLIOGRAPHIE.....	70

LISTE DES ABREVIATIONS

ACN.....	Acétonitrile
ADH.....	Alcool deshydrogénase
ALAT.....	Alanine aminotransférase
ALDH.....	Aldéhyde deshydrogénase
ASAT.....	Aspartate aminotransférase
CDT.....	Transférine déficiente en carbohydrates
CV.....	Coefficient de variation
DiCl.....	Dichlorométhane
ESI.....	Ionisation par électrospray
EtG.....	Ethyl-glucuronide
EtS.....	Ethyl-sulfate
FAEE.....	Esters éthyliques d'acides gras
FID.....	Détection par ionisation de flamme
GC.....	Chromatographie en phase gazeuse
GGT.....	Gamma glutamyl transférases
LC.....	Chromatographie en phase liquide
LDD.....	Limite de détection
LDQ.....	Limite de quantification
MeOH.....	Méthanol
MRM.....	Multiple reaction monitoring
MS.....	Spectrométrie de masse
MS/MS.....	Spectrométrie de masse en tandem
NCL.....	Ionisation chimique en mode négatif
OFDT.....	Observatoire français des drogues et toxicomanies
OMS.....	Organisation mondiale de la santé
SFTA.....	Société française de toxicologie analytique
SPE.....	Extraction en phase solide
SULT.....	Sulfotransférase
UGT.....	UDP glucuronyl transférase
US.....	Ultrasons
VGM.....	Volume globulaire moyen

I. Introduction

L'abus d'alcool est un problème majeur de santé publique bien connu pour les nombreuses pathologies et problèmes sociaux qu'il engendre à travers le monde [1]. Afin d'établir le diagnostic d'une consommation chronique et excessive d'éthanol chez un sujet, cliniciens et biologistes doivent disposer de marqueurs spécifiques. L'éthyl-glucuronide (ethyl- β -D-6-glucuronide, EtG) est un métabolite mineur de l'éthanol utilisé comme biomarqueur de l'éthylisme. Sa recherche dans les cheveux, le sérum et les urines présente un intérêt en toxicologie clinique et médico-légale. 90 à 95 % de l'alcool éthylique est métabolisé par réactions d'oxydation, principalement au niveau hépatique via l'alcool- et l'aldéhyde-deshydrogénase, la catalase et le système microsomal d'oxydation de l'éthanol. Une proportion mineure de l'éthanol est également excrétée par voie rénale, pulmonaire et cutanée [2]. La biotransformation de l'éthanol en EtG par conjugaison avec l'acide glucuronique activé ne représente que 0,02 à 1,5 % de son élimination totale [3]. L'EtG est détectable dans de nombreux fluides et tissus humains, en particulier dans le sérum, les urines et les cheveux même après élimination complète de l'éthanol par l'organisme. Il s'agit donc d'un marqueur potentiellement intéressant dans un contexte de toxicologie médico-légale et pour le suivi des patients traités pour alcoolisme du fait de sa spécificité et de sa fenêtre de détection.

Nous présenterons la méthode de dosage de l'EtG dans les prélèvements capillaires, développée et validée au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du C.H.U. de Limoges par technique de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), et nous présenterons quelques exemples d'application, en particulier chez des patients éthyliques chroniques hospitalisés dans le service des Urgences du C.H.U. de Limoges.

II. Epidémiologie de l'éthylisme

II.1. Généralités

La consommation d'alcool provoque des dommages sanitaires et sociaux. Elle expose tout d'abord à des risques pour la santé, variables selon les quantités absorbées, et qui dans certains cas peuvent conduire au décès. Certaines maladies sont entièrement et exclusivement attribuables à une consommation excessive d'alcool : c'est le cas pour la cirrhose alcoolique du foie, la psychose alcoolique ou la dépendance alcoolique. Pour d'autres pathologies, l'alcool constitue un facteur de risque, mais n'est pas le seul en cause. Des méthodes statistiques permettent alors de déterminer quelle est la fraction des cas d'une maladie, attribuable à la consommation de cette substance. L'alcool est souvent impliqué dans la survenue de certains cancers (cavité buccale et lèvres, pharynx, larynx, œsophage, colon et rectum, foie, mais aussi cancer du sein), de certaines pathologies cardiovasculaires (hypertension artérielle, cardiopathie ischémique), digestives (pancréatites), de traumatismes mais également d'accidents de la route, d'accidents domestiques ou encore professionnels et de suicides.

II.2. Définitions

L'alcoolisme (au sens d'éthylisme) est la conséquence de la consommation régulière et excessive de boissons alcoolisées. L'Organisation Mondiale de la Santé en donne la définition suivante : « Les alcooliques sont des buveurs excessifs dont la dépendance à l'égard de l'alcool est telle qu'ils présentent soit un trouble mental décelable, soit des manifestations affectant leur santé physique ou mentale, leur relation avec autrui et leur bon comportement social et économique, soit des prodromes des troubles de ce genre. Ils doivent être soumis à un traitement ».

En réalité, il n'existe pas de définition « scientifique et médicale » précise et consensuelle de l'alcoolisme, mais il est habituel de considérer que la consommation de boissons alcoolisées devient excessive lorsqu'elle dépasse 3 verres (soit 30 grammes d'éthanol) par jour. D'un point de vue médical, il est usuel de considérer qu'un patient souffre d'alcoolisme chronique (« alcoolo-dépendance ») lorsqu'il consomme plus de 50 grammes d'alcool (éthanol) par jour. Pour certains auteurs une consommation excessive et chronique d'alcool est avérée lorsque celle-ci atteint ou dépasse 21 boissons alcoolisées par semaine chez l'homme, et 14 chez la femme.

II.3. Dommages sanitaires et sociaux attribuables à l'alcool en France

II.3.1. Dommages sanitaires engendrés par l'alcoolisme

Au début des années 2000, environ 37 000 décès annuels étaient attribuables à la consommation excessive et répétée d'alcool, dont 10 000 par cancer [4], environ 6 800 par cirrhose ou autres pathologies digestives, 3 000 par psychose et dépendance alcoolique [5] et 2 300 décès par accidents de la route [6]. Le nombre de ces décès décroît depuis plusieurs décennies ; évolution expliquée par la diminution continue de la consommation d'alcool (Figure 1) observée en France depuis les années 1960 [7] mais également par les progrès thérapeutiques. Le taux de mortalité par cirrhose du foie a été divisé par deux chez les hommes comme chez les femmes entre 1981 et 1999 [8]. L'incidence des cancers du foie est en revanche en augmentation, mais la part de ces cancers pouvant être attribuée à la consommation d'alcool reste actuellement indéterminée. En dépit d'une évolution globalement favorable, la France continuait cependant d'occuper la première place parmi 15 pays européens pour le taux de mortalité par cirrhose alcoolique au début des années 1990 [9].

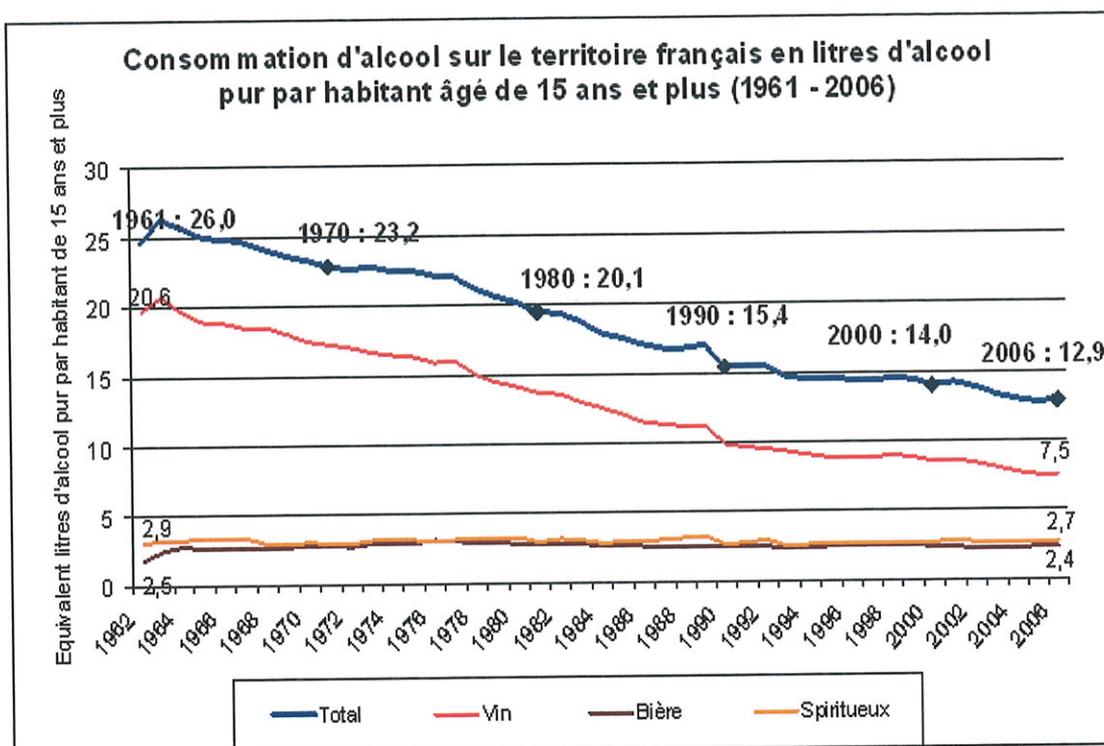


Figure 1 : Représentation graphique de l'évolution de la consommation d'alcool (en litres d'alcool pur par habitant) en France entre 1961 et 2006 (sources OFDT 2006, séries statistiques sur la consommation d'alcool).

Si les conséquences les plus dramatiques de la consommation d'alcool se mesurent en nombre de décès, il faut aussi prendre en compte l'ensemble des personnes qui, à un moment donné, ont un rapport pathologique à l'alcool (abus ou usage nocif, dépendance) et l'ensemble de personnes souffrant des conséquences en termes sanitaires de leur consommation (cirrhose, cancer, etc.).

La prévalence des problèmes d'alcool dans l'ensemble de la population a été mesurée dans plusieurs enquêtes, dont le « Baromètre santé » est la plus récente (2005) [10,11]. Une enquête auprès des patients vus en médecine de ville ou hospitalisés mérite également d'être mentionnée [12]. Les personnes sont en effet interrogées dans cette enquête par un médecin ce qui rend possible l'établissement d'un diagnostic clinique de dépendance à l'alcool. Selon le « Baromètre santé 2005 », environ 8 % des Français âgés

de 15 à 75 ans peuvent être considérés comme ayant une consommation d'alcool chronique « à risques ». Un peu moins de 1 % des Français déclarent consommer au moins 7 verres par jour, ou au moins six verres dans une même occasion presque tous les jours [10]. Les résultats issus de deux autres enquêtes récentes menées auprès d'échantillons représentatifs de la population (enquête santé 2001 de l'Insee), ou d'assurés sociaux (enquête soins protection sociale de l'Irdes) sont convergents avec ceux du baromètre santé [11].

D'après les résultats de l'enquête menée dans les hôpitaux ou les cabinets de ville, environ un patient hospitalisé ou vu par un médecin généraliste sur cinq présentait un risque d'alcoolisation excessive en 2001. Parmi les patients hospitalisés, 7 % étaient considérés comme dépendants, et parmi ceux vus en médecine de ville, cette proportion était de 5 % [12]. Il faut noter que les deux populations étudiées (patients amenés à consulter un médecin, de ville ou hospitalier un jour donné) n'étaient pas représentatives de l'ensemble de la population, et que de nombreuses études font apparaître une prévalence plus élevée des problèmes d'alcool parmi les personnes qui ont recours aux soins que dans l'ensemble de la population [13].

II.3.2. Evaluation de l'impact médico-social de l'éthylisme

L'estimation du nombre total de personnes actuellement alcoolo-dépendantes dans les enquêtes en population générale soulève donc d'importants problèmes méthodologiques. Le dépistage de la dépendance et des problèmes d'alcool repose sur un faisceau d'arguments, avec notamment des outils de diagnostics comprenant un ensemble de questions sur les comportements vis-à-vis de l'alcool, une observation clinique et la mesure de marqueurs biologiques. L'utilisation de questionnaires permet, avec les réponses fournies par les personnes interrogées, de calculer un score permettant de déterminer si une personne est dépendante ou non. Il existe plusieurs instruments de ce type dont notamment le test AUDIT et le CIDI (questions alcool), tous deux recommandés par l'Organisation Mondiale de la Santé et largement utilisés sur le plan international. Il n'existe pas à l'heure actuelle de recommandations officielles en France ou au plan international quant à l'utilisation de l'un ou de l'autre.

Indépendamment du test utilisé, il peut être fait état de certains facteurs qui vont dans le sens d'une minoration du nombre de personnes à risque d'alcoolo-dépendance dans les enquêtes téléphoniques. Les personnes sans domicile ou habitant dans des conditions précaires, ainsi que les personnes séjournant dans les institutions de soins, sont en effet difficilement touchées par une enquête téléphonique. Or, cette population comprend une proportion importante de personnes présentant ce type de problèmes. En second lieu, les personnes interrogées sur les quantités d'alcool qu'elles consomment et les problèmes qui en découlent peuvent également avoir tendance à minimiser ces quantités et ces problèmes, surtout lorsque la thématique de l'enquête porte sur les comportements de santé. L'ampleur de la minoration est difficile à évaluer. Dans une compilation de l'ensemble des résultats d'enquêtes menées dans les pays européens (presque uniquement des pays de l'Europe du Nord), dans les années 1990, la prévalence moyenne de l'alcoolo-dépendance se situait autour de 3 % [13]. Mais les résultats sont très variables d'une étude à l'autre : de 0,4 % à 14,5 % d'alcoolo-dépendants chez les hommes et de 0,1 % à 4,2 % chez les femmes. Au sein d'un même pays, les estimations peuvent varier du simple au double, selon les études. Il n'existe pas de certitudes sur le nombre d'alcoolo-dépendants en France et il paraît aujourd'hui nécessaire de poursuivre la réflexion sur les avantages et les inconvénients de

l'utilisation des différents tests de dépistage de l'alcoolodépendance dans les enquêtes de consommation.

L'impact de la consommation excessive d'alcool peut également se mesurer en terme de nombre de consommateurs d'alcool ayant recours aux soins en raison de leur consommation. Il faut distinguer la prise en charge (sevrage) de la maladie alcoolique elle-même (abus et dépendance à l'alcool), de la prise en charge des maladies qui sont la conséquence de la consommation d'alcool. En 2005, environ 125 000 consommateurs ont été reçus dans le système spécialisé de soins (Centres de cure ambulatoire en alcoologie) pour des problèmes de consommation d'alcool [14], dont près de 20 % n'ont été vus qu'une fois. Parmi les personnes prises en charge, les deux tiers étaient considérées par le personnel soignant comme alcoolodépendantes. Le système d'information des hôpitaux (PMSI) enregistrait, en 2006, 108 000 séjours avec un diagnostic principal de troubles mentaux et du comportement liés à la consommation de l'alcool (dont 60 % de séjours de moins de 24 heures suite à une ivresse aigue) et 19 000 séjours pour sevrage alcoolique [15]. La prise en compte de l'ensemble des pathologies induites par l'alcool conduit à des chiffres de prises en charge sanitaires beaucoup plus élevés. Le nombre total d'hospitalisations liées aux conséquences sur la santé des problèmes d'alcool a été estimé à 1,3 millions en 2003 [16].

Peu d'enquêtes permettent en France de quantifier les associations entre dommages sociaux et consommation d'alcool « à risques ». D'après l'enquête sur les patients vus un jour donné en médecine de ville ou à l'hôpital, et menée en 2001 [12], les personnes sans emploi hospitalisées ont 2,4 fois plus de risque d'être en situation d'alcoolisation excessive que ceux qui ont un emploi, et 2,7 fois plus de risques d'être alcoolodépendantes. Il faut remarquer que cette mesure d'association entre l'alcoolisation et une difficulté sociale ne permet en aucune façon de déterminer une causalité entre ces deux problèmes. Parmi les patients vus en médecine de ville, ceux qui sont logés de façon précaire ou sont sans abri ont près de trois fois plus de risques d'être sujets à une alcoolodépendance que ceux qui disposent d'un logement. L'enquête SD 2001, coordonnée par l'Insee et menée auprès d'un échantillon représentatif de personnes sans domicile en 2001, a toutefois montré que la consommation et les problèmes afférents sont très variables en fréquence et en intensité suivant le degré de précarité, même au sein de cette population très précarisée [17]. Le lien

entre précarité et usage d'alcool est visible dès l'adolescence. Les jeunes de 17 ans sortis précocement du système scolaire ou ayant un parcours scolaire chaotique les ayant menés dans des filières courtes ou professionnalisantes, ont près de 2 fois plus de risque de consommer de l'alcool régulièrement que les jeunes encore scolarisés en filière classique. Pour autant, l'appartenance à un milieu familial défavorisé sur le plan économique semble exercer un effet protecteur à cet âge [18].

Les cas de transgression de la loi sous influence de l'alcool constituent une autre forme de dommages sociaux. Il est nécessaire de différencier les infractions dans lesquelles l'alcool est explicitement en cause des autres infractions.

En ce qui concerne la première catégorie d'infraction, près de 68 000 personnes ont été interpellées pour ivresse publique et manifeste en 2006. Cette même année, on comptait un peu plus de 365 000 dépistages positifs de l'alcoolémie routière, soit 3,2 % de l'ensemble des dépistages [19]. Les tribunaux ont prononcé environ 128 000 condamnations pour conduite en état alcoolique, 2 478 pour blessures involontaires par conducteur en état alcoolique et 273 pour homicide par conducteur en état alcoolique [20].

La consommation d'alcool peut également être associée à d'autres types d'infractions, notamment aux violences commises à l'égard des personnes. Les travaux menés à partir des procédures judiciaires font apparaître que les problèmes d'alcool sont fréquemment mentionnés chez les auteurs de violences conjugales [21]. Sur environ 700 affaires judiciaires de violence conjugales enregistrées dans un parquet de la région parisienne, il était indiqué que, dans 28 % des cas, l'auteur consommait régulièrement des quantités importantes d'alcool. Les informations recueillies sur le comportement d'alcoolisation restent peu précises et ne permettent pas de mesurer rigoureusement le lien entre violence conjugales et alcoolisation. Elles permettent cependant de présumer que ce lien existe, la prévalence des problèmes d'alcoolisation chronique se situant plutôt autour de 10 % dans la population générale que des 28 % retrouvés dans cette étude.

III. Intérêt toxicologique des cheveux

III.1. Structure des cheveux

Le cheveu n'est pas une fibre homogène, mais une structure cylindrique riche en kératine produite au niveau du follicule pilo-sébacé : invagination de l'épithélium épidermique dans le derme, localisé entre 3 et 5 mm sous la surface du cuir chevelu (Figure 2). Chacun de ces follicules représente une unité anatomique constituée de cinq éléments: le bulbe pileux, la racine pileuse, la tige pileuse, la glande sébacée et le muscle horripilateur [22-23].

- Le bulbe pileux forme une partie renflée et implantée dans le cuir chevelu. Il est constitué d'une papille de capillaires et de cellules germinatives qui prolifèrent en donnant continuellement naissance à des cellules épithéliales dont la progression se fait vers la surface cutanée.
- La racine pileuse est incluse jusqu'à 4 mm dans le cuir chevelu et est constituée de trois zones concentriques. La *medulla* (ou zone médullaire) est la partie centrale creuse et contient des cellules lâches. La cuticule, couche la plus externe, forme une sorte d'enveloppe protectrice composée de 5 à 10 couches de cellules ressemblant à des écailles. Elle est responsable de la grande résistance physico-chimique et de la brillance des cheveux. Entre ces deux couches, le cortex (ou zone corticale) constitue la partie la plus épaisse. Le cortex est pigmenté et riche en kératine, il est ainsi responsable de la rigidité et de la coloration des cheveux.
- La tige pileuse est la partie visible du cheveu. Elle est formée des trois mêmes couches concentriques décrites précédemment pour la racine pileuse : la *medulla*, le cortex et la cuticule.
- La glande sébacée est constituée d'une partie sécrétoire et d'un court canal excréteur qui contribue à la formation d'un film hydrolipidique de surface : le sébum.

- Le muscle arrecteur ou horripilateur est disposé en écharpe sous la glande sébacée. Sous l'effet du froid ou de stimuli divers, ses contractions permettent un redressement du cheveu.

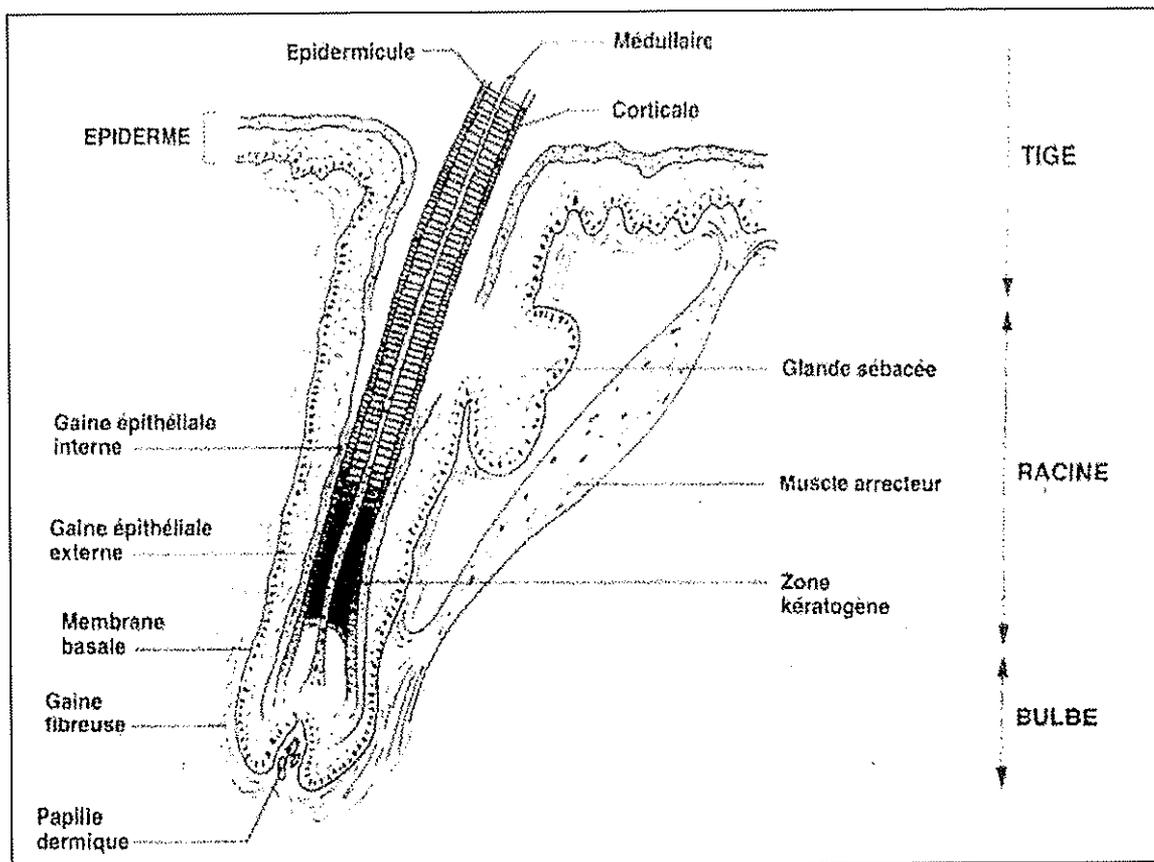


Figure 2 : Représentation schématique de la structure des cheveux.

Le follicule pilo-sébacé (Figure 3), localisé entre 3 à 5 mm sous la surface, est constitué de trois gaines concentriques : la gaine épithéliale interne, la gaine épithéliale externe et la gaine du tissu conjonctif. Le follicule est entouré d'un système capillaire riche qui fournit le matériel métabolique nécessaire pour permettre la croissance du cheveu. Le centre germinatif organisé autour de la papille du bulbe du cheveu est constitué de 2 types de cellules matricielles (les kératinocytes et les mélanocytes) particulièrement concentrées vers la membrane basale. Cette association nourrit les différentes couches du cheveu

incluant la cuticule, le cortex et la *médulla*. Les mélanocytes (Figure 3) produisent dans les mélanosomes les pigments de mélanine responsables de la couleur des cheveux et possèdent de longues dendrites pénétrant les kératinocytes voisins où ils vont décharger les vésicules de mélanosomes par un mécanisme d'exocytose.

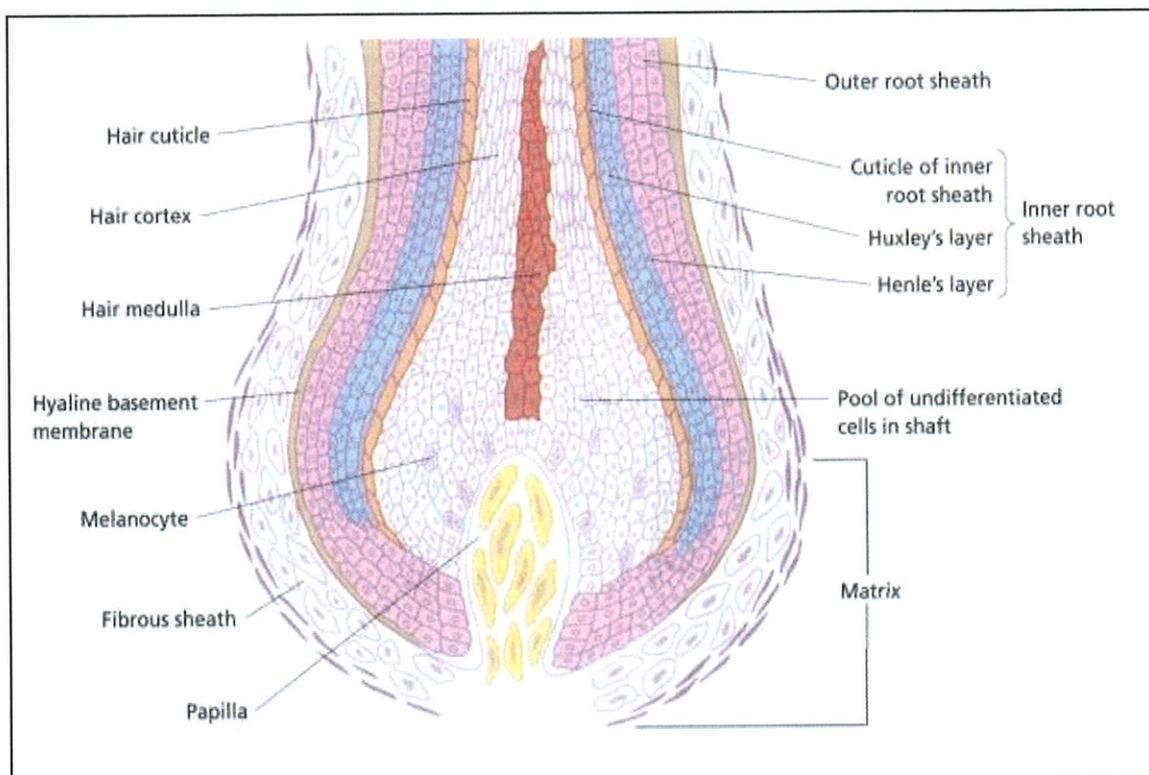


Figure 3 : Représentation schématique de la structure du bulbe pileux.

Le cheveu possède donc une composition chimique complexe : une majorité de protéines (environ 90 % de kératine), de l'eau (10 à 20 %), des lipides (5 à 10 %) et des minéraux (< 1 %). Un cycle pilaire et une vitesse de croissance pilaire caractérisent le cheveu qui se développe, puis chute de façon individuelle et cyclique (Figure 4). On distingue ainsi trois phases [22] :

- une phase anagène ou phase de croissance active au niveau du cuir chevelu, de durée de 4 à 8 ans. Les cellules se différencient et la kératinisation commence.
- une phase catagène ou de transition, courte, dure environ deux semaines, caractérisée par l'arrêt de croissance.
- une phase télogène ou de repos qui dure environ 4 à 6 mois, et au cours de laquelle le cheveu mort reste en place et tombe lorsque, par exemple, il est délogé par la repousse d'un nouveau cheveu.

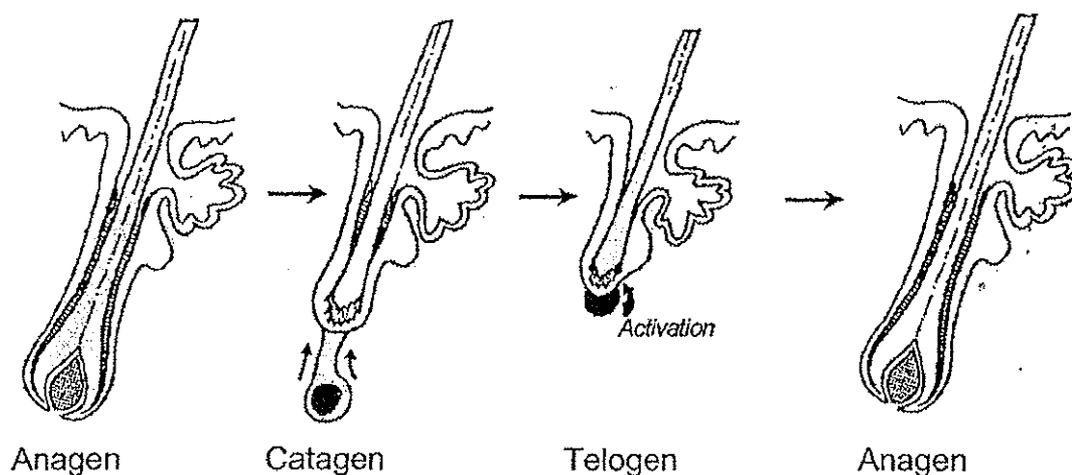


Figure 4 : Les différentes étapes du cycle pileaire.

Au total, chez les sujets ayant des cheveux sains, environ 90 % des cheveux sont en phase anagène, 1 % en phase catagène et 8 à 10 % en phase télogène. La très grande majorité des cheveux sont en phase anagène et par conséquent incorporent des xénobiotiques. En général, la vitesse de pousse des cheveux est de 0,6 à 1,4 cm par mois. Par conséquent, la longueur individuelle du cheveu dépend de la durée de chaque étape et de la vitesse de la pousse. Il existe cependant des différences inter-individuelles

significatives dans la proportion de cheveux en phase anagène, de cheveux en phase télogène et la vitesse de pousse selon la race, le sexe, l'âge et l'état de santé.

III.2. Incorporation des xénobiotiques dans les cheveux

Les différents mécanismes d'incorporation des drogues dans les cheveux sont mal décrits et des études supplémentaires restent nécessaires pour préciser le rôle et l'importance relative de chaque mécanisme.

Il semble acquis qu'il existe une diffusion passive des xénobiotiques dans les cheveux à travers les capillaires sanguins vers les cellules en croissance. Cette incorporation s'effectue sur une longueur de 1,2 à 1,5 mm au niveau des cellules matricielles. Cependant, les données expérimentales indiquent une variété de mécanismes d'incorporation liée à la variété d'endroits, de périodes et de sources (Figure 5). Cette incorporation peut être active ou passive [24] :

- L'incorporation active s'effectue, chez la personne qui a consommé le xénobiotique, par le sang et par les sécrétions (sébum, sueur). Présent dans le sang, le xénobiotique passe par diffusion vers les cellules en croissance au niveau du bulbe pileux. Grâce à l'étroite connexion entre la tige pileuse et les glandes sudorales et sébacées, la sueur et le *sebum* sont également des véhicules d'incorporation des xénobiotiques dans les cheveux. Les glandes sudoripares, proches mais séparées du cheveu, imprègnent la tige capillaire et peuvent participer à l'incorporation des drogues hydrophiles.

- L'incorporation passive d'un xénobiotique dans les cheveux est observée chez un individu n'en ayant pas ingéré. Il peut s'agir de substances déposées à la surface des cheveux à partir de l'environnement externe (pollution par des substances volatiles par exemple).

La nature de la substance incorporée (lipophilie, balance acido-basique), la pigmentation des cheveux ainsi que des facteurs inter-individuels (ethnie, facteurs métaboliques...) sont

susceptibles de moduler fortement son incorporation dans les cheveux. Il est généralement admis que 5 facteurs influencent principalement l'incorporation de xénobiotiques dans les cheveux : le contenu capillaire en mélanine, la lipophilie et la basicité de la substance elle-même, l'origine ethnique et la structure de la kératine [23-24].

Les mélanocytes et la pigmentation jouent un rôle important dans l'incorporation de xénobiotiques dans les cheveux. L'intensité de pénétration est largement fonction des origines ethniques. Malgré l'exposition de la racine capillaire à la même concentration de xénobiotiques dans le sang, la concentration des substances basiques dans les cheveux pigmentés est dix fois supérieure par rapport aux cheveux non-pigmentés : ainsi, il apparaît que les cheveux de patients asiatiques concentrent plus les drogues que les cheveux des caucasiens. Ces résultats ont été confirmés dans des études contrôlées qui comparaient différents cheveux : noirs, bruns, blonds et roux aussi dans les deux populations caucasienne et non-caucasienne [25]. Par contre, aucune différence d'incorporation dans les cheveux pigmentés et non-pigmentés pour des composés neutres, telle que la carbamazépine, n'a été mise en évidence.

La kératine, de par sa structure riche en groupements thiols qui permet la fixation de nombreux composés, influence fortement le passage de xénobiotiques dans les cheveux. Cette fixation constitue un facteur de stabilité des structures chimiques des drogues incorporées. Elle facilite ainsi la conservation et permettrait d'expliquer le fait que l'on retrouve généralement dans les cheveux davantage de drogues sous leur forme « molécule-mère » que sous leur forme métabolite.

L'incorporation des xénobiotiques dans les cheveux à partir du sang dépend des propriétés pharmacologiques et/ou physico-chimiques des substances concernées. Les molécules organiques lipophiles (non chargées) peuvent facilement pénétrer les membranes et diffuser selon le gradient de concentration dans les cellules matricielles. Cependant, pour les molécules hydrophiles ou les ions organiques de masse moléculaire moyenne, les membranes forment généralement une barrière peu perméable. Les xénobiotiques acides ou basiques ionisés au pH physiologique peuvent atteindre les cellules matricielles après protonation ou déprotonation, respectivement, pour atteindre un état neutre. Le pKa d'un composé et le pH des cellules matricielles sont tous les deux

importants. Le pH intracellulaire des kératinocytes est plus acide que le plasma et le pH des mélanocytes est compris entre 3 et 5. De plus, une affinité significative de la mélanine pour les xénobiotiques basiques a été démontrée *in vitro* [24]. Ces deux facteurs, pH faible et affinité pour la mélanine, conduisent à l'accumulation de substances lipophiles et basiques dans les cellules matricielles avec une préférence nette pour les cheveux pigmentés. Ainsi, en ce qui concerne les molécules acides, tels les métabolites d'acide salicylique, d'acide valproïque ou du Δ^9 -tétrahydrocannabinol (acide 11-nor- Δ^9 -tétrahydrocannabinol-9-carboxylique), l'équilibre de distribution n'est pas en faveur d'une accumulation dans les cellules matricielles acides.

Le délai d'apparition des xénobiotiques dans la partie aérienne des cheveux semble variable, mais demeure mal connue : peut-être un jour pour certaines amphétamines, cinq pour la codéine, la pholcodine ou la morphine [26].

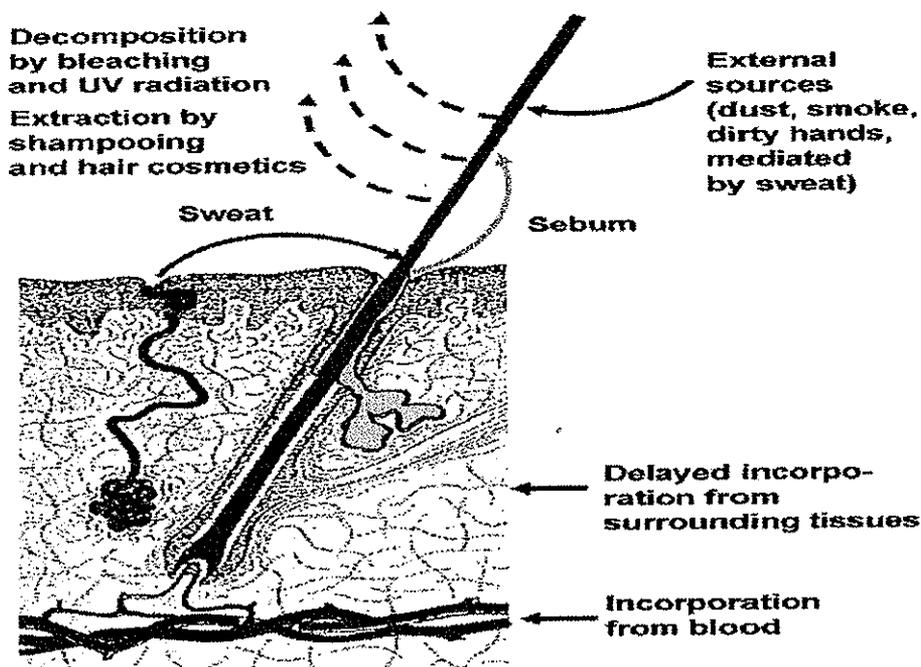


Figure 5 : Représentation schématique des principaux mécanismes d'incorporation, de dégradation des substances dans les cheveux et de pollution des échantillons capillaires.

La stabilité des xénobiotiques dans les cheveux est généralement considérée comme bonne. Ceci a été observé dans les segments de cheveux de personnes recevant une dose régulière d'un xénobiotique. Il convient cependant de toujours considérer, en cas d'analyses capillaires, une possible dégradation de la substance recherchée par la lumière ou les variations de température. Cette stabilité dépend de la structure chimique et augmente avec la polarité des substances. Ainsi, les métabolites déméthylés des antidépresseurs sont éliminés plus lentement que les molécules mères. C'est la raison pour laquelle, généralement, le ratio de concentration métabolite/substance mère augmente de la partie proximale à la partie distale. Ainsi, il est consensuel d'admettre que dans des cheveux lavés régulièrement, non traités par des agents cosmétiques agressifs tels que les colorants oxydants ou les permanents, les xénobiotiques peuvent être détectés plus d'un an après la prise.

III.3. Analyse toxicologique des cheveux

L'analyse de drogues dans les cheveux est devenue une analyse de routine dans plusieurs laboratoires de toxicologie français et étrangers. Les intérêts des cheveux dans la recherche et le dosage de drogues sont nombreux. Les cheveux se distinguent des autres matrices biologiques utilisées classiquement dans les analyses toxicologiques, tels que le sang ou les urines, par sa capacité unique à stocker à long-terme les xénobiotiques (alors que leur présence dans le sang et les urines est souvent temporaire). Cette longue fenêtre de détection (mois, voire années) permet la recherche rétrospective de la consommation de drogues ou de médicaments [27]. De plus, grâce à leur structure solide et durable, l'analyse des cheveux peut être réalisée des années (parfois même des siècles) après la réalisation des prélèvements [28].

Depuis les 20 dernières années, les cheveux gagnent donc en reconnaissance en matière d'investigations rétrospectives lors de consommations chroniques de substance(s) ou lors d'intoxications. Les cheveux constituent ainsi une matrice potentiellement intéressante en clinique et en toxicologie médico-légale, particulièrement dans les contextes de soumission chimique.

Selon les techniques analytiques utilisées, 5 à 100 mg de cheveux sont généralement nécessaires par analyse. Le prélèvement d'une quantité deux à trois fois plus importante est donc recommandé. Ces cheveux doivent être coupés en deçà du vertex crânien (Figure 6) pour diverses raisons. En effet, la phase anagène y est la plus élevée (96 %) et la vitesse de croissance y est relativement homogène. De plus, c'est une zone relativement protégée des contaminations extérieures et, sur le plan esthétique, le prélèvement n'est pas la source de « dégâts » trop importants. La coupe est réalisée à l'aide d'une paire de ciseaux. Il est indispensable de noter l'orientation de pousse (racine → pointe) lorsqu'une segmentation est prévue. Généralement, un fil est noué à la base de la mèche, et la section est réalisée entre cette ligature et le cuir chevelu, au plus près de ce dernier. Les cheveux sont ensuite conditionnés à température ambiante dans une enveloppe ou du papier d'aluminium (Figure 6). Après les étapes de décontamination, l'hydrolyse et l'extraction s'effectuent sur des cheveux pulvérisés ou coupés finement.

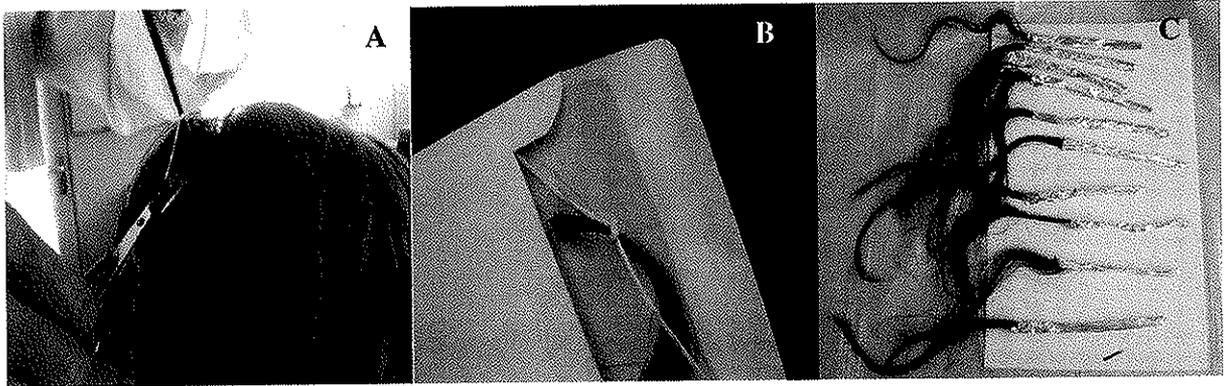


Figure 6 : Photographies représentant les étapes de prélèvement au niveau du vertex postérieur (A) et de conditionnement des échantillons capillaires pour analyse (B et C).

IV. Les marqueurs biologiques de l'éthylisme

IV.1. Généralités

Même s'il est difficile de diagnostiquer une alcoolodépendance en toute certitude, plusieurs marqueurs biologiques peuvent être utilisés pour apprécier les habitudes de consommation de boissons alcoolisées. On distingue ainsi des marqueurs indirects et des marqueurs directs (Figure 7) de la consommation d'éthanol :

- Les marqueurs indirects sont issus de modifications métaboliques et/ou biochimiques liées à la consommation régulière et excessive d'éthanol (souvent en relation avec une souffrance hépatocytaire) : volume globulaire moyen (VGM), activité plasmatique de la gamma glutamyl transférase (GGT) et teneur en transferrine déficiente en carbohydrate (CDT) dans le plasma.
- Les marqueurs directs sont principalement constitués de l'éthanol lui-même et de métabolites mineurs de l'éthanol, tel que l'EtG que l'on peut rechercher dans le sérum, les urines et les cheveux.

La spécificité et la sensibilité de certains de ces marqueurs restent cependant discutées. La détection de marqueurs directs, sensibles et spécifiques tels que l'EtG combinée à d'autres marqueurs, permettrait d'améliorer la fiabilité du diagnostic de consommation excessive et chronique d'alcool.

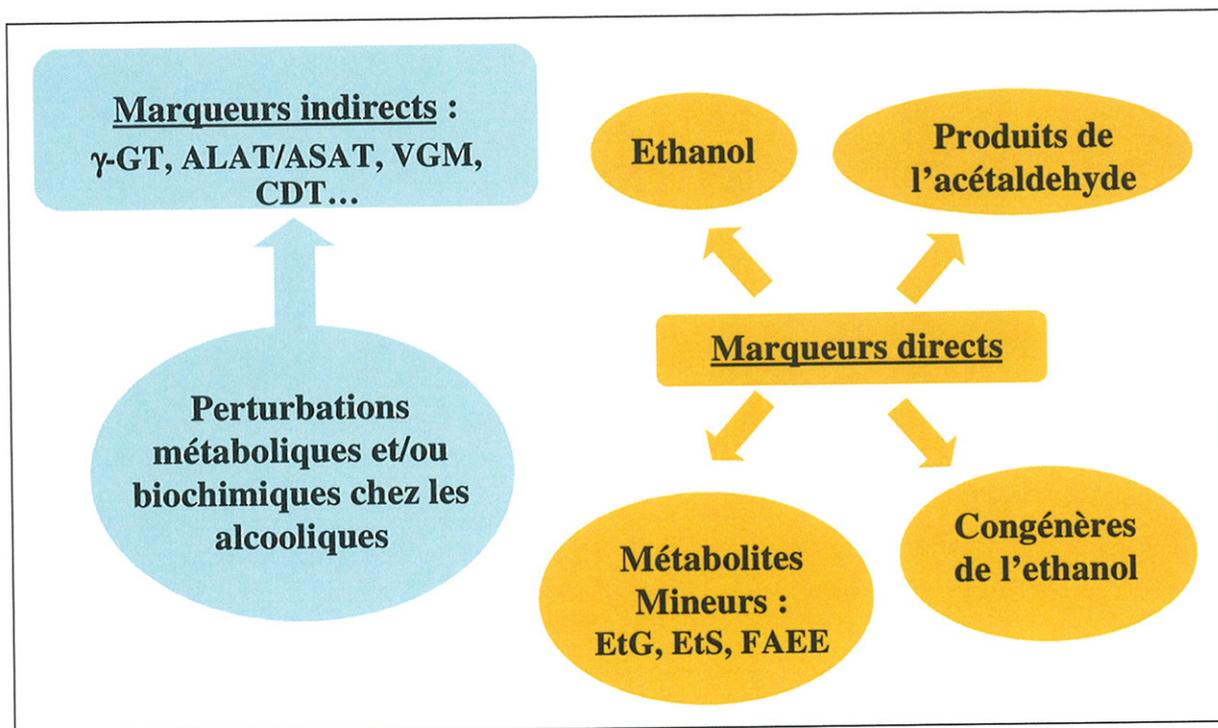


Figure 7 : Représentation schématique des marqueurs biologiques directs et indirects de la consommation d'éthanol.

IV.2. Métabolisme de l'éthanol

Après ingestion, l'absorption de l'éthanol est rapide et essentiellement localisée au niveau de l'estomac, du duodénum et du grêle proximal [29-31]. Cette absorption est susceptible d'être ralentie par le bol alimentaire. 90 à 95 % de l'alcool éthylique absorbé est métabolisé par réactions d'oxydation, principalement au niveau hépatique, via l'alcool- et l'aldéhyde-déshydrogénase (ADH et ALDH respectivement), la catalase et le système microsomal d'oxydation de l'éthanol (Figure 8). L'ADH est une enzyme cytosolique qui catalyse la formation de l'acétaldéhyde ou aldéhyde acétique. L'ALDH est une enzyme à la fois cytosolique et mitochondriale. La forme mitochondriale présente une affinité importante pour l'acétaldéhyde et est responsable de 95 % de sa transformation en

acétate. Il a été décrit différentes isoformes de cette enzyme et un déficit de son activité entraîne une accumulation d'acétaldéhyde lors d'une prise d'éthanol, avec apparition de flushes, migraines et nausées. Cette enzyme est la cible de certains traitements employés dans le sevrage alcoolique. Une proportion mineure de l'éthanol ingéré est également excrétée, sous forme inchangée, par voie rénale, pulmonaire et cutanée [2].

Les autres voies métaboliques de l'éthanol sont accessoires et représentent généralement moins de 10 % du métabolisme total de l'éthanol. Elles aboutissent cependant à la formation de bio-marqueurs « directs » potentiellement intéressants dans le dépistage de l'éthylisme. La biotransformation de l'éthanol en EtG par conjugaison avec l'acide glucuronique activé ne représente que 0,02 à 1,5 % de son élimination totale [3]. Cette réaction de conjugaison est catalysée par une UDP-Glucuronyl Transférase (UGT), enzyme pour laquelle un polymorphisme génétique à l'origine de variations fonctionnelles a été décrit [33]. La sulfoconjugaison de l'éthanol, via une sulfotransférase, est à l'origine d'un autre métabolite « de phase II » de l'éthanol : l'éthyl-sulfate (EtS). Pour certains auteurs, le dosage sanguin, urinaire ou capillaire de l'EtS présenterait un intérêt, au même titre que l'EtG, dans le diagnostic de l'éthylisme [32]. Enfin, l'action des enzymes FAEE-synthase et acylCoA-Ethanol-O-Acyltransférase est à l'origine d'une autre voie mineure du métabolisme de l'éthanol qui aboutit à la formation d'éthyl-ester d'acides gras (ou FAEE, du terme anglosaxon Fatty Acids Ethyl Esters). Les FAEE sont également considérés par certains auteurs comme intéressants dans le suivi et le diagnostic de l'éthylisme [80-84].

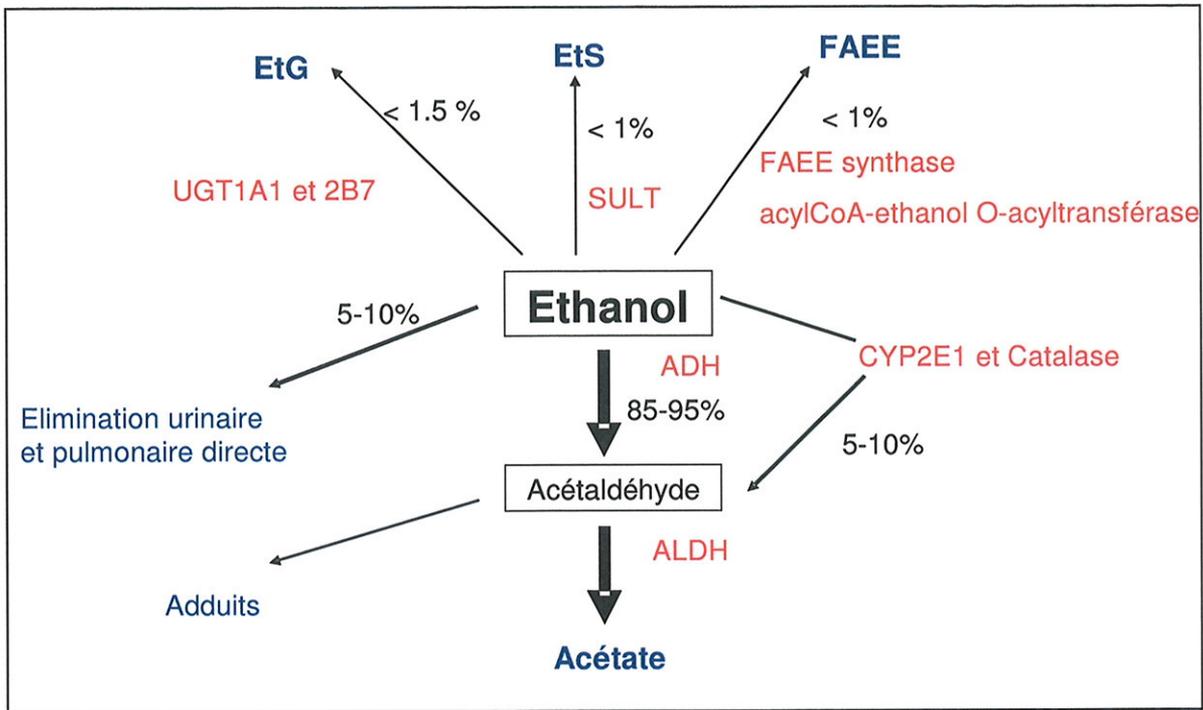


Figure 8 : Représentation schématique des voies métaboliques hépatiques de l'éthanol.

IV.3. Marqueurs indirects de l'éthylisme

IV.3.1. Gamma Glutamyl Transferase (GGT)

L'activité de gamma glutamyl transférase (GGT) plasmatique correspond à la mesure dans le sang de l'activité d'une enzyme membranaire et hépatique dont le rôle principal est la transformation du glutathion en glutamate par une réaction appelée hydrolyse. Les valeurs de cette activité enzymatique plasmatique considérées comme normales dépendent de la technique d'analyse. Selon la technique utilisée, les valeurs usuelles sont comprises entre 5 et 36 UI/L. Cette activité enzymatique est généralement augmentée en cas d'alcoolisme, en raison de l'altération des cellules hépatiques. Des concentrations élevées de GGT dans le sérum sont fréquemment utilisées pour le diagnostic biologique d'un abus chronique d'alcool. La sensibilité de ce marqueur dans la détection de l'alcoolisme chronique varie de 34 à 85 % selon les études considérées et les quantités consommées [34-35]. Des concentrations élevées de GGT sériques apparaissent pour une consommation alcoolique supérieure ou égale à 80 grammes par jour pendant une durée supérieure à une semaine. La demi-vie de ce marqueur dans le sérum est de 2 à 3 semaines. Toutefois, l'utilisation de ce marqueur biologique dans le diagnostic de l'éthylisme est limitée [36] par des risques de :

- « faux positifs » : élévation de l'activité de la GGT en dehors de toute consommation d'alcool. En effet, une augmentation de l'activité de la GGT sérique peut également être observée chez des patients présentant des pathologies non-alcooliques telles que : le diabète, l'obésité, les pancréatites et cholestases, les dyslipidémies, certaines pathologies cardio-vasculaires et traumatismes sévères. Par ailleurs, de nombreux médicaments sont connus pour provoquer une élévation de ce marqueur : certains antiépileptiques, barbituriques, anticoagulants oraux, antibiotiques etc..
- « faux négatifs » : une consommation importante et régulière d'éthanol peut exister sans qu'il y ait obligatoirement de retentissement hépatique, et peut donc exister sans qu'il y ait une élévation de l'activité de la GGT.

La spécificité des GGT dans la mise en évidence d'un alcoolisme chronique est donc faible. En dépit de ce manque de spécificité, les études indiquent que 50 à 72 % des élévations de GGT sériques peuvent être expliquées par une consommation excessive d'éthanol [37-38]. Ainsi, dans au moins la moitié des cas, une élévation des GGT correspond effectivement à une atteinte du foie par consommation excessive d'alcool. Ce marqueur est également utilisé pour le contrôle de l'abstinence puisque cette activité des GGT va se normaliser (en quelques jours à plusieurs semaines) après l'arrêt de la consommation de boissons alcoolisées. Enfin il faut noter que l'association GGT et VGM constitue habituellement la base de la détection d'une consommation excessive d'éthanol : lorsque ces deux marqueurs sont perturbés simultanément, le risque que la personne concernée soit un alcoolique chronique est généralement supérieur à 90 %.

Ainsi, le dosage des GGT sériques reste actuellement très utilisé dans ce contexte, chez le vivant, du fait d'un faible niveau de technicité analytique associé à une rapidité d'analyse et un coût limité. Cependant, il ne présente que très peu d'intérêt en toxicologie médico-légale du fait des phénomènes de dégradation, de dilution ou de redistribution intervenant en situation *post mortem*.

IV.3.2. Volume Globulaire Moyen (VGM)

Le Volume Globulaire Moyen (VGM ou MCV) est un indicateur de la taille des érythrocytes et représente le volume moyen d'un globule rouge (hématie) qui s'exprime en femtolitres (fL, soit 10^{-15} litre). Il est mesuré par le rapport hématoците/nombre d'érythrocytes par litre de sang.

L'augmentation de ce volume (> 100 fL) s'appelle une macrocytose. Une macrocytose est observée chez 34 à 89 % des alcooliques [39-41]. L'origine de la macrocytose, observée chez les patients éthyliques chroniques, est mal connue et probablement liée à une carence nutritionnelle qui va altérer la perméabilité de la membrane du globule rouge. Cependant, une macrocytose peut être la conséquence d'une carence en vitamine B12 ou en acide

folique, d'une pathologie hépatique non-alcoolique, de certaines pathologies hématologiques, d'une hypothyroïdie. Une augmentation du VGM est également observable chez les fumeurs et les patients traités par certains antiépileptiques [42]. En pratique clinique, certaines études ont montré qu'une macrocytose était expliquée par un abus chronique d'alcool chez 89 % des hommes et 56 % des femmes alcooliques [41]. En cas d'abstinence, le VGM présente une normalisation lente (demi-vie supérieure à 2 mois) et des études indiquent qu'environ 40 % des patients alcooliques présentent encore une macrocytose après 3 mois de sevrage [43]. Par conséquent, il s'agit d'un indicateur peu spécifique, qui présente un risque important de « faux positifs ». Il est malgré tout utilisé régulièrement comme élément de surveillance de l'abstinence car il se normalise plusieurs mois après l'arrêt de la consommation de boissons alcoolisées et le coût de sa mesure est faible. Le VGM est donc un marqueur de l'alcoolisme chronique très peu spécifique, d'interprétation délicate et généralement utilisé de façon combinée à un ou plusieurs autres marqueurs. La mesure du VGM ne présente pas d'intérêt dans les contextes de toxicologie médico-légale *post mortem* du fait des phénomènes d'hémolyse, de dilution et redistribution intervenant après le décès.

IV.3.3. Alanine et Aspartate Amino Transferases (ASAT et ALAT)

Une élévation des concentrations sériques des enzymes hépatiques aspartate aminotransférase (ASAT) et alanine aminotransférase (ALAT) est fréquemment retrouvée chez les patients alcooliques [44-45]. ALAT et ASAT sont également élevées chez les alcooliques sevrés présentant une atteinte hépatocellulaire chronique résiduelle. Une telle élévation est donc plus indicatrice de l'atteinte hépatique que d'un abus chronique d'alcool. Cependant, un ratio ASAT / ALAT > 2 suggère une étiologie alcoolique et la plupart des patients présentant une hépatopathie non-alcoolique ont un ratio < 1 [44-46]. Les transaminases sont des enzymes présentes au niveau hépatique, musculaire et cardiaque. Une augmentation sélective de ASAT est généralement révélatrice d'une souffrance mitochondriale. La sensibilité de ASAT comme marqueur de l'alcoolisme a été estimée à 35 % et celle de ALAT est jugée encore plus faible [47]. Dans

ce contexte, les transaminases sériques ont donc une utilité fortement limitée dans le diagnostic de l'alcoolisme.

IV.3.4. Transferrine déficiente en carbohydrates (CDT)

La transferrine déficiente en carbohydrates (ou CDT, abréviation du terme anglais Carbohydrate Deficient Transferrin) est un marqueur biologique de l'alcoolisme relativement récent et d'utilisation grandissante du fait de sa bonne spécificité [44, 48-50].

La transferrine ou sidérophilline est une glycoprotéine dont la synthèse et la sécrétion ont lieu essentiellement dans le foie. Cette protéine assure le transport du fer dans l'organisme et sa demi-vie dans le sérum varie de 7 à 10 jours. Il existe dans le sang, cinq isoformes de transferrine plus ou moins sialylées (Figure 9) [52]. Si la transferrine sérique est majoritairement présente sous sa forme tétrasialylée, il existe aussi des formes asialylée, monosialylée et disialylée, regroupées sous le nom de « transferrine déficiente en carbohydrate » (CDT). Les valeurs normales de CDT dans le sérum sont habituellement inférieures à 20 UI/L chez l'homme et inférieures à 26 UI/L chez la femme, et le rapport CDT/transferrine est normalement inférieur à 3 % : soit 2 à 4 g/L de transferrine totale avec 1 à 3 % de formes A-, mono- et disialotransferrine, selon les techniques considérées.

Une consommation excessive et chronique d'alcool perturbe l'incorporation de résidus d'acide sialique au niveau de cette glycoprotéine, par inhibition des sialyl-transférases dans l'appareil de Golgi et par activation de sialidases membranaires des hépatocytes, conduisant chez l'éthylique à une augmentation de la CDT alors que la concentration de transferrine totale ne varie pas (Figure 10). Puis, en cas d'abstinence pendant au moins une quinzaine de jours, on note en général, une diminution de la CDT [50].

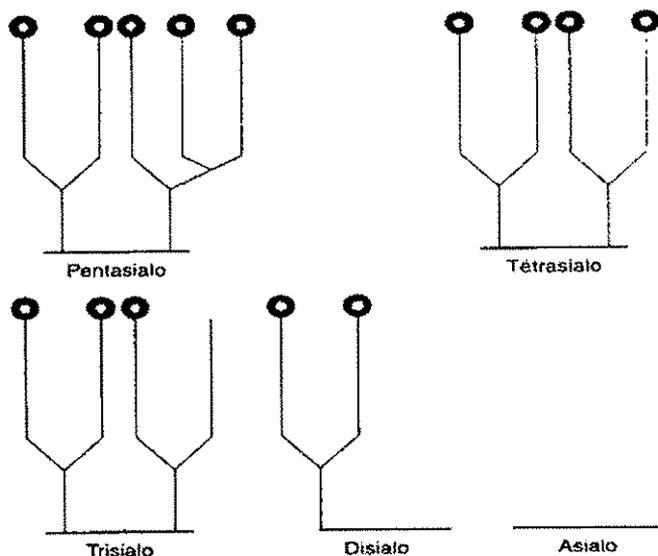


Figure 9 : Représentation schématique de la structure des différentes isoformes de transferrine présentes dans le sérum. Les points représentent les acides sialiques terminaux, d'après Landberg *et al.* [52].

L'alcool et ses métabolites sont ainsi à l'origine de la formation de transferrines « désialylées », notamment di-, mono- et asialo-transferrine. Il est admis que ce test se positive généralement après une période de 10 jours pour une consommation quotidienne d'au moins 50 g d'éthanol (soit 5 à 6 verres de vin) avec une normalisation après 2 semaines d'abstinence. Des études ont démontré que la CDT présente une spécificité importante dans le dépistage de l'éthylisme chronique, pouvant atteindre 90 % selon les quantités d'éthanol consommées, et une sensibilité correcte [53]. Autrement dit, peu de cas de « faux-positifs » ont été rapportés chez les patients atteints de cirrhose non-alcoolique, d'hépatite C chronique, d'hépatome ainsi que chez les patients présentant un polymorphisme génétique de type D ou une pathologie métabolique congénitale pour la transferrine. Par ailleurs, il a été observé que les femmes présentent des taux de CDT supérieurs à ceux des hommes, dans des conditions physiologiques [54]. Par contre, ce marqueur biologique présente un risque de « faux négatifs » : même si la sensibilité de la CDT semble meilleure que celle du VGM ou de l'activité des GGT, une consommation

dépistage de l'éthylisme chronique. Cependant, la CDT présente actuellement quelques limites : manque de consensus pour définir la technique analytique de référence et les valeurs seuils, niveau de technicité analytique important et relativement coûteux. De plus, l'interprétation des résultats obtenus dans le sérum ou l'humeur vitrée en situation *post mortem* est délicate et manque encore de recul ce qui limite ainsi son utilisation en toxicologie médico-légale.

Les principales caractéristiques des marqueurs indirects de l'éthylisme sont récapitulées dans le Tableau I.

Tableau I : Principales caractéristiques des marqueurs biologiques indirects de la consommation importante d'alcool, d'après Allen et Litten [51].

	Avantages	Inconvénients	Cut off	Coût
CDT <i>Carbohydrate deficient transferrin</i>	Sensibilité de modérée à haute* Marqueur de rechute Excellente spécificité Demi-vie de 15 jours	Faible sensibilité chez la femme et l'adolescent Test coûteux Méthodologie sophistiquée	Variable selon la méthode : 6 % CDT en RIA**	Élevé
GGT Gamma-glutamyltransférase	Sensibilité de modérée à haute* Mise en œuvre facile Bonne acceptabilité	Nombreux faux positifs Mauvais indicateur de rechute	50 UI/L	Faible
ASAT Aspartate aminotransférase	Demi-vie de 2 à 3 semaines Dosage facile Bonne acceptabilité	Faible sensibilité Nombreux faux positifs	45 UI/L	Faible
ALAT Alanine aminotransférase	Demi-vie de 2 à 3 semaines Dosage facile Bonne acceptabilité	Faible sensibilité Nombreux faux positifs	50 UI/L	Faible
VGM Volume globulaire moyen	Faible coût Bonne acceptabilité	Faible sensibilité Beaucoup de faux positifs Longue demi-vie (plusieurs mois)	98 %	Faible

* dans la capacité à distinguer les alcooliques des abstinents et des buveurs sociaux modérés ; ** *radio-immunoassay*

IV.4. Marqueurs directs de l'éthylisme

IV.4.1. L'éthanol

La mesure de l'éthanol peut être réalisée dans le sang, l'air expiré, les urines, l'humeur vitrée ou le liquide gastrique ; cette mesure rapportée à l'état clinique du patient peut permettre d'identifier une tolérance accrue à l'alcool sans pour autant rendre compte de la sévérité d'une intoxication chronique. Du fait de sa demi-vie relativement courte dans l'organisme, son utilisation est limitée en pratique au diagnostic de l'alcoolisation aiguë et non de l'abus chronique d'alcool. La présence d'une concentration significative d'éthanol dans le sang signe une consommation de boissons alcoolisées par la personne concernée, au cours des quelques heures qui ont précédé la réalisation du prélèvement. Nous rappelons qu'au cours du délai qui sépare l'ingestion du moment du prélèvement sanguin, l'éthanolémie varie. La concentration sanguine d'éthanol maximale est obtenue 30 minutes à une heure après l'ingestion d'éthanol puis l'élimination à partir du sang s'effectue en moyenne à raison de 0,10 à 0,15 g/L/heure chez un buveur occasionnel et 0,20 à 0,40 g/L/heure chez un buveur chronique. L'éthanol lui-même constitue donc, bien évidemment, un marqueur direct d'une consommation récente de boissons alcoolisées. Toutefois, il ne permet pas de se prononcer sur l'éventualité, ou non, de consommations importantes et régulières d'éthanol au cours des jours ou des semaines précédant le prélèvement sanguin. Par conséquent, la recherche et le dosage de l'éthanol dans le sang ne présente qu'un intérêt limité pour le diagnostic d'éthylisme chronique.

L'éthanol est donc un marqueur intéressant et largement utilisé pour la mise en évidence de la consommation aiguë d'alcool, tant chez le vivant qu'en situation *post mortem*, mais soumis dans certains cas à des difficultés d'interprétation (particulièrement en toxicologie médico-légale : phénomènes de redistribution/dilution et de fermentation bactérienne à considérer en fonction de l'état de décomposition d'un corps et du délai séparant le décès du prélèvement). La recherche et/ou dosage de l'éthanol est réalisée en routine par des techniques immunochimiques ou encore par chromatographie gazeuse couplée à la

détection par ionisation de flamme (GC-FID), techniques analytiques rapides, relativement simples et peu coûteuses.

IV.4.2. L'Ethyl-Glucuronide (EtG)

L' Ethyl-Glucuronide (ethyl- β -D-6-glucuronide, EtG, Figure 11) est un métabolite hydrosoluble, non volatile et direct de l'éthanol. Il est formé par réaction de conjugaison de l'éthanol à l'acide glucuronique activé, catalysée par les UDP-Glucuronosyl-Transferases du réticulum endoplasmique (UGT) 1A1 et 2B7. Ne représentant que moins de 1 % de la quantité totale d'éthanol éliminé par l'organisme, il s'agit d'un métabolite mineur mais est hautement spécifique de la consommation alcoolique [3].

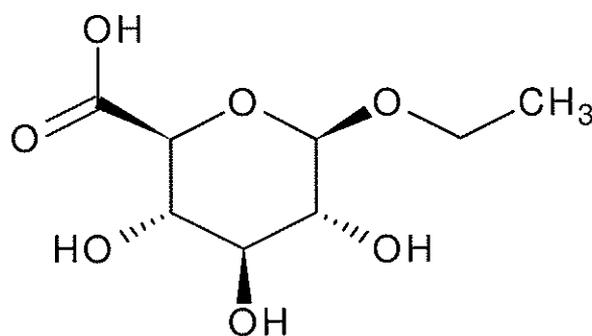


Figure 11 : Structure chimique de l'Ethyl-Glucuronide, masse moléculaire 222 g.mol^{-1} .

Depuis quelques années, différentes techniques analytiques ont été développées et publiées pour le dosage de l'EtG dans le sérum, les urines et les cheveux (Tableau II). Les techniques de chromatographie en phase liquide ou gazeuse couplées à la spectrométrie de masse sont de loin les plus sensibles [62,63,65,67-69]. Des techniques de dosage de l'EtG par électrophorèse capillaire et par tests immunochimiques ont également été développées

dans le sérum et les urines. La sensibilité des techniques chromatographiques peut cependant être améliorée, en particulier pour les analyses capillaires, par une phase de purification des extraits utilisant des colonnes d'extraction solide / liquide (ou SPE, du terme anglo-saxon Solid Phase Extraction) [66,70]. Les extraits obtenus peuvent être directement injectés dans le cas de la chromatographie en phase liquide ou, alternativement, nécessiter une « dérivation » afin d'augmenter la volatilité de l'analyte pour la chromatographie en phase gazeuse. Ces techniques ont ainsi permis d'atteindre des limites de détection (LDD) jusqu'à 2 pg/mg à partir d'une prise d'essai de 100 mg de cheveux [68] (Tableau II).

L'EtG est un marqueur de l'éthylisme présentant une fenêtre de détection particulièrement intéressante (Figure 12). Dans le sérum et suite à une alcoolisation aiguë, un pic d'EtG est observé 2 à 3,5 heures après celui de l'éthanol et il peut être détecté jusqu'à 8 heures après élimination complète de l'éthanol par l'organisme [56-57]. La recherche et/ou le dosage de l'EtG dans le sérum permet donc d'établir le diagnostic d'une consommation aiguë et récente d'éthanol même après élimination complète de celui-ci. Dans les urines, un pic d'EtG pouvant atteindre 250 mg/L est observé en moyenne 5,5 heures après une prise aiguë d'éthanol et ce marqueur est détectable jusqu'à 80 heures après élimination complète de l'éthanol par l'organisme [58-59]. Il est ainsi admis qu'une concentration d'EtG dans les urines supérieure ou égale à 1 mg/L indique une consommation significative de boissons alcoolisées au cours des 3 à 4 derniers jours. La recherche de l'EtG dans les urines présente donc un intérêt chez le vivant dans le cadre d'un contrôle de l'abstinence (peut-être au cours des 3 à 4 derniers jours, mais plus certainement au cours de 35 dernières heures) lors d'une étape de sevrage, mais également en cas de suspicion de soumission chimique (lorsque les prélèvements sont effectués tardivement), ou encore de délit de fuite (infractions au code de la route par exemple). Par ailleurs, une étude *in vitro* réalisée par Baranowski et collaborateurs a récemment montré qu'une dégradation de l'EtG urinaire par les glucuronidases de la flore bactérienne (en particulier, en période *post mortem*) pouvait conduire à des « faux négatifs », diminuant ainsi la sensibilité de ce test et limitant son utilisation en situation *post mortem* [60]. Une étude récente a montré que la sueur pouvait représenter une matrice alternative au sérum et à l'urine pour la recherche de l'EtG dans le cadre d'un contrôle de l'abstinence chez des sujets suivis pour sevrage [61]. Des études complémentaires demeurent nécessaires pour compléter ces résultats.

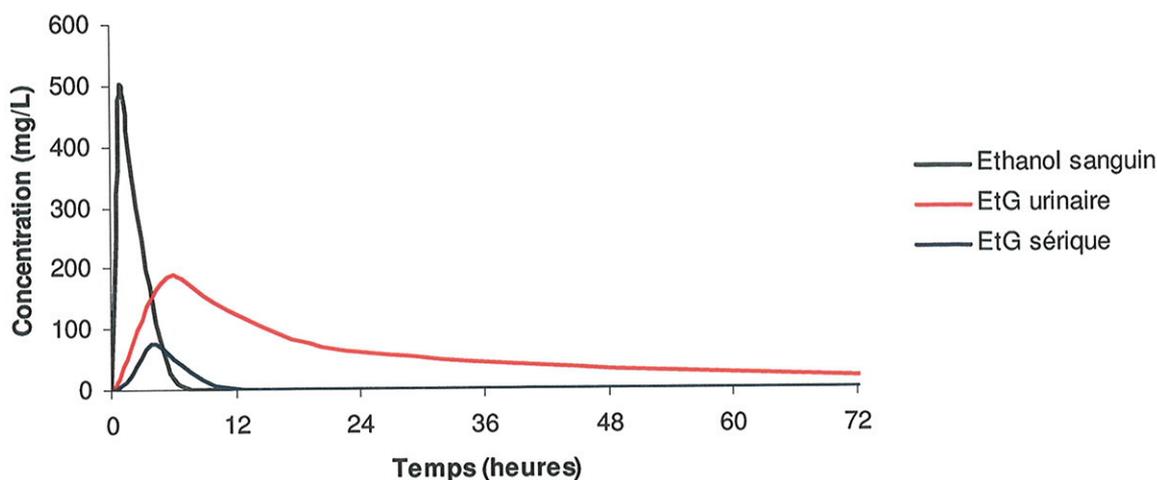


Figure 12 : Représentation graphique comparant les fenêtres de détection de l'éthanol sanguin et de l'EtG sérique et urinaire lors d'une alcoolisation aiguë.

Lorsque la consommation d'éthanol dépasse 60 grammes par jours pendant plusieurs semaines, l'EtG s'accumule dans les cheveux, matrice biologique où il permet ainsi de poser le diagnostic d'éthylisme chronique. Différentes études ont ainsi montré que les concentrations d'EtG dans les cheveux d'alcooliques connus variaient de 30 à 13 000 pg/mg de cheveux [62-69]. Toutes ces études indiquent par ailleurs que les cheveux de patients abstinentes et buveurs modérés étaient négatifs en EtG ou inférieurs à 30 pg/mg de cheveux, confirmant ainsi l'excellente spécificité de ce marqueur avec un risque de « faux positifs » nul dès lors que les concentrations seuils étaient suffisantes. Des valeurs seuils ou « cut-off » variant de 25 à 50 pg/mg de cheveux ont ainsi été proposées par certains auteurs pour différencier les patients alcooliques chroniques des buveurs modérés et/ou abstinentes [70-74]. Toutefois, l'analyse de l'EtG dans les cheveux manque encore de recul et aucun consensus n'est actuellement établi à ce sujet. Des travaux récents et prometteurs ont montré l'intérêt de la recherche et/ou dosage de l'EtG dans les cheveux : en particulier, pour détecter une consommation excessive de boissons alcoolisées chez la femme enceinte [73,80] ou dans le cadre du suivi des patients en cours de sevrage [74].

Tableau II : Le dosage de l'Ethyl-Glucuronide dans les cheveux par techniques chromatographiques dans la littérature.

Références	Lamoureux 2008 [62]	Morimi 2005 [65]	Yegles 2004 [67]	Jurado 2004 [68]	Janda 2002 [63]	Skopp 2000 [69]
Technique	LC-ESI-MS/MS	LC-ESI-MS/MS	GC- NCI/MS	GC- NCI/MS	LC-ESI-MS/MS	GC-MS
Prise d'essai	30 mg	100 mg	30 mg	100 mg	100 mg	50 mg
Extraction	Lavage: DiCl ₂ /Eau Eau+US 2h + SPE (CleanScreen)	Lavage: DiCl ₂ /MeOH Eau +US 2h	Lavage: Eau/n-heptane Eau+US 2h + SPE (Isolute NH2)	Lavage: Eau/Acétone Eau+US 2h	Lavage: MeOH/Acétone Eau+US 2h + SPE (Isolute NH2)	Lavage: Ether/Acétone MeOH+US 3h
Colonne	Uptisphere-3SI	Chrompack Inertsil ODS3	HP-Ultra 2	DB-1	Synergy Polar RP	CP-Sil 5
Elution	Ac. Formique / ACN (5/95)	Ac. Formique 0,1% / ACN (99/1) Addition ACN post- colonne	Helium/Methane	Helium	Ac. Formique 0,1% / ACN (99/1)	NR
Système	Perkin Elmer/Api 2000	Agilent 1100/4000 Q- TRAP	HP 6890 et 5973	HP 6890 et 5973	Shimadzu /API 365	HP 5890 II et 5972
Transitions (m/z)	221→75 et 226→75 (quant.) 221→85 (conf.)	221→75 et 226→75 (quant.) 221→85 (conf.)	Dérivation : PFPA 496→347 (quant.)	Dérivation : PFPA 496→338 (quant.)	221→75 et 226→75 (quant.) 221→85 et 221→221 (conf.)	Dérivation : MSTFA m/z = 405 (quant.)
LDD	4 pg/mg	2 pg/mg	2 pg/mg	25 pg/mg	51 pg/mg	22 pg/mg
LDQ	10 pg/mg	3 pg/mg	4 pg/mg	50 pg/mg	102 pg/mg	50 pg/mg

LC : chromatographie liquide
US : ultrasons
MS : spectrométrie de masse

Ac. : acide
ACN : acétonitrile
DiCl₂ : dichlorométhane

MeOH : méthanol
PFPA : acide penta-fluoro-propionique
MSTFA : N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacétamide

quant. : quantification
conf. : confirmation
SPE : solid phase extraction

IV.4.3. Les Ethyl-Ester d'Acides Gras (FAEE)

Les esters éthyliques d'acides gras (FAEE, abréviation du terme anglais *Fatty Acids Ethyl Esters*) sont des métabolites mineurs de l'éthanol formés par conjugaison de l'éthanol aux acides gras libres, triglycérides, lipoprotéines ou phospholipides. Cette réaction est principalement catalysée par l'enzyme FAEE-synthase présente au niveau hépatique, mais également au niveau de la racine capillaire, du pancréas, du cœur, du tissu adipeux, du cerveau et des globules blancs [75]. Ces métabolites sont suspectés d'être responsables, en partie du moins, des atteintes organiques liées à l'alcool [76].

Dans le sang, les FAEE apparaissent rapidement après ingestion de boissons alcoolisées et leur dosage permet la détection d'une prise aiguë, immédiate ou récente d'éthanol jusqu'à environ 24 heures après élimination complète de l'éthanol par l'organisme [77]. Dans les cheveux, plus de 15 FAEE ont été identifiés et il apparaît que les concentrations de 4 d'entre eux sont intéressantes pour le diagnostic et/ou le suivi d'un alcoolisme chronique : éthyl-myristate, éthyl-palmitate, éthyl-oléate et éthyl-stéarate. Bien que ces 4 FAEE soient également retrouvés dans les cheveux d'enfants, d'abstinents et de buveurs modérés, il existe une bonne corrélation entre leur concentration dans les cheveux et les quantités d'éthanol ingérées ; ceci permet donc de penser que les FAEE sont des marqueurs fiables pour la détection d'une consommation abusive et chronique d'éthanol par analyse segmentaire des cheveux [78]. Certains auteurs ont d'ailleurs étudié les concentrations de ces 4 FAEE par analyse segmentaire de cheveux chez des patients en cure de sevrage alcoolique : les résultats ont montré une diminution des concentrations en FAEE, significative, de la partie distale à la partie proximale des mèches étudiées et ce, dès le premier mois de sevrage [67,79]. Une valeur « cut-off » de 400 pg/mg de cheveux pour la somme de ces 4 FAEE a été proposée pour distinguer une consommation excessive et chronique d'éthanol d'une consommation modérée avec une sensibilité de 100 % et une spécificité proche de 95 % [81]. Des travaux récents ont cependant démontré que l'utilisation quotidienne de certains traitements capillaires, en particulier shampooings, laques et surtout lotions capillaires alcoolisées, pouvait affecter les résultats observés et conduire à des « faux positifs » [82,83]. Ces données récentes ont considérablement remis

en cause la recherche de FAEE dans les prélèvements capillaires dans le but d'établir le diagnostic d'éthylisme chronique. Les FAEE sont généralement dosés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem, technique analytique lourde, coûteuse et donc difficilement applicable en routine.

IV.4.4. Autres marqueurs directs de l'éthylisme

IV.4.4.1. L'Éthyl-sulfate

L'éthyl-sulfate (EtS) est, au même titre que l'EtG, un métabolite mineur de l'éthanol. L'EtS est formé par transfert d'un groupement sulfate provenant de la 3'phosphoadenosine-5'phosphosulfate sur l'éthanol, réaction catalysée par les sulfotransférases hépatiques (SULT) 1A1 et 1A2 [84]. Comme les UGT, les SULT sont caractérisées par un polymorphisme génétique important susceptible de moduler leur activité [85]. Avec un rapport molaire moyen EtG/EtS urinaires de l'ordre de 2,3, l'EtS ne présente probablement pas d'intérêt supérieur à celui de l'EtG pour établir le diagnostic d'une consommation récente de boissons alcoolisées par analyse des urines ou du sérum [84]. L'EtS présente un profil d'excrétion urinaire relativement comparable à celui de l'EtG avec une apparition dans les urines environ 1 heure après ingestion de boissons alcoolisées, un pic 4 à 5 heures après celui de l'éthanol dans le sang et une fenêtre de détection de l'ordre de 30 heures [86]. La recherche de l'EtS dans les cheveux n'a pas fait l'objet d'études à l'heure actuelle et son dosage, dans le sérum [64] et les urines [86], manque encore de recul et reste limité à la confirmation d'une analyse positive en EtG après alcoolisation aiguë.

IV.4.4.2. Les congénères de l'éthanol

Une trentaine de substances retrouvées dans les boissons alcoolisées et regroupées sous le terme de « congénères de l'éthanol » ont été proposées pour établir le diagnostic d'éthylisme chronique en situation *post mortem*. Il s'agit de molécules de structures variées : alcools aliphatiques (méthanol), composés cétoniques (acétone, méthylcétone), aldéhydes et autres produits issus de la fermentation des levures [87]. Parmi ces molécules, le méthanol, le propanol-2, le propanol-1 et l'isobutanol ont été proposés comme marqueurs de l'éthylisme chronique en situation *post mortem*. L'intérêt de ces composés dans le dépistage de l'éthylisme chronique repose sur leur métabolisme hépatique qui est ralenti en présence d'éthanol du fait d'une compétition au niveau de l'alcool-deshydrogénase (ADH) : la demi-vie du méthanol augmente ainsi en présence d'éthanol de 20 à 46 heures. Il en résulte donc une accumulation sanguine et urinaire de ces congénères en cas de consommation excessive et chronique de boissons alcoolisées [88]. On observe ainsi une augmentation des concentrations sanguines des congénères de l'éthanol plus rapide que celle des marqueurs indirects décrits précédemment (GGT, VGM ou CDT). La composition et la concentration en congénères de l'éthanol sont bien entendu variables d'une boisson alcoolisée à une autre. On distingue ainsi des boissons riches en congénères (telles que whisky, rhum, vin, bière ou liqueurs) et des boissons à teneur faible en congénères (telles que gin et vodka). Par ailleurs, la spécificité des congénères de l'éthanol est faible puisque les concentrations sanguines ou urinaires de ces molécules peuvent être affectées par l'état métabolique (obésité, diabète, jeûne...) ou les habitudes alimentaires (alimentation fermentée riche en congénères) d'un sujet, et par la présence de bactéries (susceptibles de les produire ou de les dégrader) dans le milieu biologique considéré. La recherche de congénères de l'éthanol dans le sang et les urines nécessite l'application de techniques coûteuses (généralement, la chromatographie en phase gazeuse avec détection par spectrométrie de masse) et l'interprétation des résultats obtenus est délicate. Cette analyse reste donc actuellement limitée à de rares cas particuliers de toxicologie médico-légale.

V. Mise au point du dosage de l’Ethyl-Glucuronide dans les cheveux

V.1. Matériels et méthodes

V.1.1. Matériels

L’EtG ainsi que l’étalon interne penta-deutééré correspondant, EtG-D₅, (en solutions à 100 mg/L dans le méthanol, chacun) ont été obtenus auprès de Medichem (Promochem, France). L’acetonitrile, le méthanol, l’acide formique ainsi que l’acétate d’ammonium sont de qualité analytique et ont été fournis par Carlo-Erba-Reagent (France). L’eau désionisée a été obtenue par utilisation d’un système Millipore Direct-Q3 (Millipore, France). Les colonnes graphites de microextraction en phase solide (SPE) Clean Screen (UCT, U.S.A.), ont été commandées auprès de Interchim (France). La séparation chromatographique a été réalisée par utilisation d’une colonne Uptisphere-3SI, à base de silice, 100 x 2 mm D.I., taille des particules 3 µm (Interchim, France).

V.1.2. Procédure de décontamination et d’extraction des échantillons capillaires

La décontamination des mèches de cheveux a été effectuée en deux étapes : rinçage de celles-ci dans 10 mL d’eau (deux fois 1 min) puis dans 10 mL de dichlorométhane (deux fois 1 min), de façon à éliminer toutes substances hydrophiles et lipophiles présentes à la surface des échantillons. Un séchage des prélèvements capillaires entre deux feuilles de papier absorbant a été réalisé après chaque étape de rinçage. Les cheveux ont été ensuite finement coupés en segments d’une longueur d’environ 1 mm. Un échantillon de 30 mg de cheveux ainsi coupés a été nécessaire à l’analyse. Chaque échantillon a été déposé dans un

tube en verre à fond rond de 15 mL, 2 mL d'eau désionisée et 100 µL de solution d'étalon interne étaient ajoutés. Le mélange obtenu a été alors vortexé et déposé dans un bain à ultrasons pendant une période de 2 h à 50 °C. Après cette période d'incubation, chaque échantillon a été déposé à la surface d'une colonne d'extraction en phase solide (SPE Clean Screen, UCT, USA) préalablement conditionnée par 2 mL d'une solution d'acide formique à 1 % dans le méthanol (1/99; v/v) et par 2 mL d'une solution d'acide formique à 1 % en milieu aqueux (1/99; v/v). Une attention particulière a été portée pour que les colonnes SPE ne sèchent pas entre ces étapes de conditionnement. Un lavage de chaque colonne SPE a été alors effectué avec 2 mL d'eau désionisée. Un vide poussé de 0,5 bar a été ensuite appliqué pendant environ 10 min afin d'éliminer les liquides résiduels et de sécher les colonnes SPE. L'éluion de l'EtG a pu être réalisée par ajout de 2 mL d'une solution d'acide formique à 1 % dans le méthanol (1/99; v/v). Les éluats ont été récupérés dans des tubes à hémolyse en verre de 5 mL et évaporés à sec sous flux d'azote à 40 °C pendant 15 mn au moyen d'un système Turbovap® (Zymark, France). Le résidu sec obtenu a été dissous par 100 µL d'un mélange acétonitrile / tampon acétate d'ammonium (95/5; v/v) à pH = 6,8. 10 µL ont été alors injectés dans le système de chromatographique.

V.1.3. Système chromatographique et conditions analytiques

La recherche et/ou le dosage de l'EtG ont été réalisés par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem ou LC-ESI-MS/MS (du terme anglais Liquid Chromatography Electro-Spray Ionization Tandem Mass Spectrometry). Le système chromatographique utilisé est composé (Figure 13) :

- d'un chromatographe en phase liquide à haute performance ou HPLC (du terme anglais *High Performance Liquid Chromatography*) Perkin Elmer Series 200 (Perkin Elmer, France) équipé de deux pompes permettant le mélange des phases mobiles ainsi que d'un passeur automatique des échantillons.

- d'un spectromètre de masse triple-quadrupole API 2000 équipé d'une interface Turboionspray (Applied Bioystems / Sciex, Canada) permettant l'ionisation et la détection spécifique de l'EtG.

La séparation chromatographique de l'EtG et de l'étalon interne EtG-D₅ est obtenue en utilisant une colonne chromatographique Uptisphere-3SI, 100 x 2 mm, 3 µm D.I. (Interchim, France). La phase mobile est composée de : acetonitrile 95% (pompe A) et tampon acetate d'ammonium à pH=6.8, 5 % (v/v) (pompe B) avec un débit isocratique de 200 µL/mn.

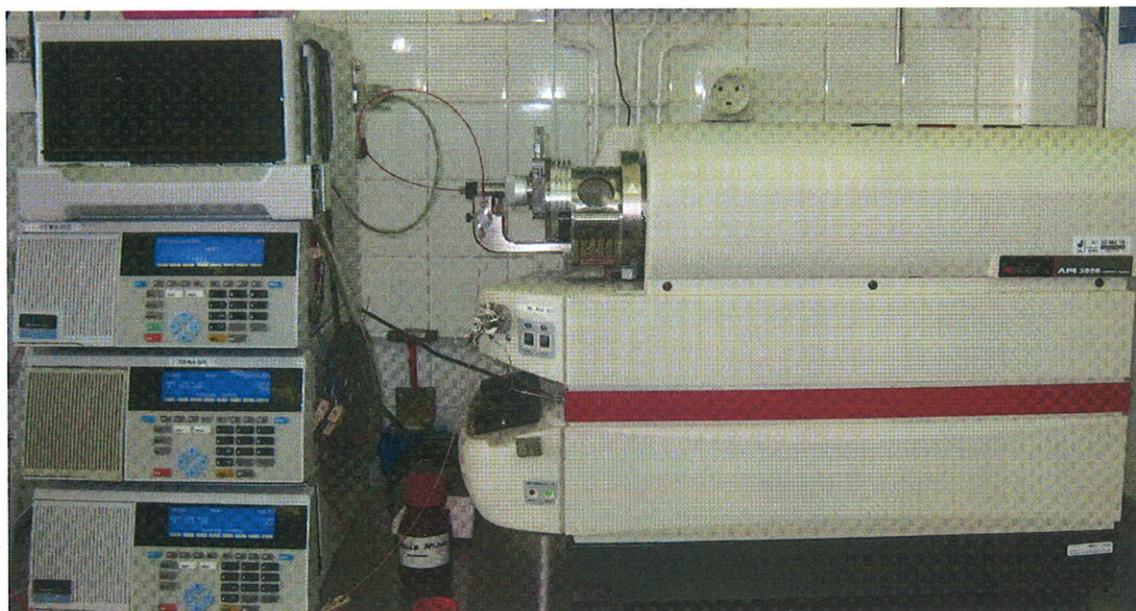


Figure 13 : Système de chromatographie en phase liquide Perkin Elmer series 200 couplé au spectromètre de masse API 2000 utilisé pour le dosage de l'EtG dans les cheveux.

Les paramètres d'ionisation et de détection de l'EtG avaient été préalablement optimisés par la fonction « auto-tune » du logiciel Analyst[®] du spectromètre de masse, après infusion d'une solution d'EtG à 10 mg/L. L'ionisation de l'EtG par electrospray a été réalisée au niveau d'une source de type turboionspray fonctionnant en mode d'ionisation

en mode d'ionisation négative. Les conditions de fonctionnement de cette source d'ionisation étaient les suivantes : température réglée à 400°C, tension d'ionisation de -5 kV et l'azote était utilisé comme gaz de nébulisation. La détection a été réalisée, par acquisition en mode « Multiple Reaction Monitoring » (ou MRM), des ions précurseurs caractéristiques de l'EtG et de l'EtG-D5 avec une ionisation par électrospray en mode négatif : $[M-H]^-$ m/z 221 et 226 respectivement. Les transitions (ion parent \rightarrow ion fils) sélectionnées pour identifier chaque composé étaient les suivantes : m/z 221 \rightarrow 75 (transition de quantification) et m/z 221 \rightarrow 85 (transition de confirmation) pour l'EtG, m/z 226 \rightarrow 75 pour l'étalon interne EtG-D5.

V.1.4. Calibration et procédure de validation de la méthode analytique

V.1.4.1. Préparation de la gamme de calibration pour le dosage de l'EtG

Les solutions « mères » d'EtG et d'EtG-D5 (100 mg/L dans le méthanol) étaient stockées au congélateur à -20°C, la stabilité de ces solutions a pu être vérifiée, dans notre laboratoire, pendant une durée d'au moins 6 mois dans ces conditions de conservation. Les solutions « de travail » étaient préparées par dilution des solutions « mères » dans le méthanol de façon à obtenir des concentrations de 0,001, 0,01, 0,1 et 1 mg/L pour l'EtG et 0,1 mg/L pour l'EtG-D5. La gamme de calibration a été réalisée en surchargeant des cheveux « vierges » d'enfants avec des quantités appropriées de ces solutions « de travail » comme décrit dans le Tableau III. Les échantillons ainsi préparés étaient extraits puis injectés dans le système chromatographique, selon la procédure décrite précédemment. Les droites de calibration ont été estimées à l'aide du logiciel Analyst[®] selon une régression quadratique avec une pondération de type 1/X.

Tableau III : Préparation de la gamme de calibration pour le dosage de l'EtG.

Concentration (pg/mg)	Gamme d'étalonnage						Echantillon à analyser
	0	10	50	100	500	1000	X
Cheveux sans EtG finement coupés (mg)	30	30	30	30	30	30	-
Cheveux à analyser finement coupés (mg)	-	-	-	-	-	-	30
Solution fille d'EtG à 1 mg/L (µL)	-	-	-	-	-	30	-
Solution fille d'EtG à 100 µg/L (µL)	-	-	-	30	150	-	-
Solution fille d'EtG à 10 µg/L (µL)	-	30	150	-	-	-	-
Solution fille d'EtG-D5 à 100 µg/L (µL)	100	100	100	100	100	100	100
Méthanol (µL)	150	120	-	120	-	120	150
Eau désionisée (mL)	2	2	2	2	2	2	2

V.1.4.2. Procédure de validation de la méthode analytique

La procédure de validation a été réalisée selon les recommandations récentes de la Société Française de Toxicologie Analytique (SFTA) concernant les critères d'évaluation et d'acceptabilité pour la validation de nouvelles méthodes analytiques [89,90]. Cinq échantillons identiques pour chaque niveau de calibration (10, 50, 100, 500, 1000 et 3000 pg/mg) ont ainsi été analysés selon un protocole classique de validation analytique en 5 jours, de façon à déterminer les données de répétabilité et de reproductibilité pour chaque niveau de concentration. La précision « intra-jour » (données de répétabilité) a été déterminée pour 4 niveaux de concentration (10, 100, 1000 et 3000

pg/mg) par analyse de 5 échantillons identiques (pour chacun de ces 4 niveaux de concentration), le même jour. La précision « inter-jour » (données de reproductibilité) a été mesurée en analysant ces 4 niveaux de concentration sur une période de cinq jours différents. Ces mesures nous ont donc permis de calculer les paramètres de validation de la technique analytique pour chaque niveau de calibration testé : concentration moyenne mesurée +/- écart type, biais relatif, précision et estimation de l'incertitude de mesure.

La limite de détection (LDD) de la technique analytique est définie comme étant la concentration testée la plus faible permettant d'obtenir une réponse chromatographique supérieure ou égale à trois fois celle correspondant à la moyenne du « bruit de fond », soit un rapport « signal / Bruit » ou $S/N \geq 3$. Le logiciel Analyst[®] a été utilisé pour la détermination de la LDD. La limite de quantification (LDQ) est définie comme étant la plus faible concentration de manière répétable avec une précision et un biais relatif inférieurs à 20 %. Enfin, des échantillons de cheveux prélevés sur des adultes abstinents ainsi que des enfants ont été analysés afin de détecter d'éventuels signaux chromatographiques interférents avec celui de l'EtG.

V.2. Validation de la technique analytique

Les coefficients de corrélation r^2 des courbes de calibration effectuées étaient systématiquement corrects avec des valeurs supérieures à 0,999 dans la gamme de concentrations testées : 10 à 3000 pg/mg de cheveux. Les équations des courbes de calibration étaient déterminées selon une régression quadratique avec une pondération de type 1/X. Une LDD égale à 4 pg/mg et une LDQ de 10 pg/mg de cheveux ont pu être déterminées conformément à la procédure de validation de la technique analytique.

La répétabilité et la reproductibilité de notre technique analytique étaient acceptables avec des valeurs de précision et de biais relatifs toujours inférieurs à 20 % dans la gamme de concentrations testées (Tableaux IV et V). Par ailleurs, il n'a pas été mis en évidence d'influence de composés interférents sur le signal chromatographique de l'EtG ou

l'EtG-D5. L'étude d'un éventuel effet de « matrice » n'a pas mis en évidence d'augmentation ou de diminution significatives des signaux chromatographiques obtenus pour l'EtG ou l'EtG-D5, par d'éventuels composés interférents, aux temps de rétention correspondants. Cette technique analytique nous a donc permis d'atteindre des valeurs de LDD et LDQ comparables à celles retrouvées dans la littérature au moyen d'un équipement similaire [63,65]. Cette technique présente cependant l'avantage d'atteindre des valeurs de LDD et LDQ intéressantes à partir d'une faible prise d'essai (30 mg de cheveux seulement sont nécessaires) et en utilisant un système chromatographique LC-MS/MS relativement ancien. Les performances de détection de l'EtG par cette méthode pourraient donc certainement être améliorées par l'utilisation d'une prise d'essai plus importante et/ou par une concentration des résidus secs obtenus lors de l'extraction en utilisant un volume inférieur de phase de reprise (soit par exemple 50 µL du mélange acétonitrile / tampon acétate d'ammonium (95/5; v/v) à pH = 6,8 au lieu des 100 µL utilisés ici).

Les Figures 14, 15 et 16 représentent des exemples de chromatogrammes obtenus lors de l'analyse : de cheveux prélevés sur des enfants (vierges en EtG), de cheveux « surchargés » en EtG à la limite de quantification de la technique et de cheveux « surchargés » en EtG au point de gamme 3000 pg/mg de cheveux, respectivement.

Tableau IV : Données de validation concernant la reproductibilité de la technique de dosage de l'Ethyl-Glucuronide dans les prélèvements capillaires.

Concentration théorique	Concentration mesurée (pg/mg de cheveux)				r ²	r
	10	100,0	1000,0	3000		
J1 18/08/2007	10,7	122,0	1070,0	2810,0	0,9994	0,9997
J2 09/03/2007	11,7	97,5	912,0	2660,0	0,9984	0,9992
J3 09/04/2007	11,6	117,0	811,0	2640,0	0,9994	0,9997
J4 09/05/2007	10,7	87,0	925,0	2810,0	0,9996	0,9998
J5 09/07/2007	10,8	89,8	1030,0	2890,0	0,9996	0,9998
Concentration moyenne	11,1	102,7	949,6	2762,0	<u>Type de régression:</u> QUADRATIQUE <u>Type de pondération:</u> 1/X	
Biais relatif (%)	11,0	2,7	-5,0	-7,9		
Ecart-type	0,5	15,9	102,7	107,6		
Precision C.V. (%)	4,5	15,5	10,8	3,9		
Estimation de l'incertitude (%)	21,1	34,5	25,6	15,1		

Tableau V : Données de validation concernant la répétabilité de la technique de dosage de l'Ethyl-Glucuronide dans les prélèvements capillaires.

Concentration théorique	Concentration mesurée (pg/mg de cheveux)			
	10 LDQ	100 Cintermédiaire	1000 Cintermédiaire	3000 Cmax
Date	09/05/2007	09/04/2007	09/03/2007	18/08/2007
Répéta 1	10,5	111,0	980,0	2990,0
Répéta 2	9,5	101,0	956,0	2610,0
Répéta 3	12,7	84,9	966,0	2970,0
Répéta 4	10,2	90,8	935,0	2790,0
Répéta 5	10,8	97,8	981,0	3060,0
Concentration moyenne	10,7	97,1	963,6	2884,0
Biais relatif (%)	7,4	-2,9	-3,6	-3,9
Ecart-type	1,2	10,0	19,1	182,7
CV (%)	11,2	10,3	2,0	6,3

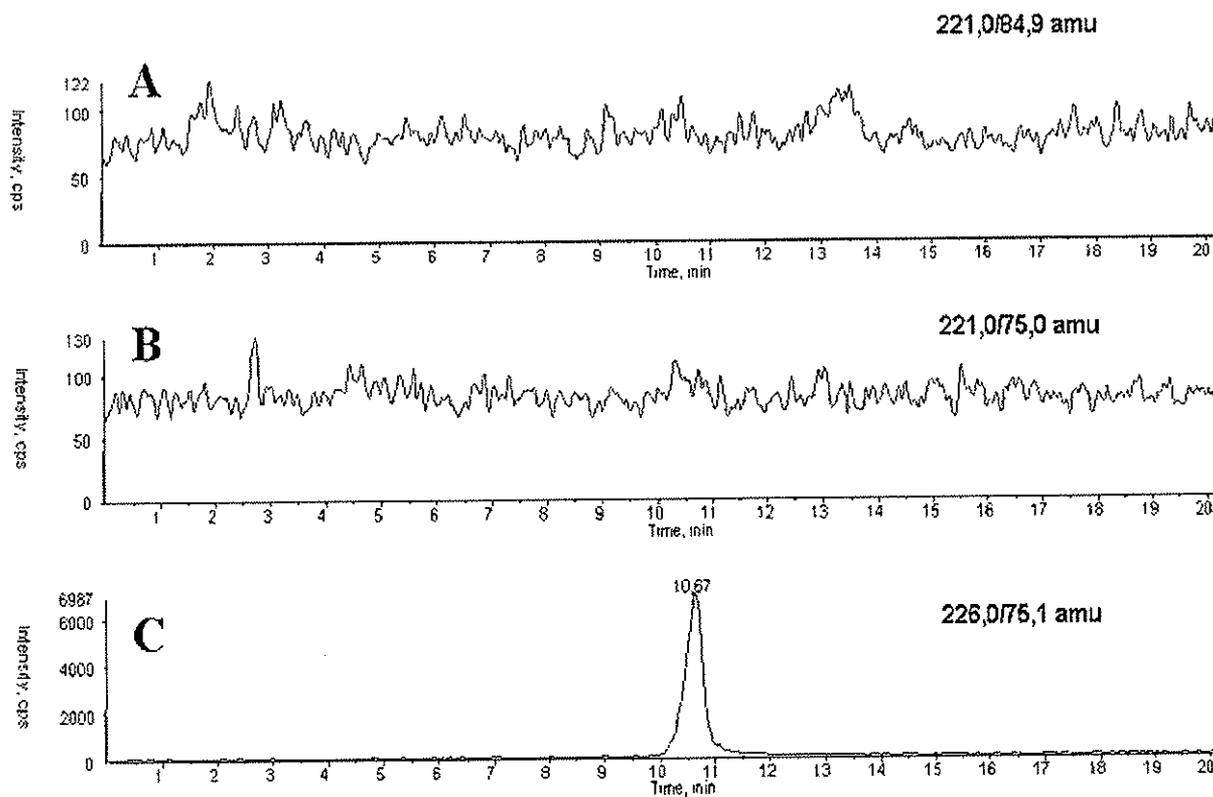


Figure 14 : Chromatogramme caractéristique obtenu par analyse des cheveux d'un patient abstinent (enfant âgé de 6 ans), m/z 221 \rightarrow 85 (A), 221 \rightarrow 75 (B) and 226 \rightarrow 85 (C).

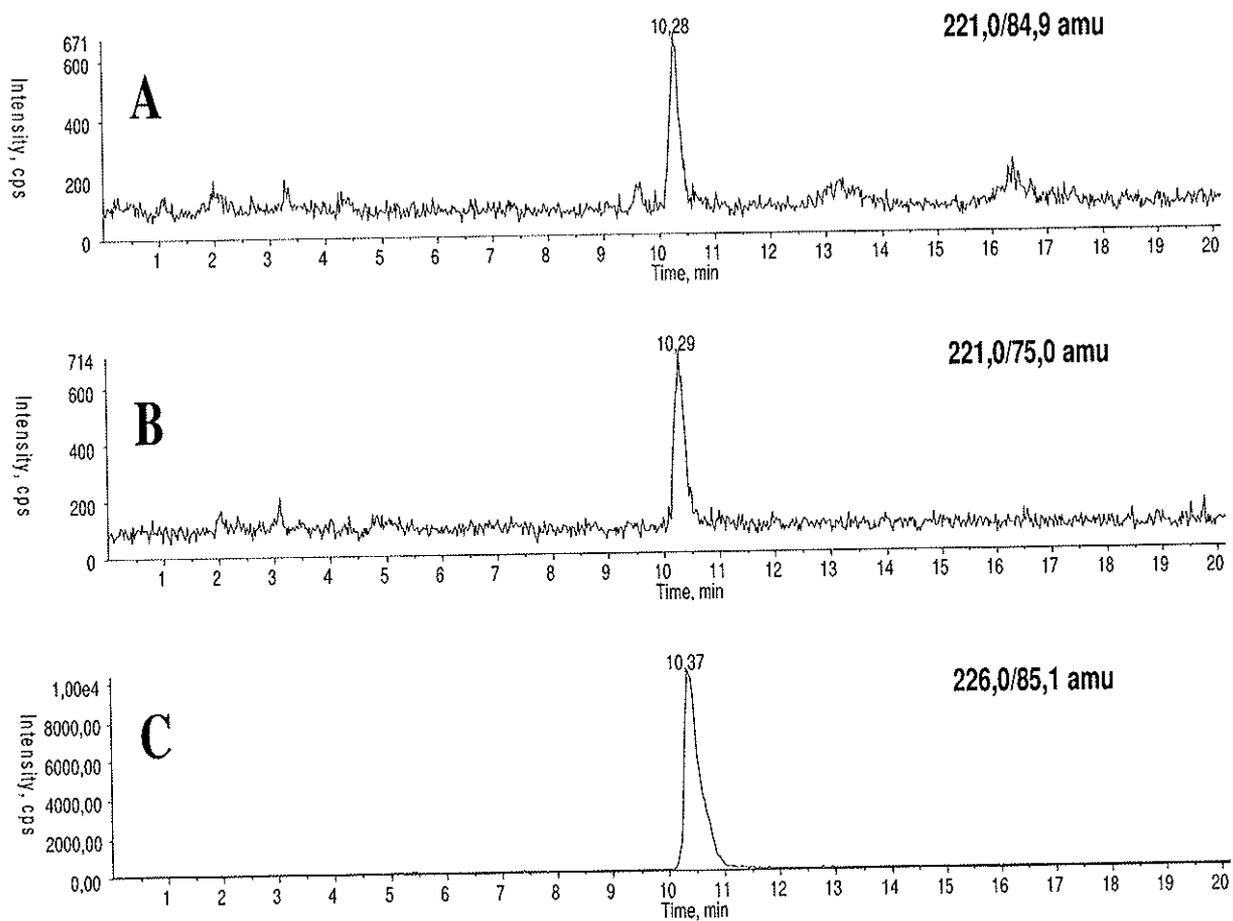


Figure 15 : Chromatogramme caractéristique obtenu à la limite de quantification (concentration en EtG de 10 pg/mg), m/z 221→85 (A), 221→75 (B) and 226→85 (C).

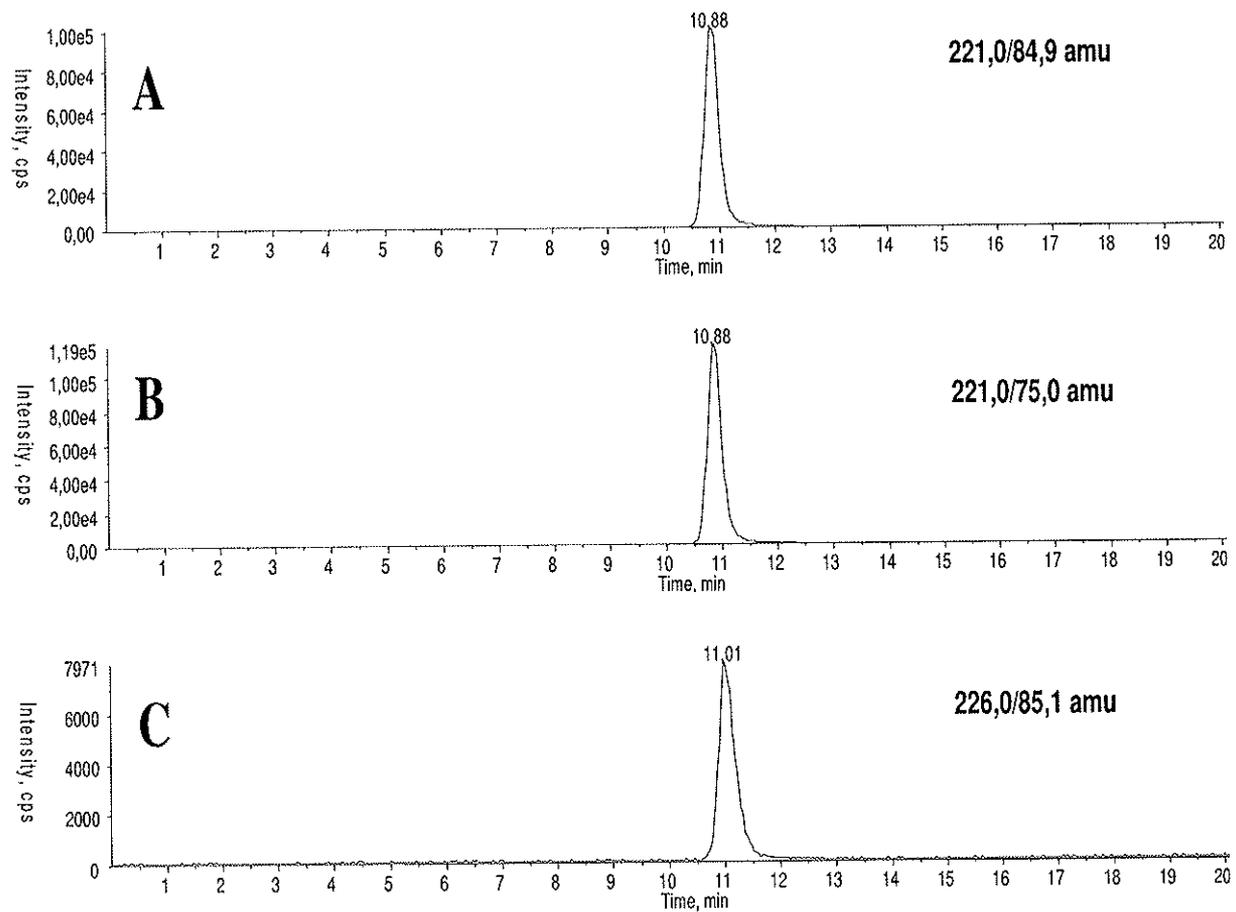


Figure 16 : Chromatogramme caractéristique obtenu au point de calibration 3000 pg/mg, m/z 221→85 (A), 221→75 (B) and 226→85 (C).

VI. Mise en application du dosage de l'Ethyl-Glucuronide dans les cheveux au C.H.U. de Limoges

VI.1. Etude préliminaire

VI.1.1. Objectifs

Après avoir développé et validé la technique de dosage de l'EtG par LC-MS/MS dans les prélèvements capillaires, les objectifs de notre étude étaient :

- de tester des échantillons de cheveux provenant de différentes populations de patients en fonction de leur consommation d'éthanol : abstinents, consommateurs occasionnels et consommateurs excessifs ;
- d'effectuer un travail préliminaire dans le but de déterminer des concentrations seuils (ou valeurs « cut-off ») en EtG dans les cheveux permettant de distinguer une consommation alcoolique nulle ou modérée, d'une consommation excessive et donc d'établir le diagnostic d'éthylisme chronique.

VI.1.2. Patients étudiés

Afin d'évaluer la technique analytique développée, des prélèvements capillaires ont été réalisés sur différentes catégories de patients.

- Des prélèvements de mèches de cheveux provenant de patients admis dans le service des urgences du C.H.U. de Limoges et dont l'éthylisme chronique était médicalement avéré ont été effectués (patients « E », n=12). Ces patients étaient sélectionnés pour cette étude selon des critères exhaustifs, par des médecins urgentistes, et présentaient une consommation alcoolique quotidienne, excessive et chronique. Tous ces patients éthyliques participaient à cette étude après avoir reçu une information complète sur les objectifs et procédures du travail effectué. Un prélèvement capillaire était effectué, comme décrit précédemment, après que chaque patient ait donné son consentement éclairé. Par ailleurs, des prélèvements sanguins étaient systématiquement réalisés sur chacun de ces patients à leur admission, afin de doser différents bio-marqueurs de l'éthylisme : alcoolémie, gamma-glutamyl transférase et volume globulaire moyen.

- Des échantillons capillaires, prélevés en *post mortem* à des fins médico-légales, dans un contexte de décès avec une notion ou une forte suspicion de consommation chronique et excessive d'éthanol ont également été analysés (patients « ML », n=5).

- Des cheveux de volontaires abstinents ou consommateurs occasionnels (patients NE, n=7), recrutés au sein de notre laboratoire et déclarant une consommation alcoolique variant de 0 à 10 verres par semaine, ont également été analysés.

Les prélèvements capillaires de 24 sujets ont ainsi été analysés. Les principales caractéristiques des patients recrutés figurent dans le Tableau VI. Les patients éthyliques chroniques ou suspectés d'éthylisme chronique (E et ML) testés étaient tous de sexe masculin avec un âge moyen de 46,8 +/- 12,9 ans, la coloration des cheveux analysés était majoritairement brune (63 % des cas dans le groupe de patients éthyliques hospitalisés et 86 % dans le groupe de volontaires abstinents ou consommateurs occasionnels).

Tableau VI : Principales caractéristiques des sujets testés (n=24).

Sujets (n=23)	Sexe	Age	Coloration cheveux	Contexte
Cas médico-légaux avec contexte d'éthylisme (n = 5)				
1	M	43	Bruns	Ethylisme chronique
2	M	21	Bruns	Poly-toxicomanie
3	M	37	Bruns	Ethylisme chronique
4	M	36	Bruns	Alcoolisation aiguë
5	F	59	Bruns + teinture	Ethylisme chronique
Patients éthyliques chroniques hospitalisés au C.H.U. de Limoges (n = 12)				
5	M	53	Bruns	
6	M	39	Blonds	
7	M	49	Bruns / Gris	
8	M	71	Bruns	
9	M	41	Bruns	
10	M	49	Bruns / Gris	Ethylisme chronique
11	M	39	Bruns	médicalement avéré
12	M	43	Gris	
13	M	74	Gris	
14	M	50	Gris	
15	M	50	Bruns	
16	M	54	Bruns	
Consommateurs occasionnels (n = 7)				
17	M	27	Blonds	5 à 10 verres / semaine
18	M	27	Bruns	5 à 10 verres / semaine
19	M	40	Bruns	0 à 3 verres / semaine
20	M	26	Bruns	5 à 10 verres / semaine
21	F	24	Bruns	0 à 3 verres / semaine
22	F	26	Bruns	0 à 3 verres / semaine
23	F	26	Bruns	0 à 3 verres / semaine

VI.1.3. Résultats

Les résultats préliminaires de notre étude sont décrits ci-après. Le nombre de sujets testés est clairement insuffisant pour estimer correctement les sensibilité et spécificité des marqueurs biologiques mesurés. Le recrutement de nouveaux patients éthyliques chroniques et buveurs occasionnels ou abstinents s'avère donc indispensable pour :

- apprécier la capacité de l'EtG à différencier correctement les patients présentant une imprégnation alcoolique des patients consommateurs occasionnels et/ou modérés : capacité à identifier correctement les « vrais positifs » (ou sensibilité) et capacité à identifier correctement les « vrais négatifs » (ou spécificité) ;
- proposer par la suite des valeurs seuils pour ce marqueur dans les prélèvements capillaires.

Les résultats concernant le groupe de patients éthyliques chroniques admis au C.H.U. de Limoges (n=12) figurent dans le Tableau VII. L'éthanolémie mesurée chez ces patients à l'admission était positive dans 83 % des cas (10 patients sur 12) et variait de 0 à 5,1 g/L. Le VGM mesuré était normal (80 à 100 fL) dans 75 % des cas (9 patients sur 12) et une macrocytose était observée (VGM supérieur à 100 fL) dans 25 % des cas. La mesure de l'activité enzymatique GGT était anormalement élevée chez 58 % de ces patients (7 patients sur 12) avec des valeurs variant de 104 à 509 U/L. Pour ces 12 sujets testés (100 % des cas), la recherche d'EtG dans les cheveux était positive avec des concentrations toujours supérieures à 50 pg/mg de cheveux et variant de 54 à 497 pg/mg de cheveux ($m = 220 \pm 155$ pg/mg). La Figure 17 est un chromatogramme obtenu par l'analyse des cheveux d'un patient éthylique chronique positif en EtG, la concentration était de 341 pg/mg de cheveux.

La recherche de l'EtG chez les sujets recrutés dans un contexte médico-légal était fortement positive dans les 5 cas testés. Les éthanolémies mesurées en *post mortem* étaient positives chez 4 de ces sujets avec des valeurs variant de 0,73 à 3,41 g/L. Les

concentrations en EtG mesurées dans ce groupe variaient de 132 à 838 pg/mg de cheveux et attestent d'un probable contexte d'éthylisme chronique.

Il n'a pas été détecté d'EtG dans les cheveux de 4 patients déclarant une abstinence ou une consommation occasionnelle de boissons alcoolisées (n=7) (soit EtG < LDD ou EtG < 4 pg/mg). Chez un patient de ce groupe, il a été détecté de l'EtG à la concentration de 10 pg/mg de cheveux et chez deux patients, la recherche d'EtG était positive mais avec une concentration inférieure à notre limite de quantification (soit LDD < EtG < LDQ ou 4 < EtG < 10 pg/mg de cheveux).

Tableau VII : Résultats obtenus chez les patients éthyliques chroniques testés (n=12, ^ag/L à l'admission aux urgences ; ^bVolume Globulaire Moyen en fL ; ^cGamma-GlutamylTransferase (U/L) ; ^dpg/mg de cheveux).

Patients alcooliques chroniques hospitalisés au C.H.U. de Limoges (n = 12)												
Sujet N°	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Ethanolémie ^a	3,8	<0,1	3,2	0,4	3,9	3,6	5,1	<0,1	1,9	3,0	4,9	4,6
VGM ^b	98	99	106	102	107	90	95	94	83	97	99	100
GGT ^c	444	509	140	185	341	46	422	51	57	104	42	40
EtG ^d	180	54	370	341	303	60	252	60	92	66	497	365

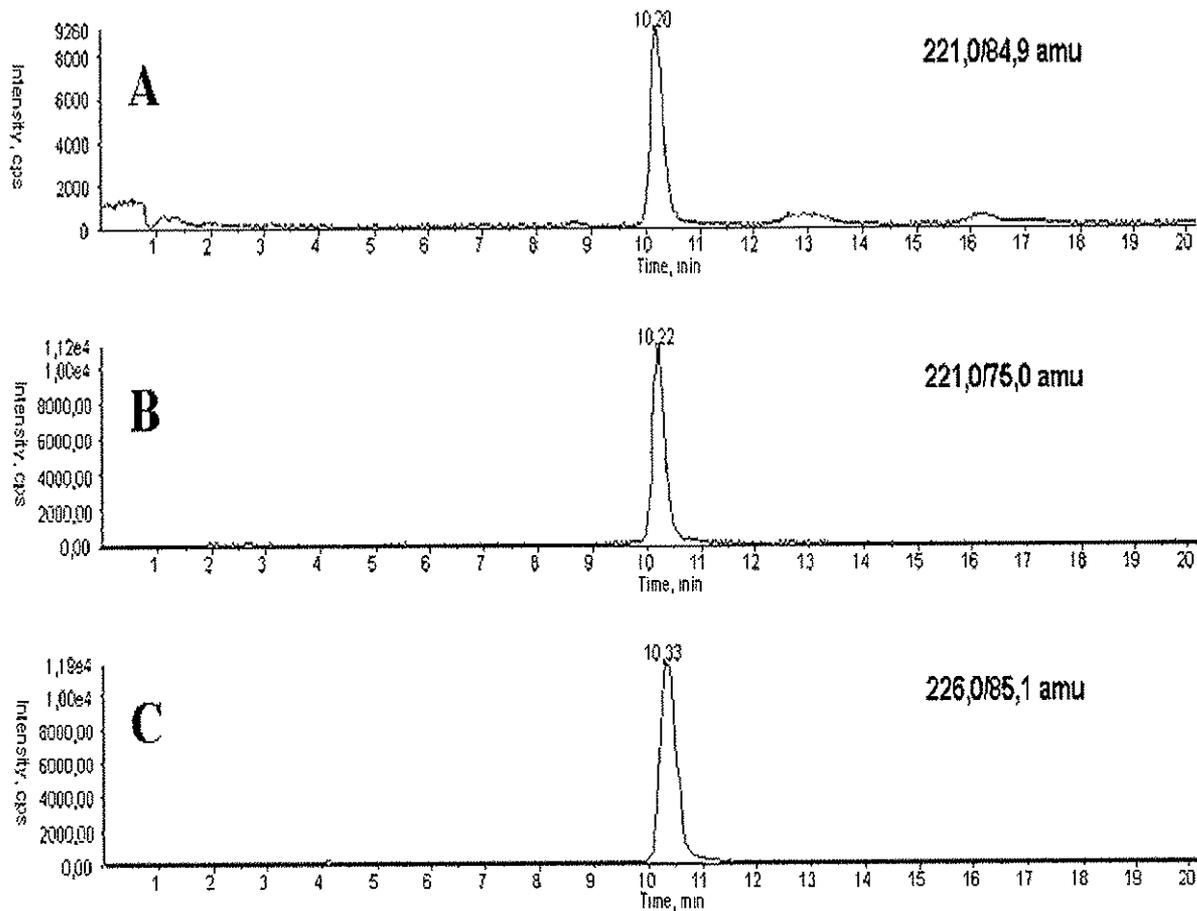


Figure 17 : Chromatogramme caractéristique obtenu chez un patient éthylique chronique (patient N° 8, la concentration mesurée en EtG était de 341 pg/mg), m/z 221→85 (A), 221→75 (B) and 226→85 (C).

VI.2. Exemple d'application : cas médico-légaux

Dans un contexte médico-légal, nous avons pu mettre en application la recherche de l'EtG dans les cheveux, à l'occasion de 3 dossiers qui sont succinctement présentés dans les lignes suivantes.

Cas N°1 :

Dans le cas d'un meurtre d'une femme par son époux, ce dernier alléguait pour sa défense devant le juge d'instruction que sa femme s'adonnait régulièrement (et intensivement) à la consommation de boissons alcoolisées. Une autopsie ayant été pratiquée, et un échantillon de cheveux étant disponible, le dosage de l'EtG dans les cheveux de la victime a pu être réalisé plusieurs mois après le décès afin de juger de la véracité des dires de l'époux.

Les résultats furent les suivants : dans les segments de cheveux situés de 0 (à partir du cuir chevelu) à 3 cm, de 3 à 6 cm, de 6 à 9 cm et de 9 cm à la pointe (longueur totale de la mèche : 17 cm), les concentrations d'EtG observées étaient de 176, 178, 194 et 206 pg/mg de cheveux respectivement. Ces résultats, en faveur d'une consommation importante et régulière de boissons alcoolisées par la victime, approximativement, au cours des 17 mois qui avaient précédés son décès, étaient donc cohérents avec les déclarations du mari.

Cas N°2 :

Un homme de 50 ans est accusé d'agression sexuelle. Lors de l'instruction, sa victime déclare au juge que son agresseur est « un alcoolique ». En conséquence, le juge ordonne de déterminer si le mis en examen présente, ou a présenté, une pathologie alcoolique. L'EtG a été dosé dans les cheveux de cette personne (27 pg/mg de cheveux) et est venu compléter des résultats de VGM, GGT et CDT, normaux.

La concentration d'EtG légèrement élevée était donc, toutefois, inférieure aux concentrations observées chez les consommateurs réguliers de quantités importantes de boissons alcoolisées (cf. Tableau VII). Dans leur ensemble, les résultats biologiques

n'étaient donc pas en faveur d'une consommation régulière et excessive de boissons alcoolisées au cours des quelques semaines qui avaient précédé la réalisation des prélèvements biologiques. Par contre, ils n'ont pas permis (en particulier la concentration d'EtG dans les cheveux) d'indiquer au juge une totale certitude quant à l'absence de toute consommation de boissons alcoolisées par le mis en examen durant, ou antérieurement, à cette période.

Cas N°3 :

Un homme accuse sa femme, âgée de 57 ans, de violences conjugales. Il affirme en outre aux gendarmes que son épouse s'adonne régulièrement à des excès de « boissons ». Les enquêteurs ont donc demandé à ce qu'il soit réalisé chez cette personne une recherche de marqueurs anciens et récents d'alcoolisme. La concentration d'EtG (12 pg/mg) est venue compléter des valeurs de CDT et de VGM normales, et une activité GGT élevée 92 UI/L. Cette augmentation de GGT pouvait avoir pour origine, parmi d'autres origines, un éthyisme et la concentration capillaire d'EtG était légèrement supérieure au seuil habituel (10 pg/mg) d'abstinence et/ou consommation modérée. Par conséquent, il a été difficile de ne pas envisager l'hypothèse de consommations ponctuelles et excessives de boissons alcoolisées. Toutefois, compte tenu des valeurs de VGM et de la CDT normales, l'hypothèse d'une consommation régulière (quotidienne ?) et excessive était peu probable.

VII. Discussion

Une technique de dosage de l'EtG dans les cheveux a donc été développée et validée avec succès. Les limites de détection et de quantification obtenues avec cette méthode analytique sont acceptables et comparables à celles retrouvées dans la littérature avec des technologies équivalentes ou même supérieures [63,65]. Les résultats préliminaires obtenus par analyse des cheveux de patients éthyliques chroniques sont également comparables à ceux précédemment publiés [63,65-69]. Une concentration « *cut-off* » de 4 pg/mg a récemment été proposée par certains auteurs afin de distinguer les patients abstinents des patients buveurs « sociaux » (ou consommateurs occasionnels) [66]. On peut cependant s'interroger sur l'intérêt pratique de cette distinction. Cette limite peut en plus entraîner un risque de « faux positifs ». Les résultats préliminaires de notre étude indiquent que notre technique analytique ne permet pas, avec une limite de quantification de 10 pg/mg de cheveux, de faire cette distinction. Toutefois, si nécessaire, les performances de la technique analytique présentée peuvent être certainement améliorées, compte tenu :

- de la faible prise d'essai nécessaire à l'analyse (pouvant au besoin être augmentée) ;
- du volume d'injection qui pourrait également être augmenté ;
- du volume de reprise des extraits secs (100 µL), obtenus après extraction sur cartouches SPE, qui pourrait être réduit de moitié de façon à concentrer encore ces extraits.

Les différentes études cliniques précédemment publiées sont convergentes et indiquent clairement que la recherche d'EtG dans les cheveux, les urines ou le sérum est un outil intéressant pour établir un diagnostic de consommation récente ou chronique d'alcool et ce, avec une sensibilité et une spécificité supérieures à celles des marqueurs biologiques « courants » [63,65-69]. D'autres travaux sont cependant nécessaires pour étudier et comprendre l'influence de certaines variables sur ce marqueur biologique : âge, sexe, pathologies métaboliques ou pigmentation des cheveux. Des études ultérieures de toxicogénétique pourraient également apporter des informations intéressantes sur l'influence du

polymorphisme des UDP-glucuronyl-transférases (UGT) sur la production d'EtG, permettant d'expliquer par exemple d'éventuels cas de « faux négatifs ». Le choix d'une concentration seuil destinée à établir le diagnostic d'éthylisme chronique devra être clarifié puisque des valeurs variant de 25 à 50 pg/mg de cheveux ont été précédemment proposées [70-74]. Les premiers résultats de notre étude suggèrent qu'une concentration d'EtG \geq 50 pg/mg est attribuable à une consommation excessive et chronique de boissons alcoolisées avec une excellente spécificité (risque de « faux positifs » nul). Une valeur plus faible, de l'ordre de 30 pg/mg, pourrait certainement être proposée. Le recrutement d'autres patients éthyliques chroniques permettra de conclure à ce sujet.

VIII. Conclusions et perspectives

L'éthylisme est un problème majeur de santé publique, souvent sous-estimé et dont le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments cliniques et biologiques. Les cheveux constituent une matrice intéressante : prélèvements non invasifs, large fenêtre de détection, corrélation probable entre la concentration de l'EtG et la consommation d'éthanol. La technique analytique développée au sein du Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie du C.H.U. de Limoges s'avère sensible et spécifique. L'EtG est un métabolite mineur de l'éthanol et sa détection dans les cheveux, le sérum ou les urines présente un intérêt clinique et toxicologique dans le diagnostic d'une consommation excessive et chronique d'alcool, le suivi de patients en cours de sevrage, le suivi de grossesse chez des patientes suspectes d'éthylisme, les procédures de restitution du permis de conduire et autres contextes médico-légaux. Les résultats préliminaires présentés ici seront probablement complétés, en collaboration avec les urgentistes du C.H.U. de Limoges, par le recrutement de nouveaux patients éthyliques chroniques afin d'affiner les valeurs de concentrations seuils d'EtG dans les cheveux.

IX. Bibliographie

1. Ferreira MP., Willoughby D., Alcohol consumption: the good, the bad, and the indifferent. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, 33:12-20, 2008.
2. Mallach H.J., Alkoholwirkung beim menschen. *Thieme*, Stuttgart, 13-34, 1987.
3. De Wildt SN., Kearns GL., Leeder JS., van den Anker JN., Glucuronidation in humans. Pharmacogenetic and developmental aspects. *Clin Pharmacokinet.*, 36(6):439-52, 1999.
4. Les causes attribuables de cancer en France en 2000, Lyon, WHO & IARC, p. 172, 2007.
5. Calcul OFDT sur les décès 2003 à l'aide des fractions attribuables. Hill C., Alcool et risque de cancer, ADSP, p.14-18, 2003.
6. Sources OFDT 2005, étude SAM. Etude "Stupéfiants et Accidents Mortels de la circulation routière" (SAM). Eléments de conclusion, 2005.
7. Sources OFDT 2006, Séries statistiques sur la consommation d'alcool. http://www.ofdt.fr/BDD_len/seristat/00014.xhtml, consulté le 5 septembre 2008.
8. Sources OFDT 2004, Séries statistiques sur le taux de décès par psychose alcoolique, cirrhose du foie et cancer des voies aérodigestives chez les femmes et sur le taux de décès par psychose alcoolique, cirrhose du foie et cancer des voies aérodigestives chez les hommes. http://www.ofdt.fr/BDD_len/seristat/00016.xhtml, consulté le 5 septembre 2008.
9. Ramstedt M., Alcohol-related mortality in 15 European countries in the postwar period, *Eur. J. Pop.*, 18 (4) 307-323, 2002.
10. Sources OFDT et Institut National de Prévention et d'Education à la Santé (INPES), Baromètre santé. 2005.
11. Com-Ruelle L., Dourgnon P., Jusot F, Latil E., Lengagne P., Identification et mesure des problèmes d'alcool en France : une comparaison de deux enquêtes en population générale, Questions d'économie de la santé, série Méthode n°97, 2005.
12. Mouquet M.-C., Villet H., Les risques d'alcoolisation excessive chez les patients ayant recours aux soins un jour donné, Drees, Etudes et Résultats n°192, 1-11, 2002.

13. Rehm M., Room R., Brink W., Jacobi F., Alcohol-use disorders in EU countries and Norway: An overview of the epidemiology, *Eur. Neuropsychopharm.*, 15 377-388, 2005.
14. Palle C., Chabane C., Lemieux C., Prisse N., Rapport sur les centres spécialisés de soins aux toxicomanes et les centres de cure ambulatoire en alcoologie en 2005, Exploitation des rapports d'activité type des CSST, OFDT/DGS, 2006.
15. Programme médicalisé des systèmes d'information (PMSI) et Agence Technique de l'information sur l'Hospitalisation (ATIH), 2006.
16. Kopp P., Fenoglio P., coût du traitement des pathologies liées aux drogues licites (alcool et tabac) et illicites et de mise en oeuvre de la loi en France, sous la direction scientifique de P. Kopp, rapport de recherche subventionné par l'OFDT, 2006.
17. Beck F., Legleye S., Spilka S., L'alcoolisation des personnes sans domicile : remise en cause d'un stéréotype, *Economie et Statistiques*, n°391-392 : 131-149, 2006.
18. Legleye S., Beck F., Le Nezet O., Spilka S., Drogues à l'adolescence en 2005 - Niveaux, contextes d'usage et évolutions à 17 ans en France - Résultats de la cinquième enquête nationale ESCAPAD, OFDT, 2007.
19. Sources OFDT 2006, Séries statistiques sur les dépistages de l'alcoolémie illégale au volant, http://www.ofdt.fr/BDD_len/seristat/00033.xhtml, consulté le 6 septembre 2008.
20. Sources OFDT 2006, Séries statistiques sur les condamnations pour conduite en état alcoolique, http://www.ofdt.fr/BDD_len/seristat/00031.xhtml, consulté le 6 septembre 2008.
21. Perez-Diaz C., Alcool et délinquance, *Tendances*, n°9, 2000.
22. Jolles P., Zahn H., Höcker H., Formation and structure of human hair, Birkhäuser Verlag, vol. 78, 1997.
23. Harkey MR., Anatomy and physiology of hair, *Forensic Sc. Int.*, 63: 9-18, 1993.
24. Robbins CR., Chemical and physical behaviour of human hair, 4th edition, Springer-Verlag, 2002.
25. Pragst F., Balikova MA., State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse, *Clin Chim Acta.*, 370(1-2):17-49, 2006.
26. Nakahara Y., Takahashi K., Kikura R., Hair analysis for drugs of abuse. Effect of physicochemical properties of drugs on the incorporation rates into hair, *Biol Pharm Bull.*, 18(9):1223-7, 1995.

27. Uematsu T., Utilization of hair analysis for therapeutic drug monitoring with a special reference to ofloxacin and to nicotine, *Forensic Sci. Int.*, 63(1-3):261-8, 1993.
28. Kintz P., Goullé JP., Fornes P., Ludes B., Une nouvelle série d'analyse des cheveux de Napoléon confirme une exposition chronique à l'arsenic. *An. Tox. Anal.*, vol. XIII n° 4, 2001.
29. Belda E., Naveau S., Chaput JC., Alcoolisme : épidémiologie, pathologie, dépistage, *Cah. Nutr. Diét.*, 30:195-200, 1995.
30. Nordmann R., L'alcool: nutriment et/ou toxique? *Cah. Nutr. Diét.*, 26:349-351, 1991.
31. Nordmann R., Métabolisme de l'alcool, *Encycl. Méd. Chir.*, Endocrinologie-Nutrition, 10-384-A-10, 1997.
32. Dresen S., Weinmann W., Wurst FM., Forensic confirmatory analysis of ethyl-sulfate, a new marker for alcohol consumption, by liquid-chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 15(11):1644-8, 2004.
33. Miners JO., McKinnon RA., Mackenzie PI., Genetic polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferases and their functional significance, *Toxicology*, 181-182:453-6, 2002.
34. Niemelä O., Biomarkers in alcoholism, *Clin. Chim. Acta.*, 377(1-2):39-49, 2007.
35. Chrostek L., Skiba-Grochowska B., Cylwik B., Szmitkowski M., Korcz W., New and traditional laboratory markers of alcohol abuse in hospitalized alcohol dependent men, *Psychiatr. Pol.*, 40(3):599-608, 2006.
36. Hillman A., Sykes RA., McConnell AA., Limitations in the use of gamma-glutamyl transferase estimations in alcohol-dependent subjects, *Alcohol*, 33(6):626-30, 1998.
37. Kristenson H, Ohrn J, Trelle E, Hood B., Serum gamma-glutamyltransferase at screening and retrospective sickness days, *Lancet*, 24;1(8178):1141, 1980.
38. Penn R., Worthington DJ., Gamma-glutamyltranspeptidase and alcohol intake, *Lancet*, 849, 1981.
39. Wu A., Chanarin I, Levi AJ., Macrocytosis of chronic alcoholism, *Lancet*, 829-831, 1974.
40. Unger KW., Johnson D Jr., Red blood cell mean corpuscular volume: a potential indicator of alcohol usage in a working population, *Am. J. Med. Sci.*, 267:281-289, 1974.

41. Seppa K., Laippala P., Saarni M., Macrocytosis as a consequence of alcohol abuse among patients in general practice, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 15, 871-876, 1991.
42. Savage DG., Ogundipe A., Allen RH., Stabler SP., Lindenbaum J., Etiology and diagnostic evaluation of macrocytosis, *Am. J. Med. Sci.*, 319(6):343-52, 2000.
43. Morgan M., Macrocytosis in alcohol-related liver disease: its value for screening, *Clin. Lab. Haemato.*, vol.3, 35-44, 1981.
44. Niemelä O., Serum diagnosis of alcoholic liver disease and markers of ethanol intake, *Ethanol and the liver*, 411-449, 2002.
45. Rosman A., Lieber CS., Diagnostic utility of laboratory tests in alcoholic liver disease, *Clin. Chem.*, 40:1641-1651, 1994.
46. Salaspuro M., Conventional and coming laboratory markers of alcoholism and heavy drinking, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 10:5-12, 1986.
47. Prytz H., Melin T., Identification of alcoholic liver disease or hidden alcohol abuse in patients with elevated liver enzymes, *J. Intern. Med.*, 233(1):21-6, 1993.
48. Salaspuro M., Carbohydrate-deficient transferrin as compared to other markers of alcoholism: a systematic review, *Alcohol*, 19:261-271, 1999.
49. Scouller K., Conigrave KM., Macaskill P., Irwig L., Whitfield JB., Should we use carbohydrate-deficient transferrin instead of gamma-glutamyl-transferase for detecting problem drinkers? A systematic review and meta-analysis, *Clin. Chem.*, 28:1894-1902, 2000.
50. Stibler H., Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed, *Clin. Chem.*, 37:2029-2037, 1991.
51. Allen JP., Litten RZ., The Role of laboratory tests in alcoholism treatment, *J. Subst. Abuse Treat.*, 20:81-85, 2001.
52. Landberg E., Pahlsson P., Lundblad A., Arnetorp A., Jeppsson JO., Carbohydrate composition of serum transferrin isoforms from patients with high alcohol consumption, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16;210(2):267-74, 1995.
53. Walter H., Hertling I., Benda N., König B., Ramskogler K., Riegler A., Semler B., Zoghiami A., Lesch OM., Sensitivity and specificity of carbohydrate-deficient transferrin in drinking experiments and different patients, *Alcohol*, 25(3):189-94, 2001.

54. Anton R., Moak DH., Carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyl-transferase as markers of heavy alcohol consumption: gender differences, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 18:747-754, 1994.
55. Kim SM., Kim JS., Kim KM., Paek HJ., Lee DH., Kim SS., Jung JG., Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of heavy drinking in Korean males, *J. Korean Med. Sci.*, 22(4):652-5, 2007.
56. Nishikawa M., Tsuchihashi H., Miki A., Katagi M., Schmitt G., Zimmer H., Keller T., Aderjan R. Determination of ethyl glucuronide, a minor metabolite of ethanol, in human serum by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 726:105-10, 1999.
57. Schmitt G., Droenner P., Skopp G., Aderjan R., Ethyl glucuronide concentration in serum of human volunteers, teetotalers, and suspected drinking drivers, *J. Forensic Sci.*, 42(6):1099-102, 1997.
58. Goll M., Schmitt G., Ganssmann B., Aderjan RE., Excretion profiles of ethyl glucuronide in human urine after internal dilution, *J. Anal. Toxicol.*, 26(5):262-6, 2002.
59. Weinmann W., Schaefer P., Thierauf A., Schreiber A., Wurst FM., Confirmatory analysis of ethylglucuronide in urine by liquid-chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry according to forensic guidelines, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 15:188-93, 2004.
60. Baranowski S., Serr A., Thierauf A., Weinmann W., Große Perdekamp M., Wurst FM., Halter CC., In vitro study of bacterial degradation of ethyl glucuronide and ethyl sulphate, *Int. J. Legal Med.*, 122(5):389-393, 2008.
61. Schummer C., Appenzeller BM., Wennig R., Quantitative determination of ethyl glucuronide in sweat, *Ther. Drug Monit.*, 30(4):536-9, 2008.
62. Lamoureux F., Sauvage FL., Merceroles M., Vallejo C., Gaulier JM., Lachâtre G., A liquid-chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method following SPE extraction dedicated to the determination of ethyl-glucuronide in hair, *SFTA-TIAFT-SOHT international meeting Martinique*, P115 Communication, 2008.
63. Janda I., Weinmann W., Kuehnle T., Lahode M., Alt A., Determination of ethyl glucuronide in human hair by SPE and LC-MS/MS, *Forensic Sci. Int.*, 128:59-65, 2002.

64. Morini L., Politi L., Zucchella A., Poletti A., Ethyl glucuronide and ethyl sulphate determination in serum by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *Clin. Chim. Acta*, 376:213-9, 2007.
65. Morini L., Politi L., Groppi A., Stramesi C., Poletti A., Determination of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, 41:34-42, 2006.
66. Politi L., Morini L., Leone F., Poletti A., Ethyl glucuronide in hair: Is it a reliable marker of chronic high levels of alcohol consumption? *Addiction*, 101:1408-12, 2006.
67. Yegles M., Labarthe A., Auwärter V., Hartwig S., Vater H., Wennig R., Pragst F., Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotallers, *Forensic Sci. Int.*, 29;145(2-3):167-73, 2004.
68. Jurado C., Soriano T., Giménez MP., Menendez M., Diagnosis of chronic alcohol consumption. Hair analysis for ethyl-glucuronide, *Forensic Sci. Int.*, 29;145(2-3):161-6, 2004.
69. Skopp G., Schmitt G., Pötsch L., Drönner P., Aderjan R., Mattern R., Ethyl glucuronide in human hair, *Alcohol*, 35(3):283-5, 2000.
70. Pragst F., Yegles M., Alcohol markers in hair. In: Kintz P, ed. *Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair*, Boca Raton, FL: CRC Taylor & Francis, 287-323, 2006.
71. Kintz P., Villain M., Vallet E., Etter M., Salquebre G., Cirimele V., Ethyl glucuronide: unusual distribution between head hair and pubic hair, *Forensic Sci. Int.*, 21;176(1):87-90, 2008.
72. Bendroth P., Kronstrand R., Helander A., Greby J., Stephanson N., Krantz P., Comparison of ethyl glucuronide in hair with phosphatidylethanol in whole blood as post mortem markers of alcohol abuse, *Forensic Sci. Int.*, 21;176(1):76-81, 2008.
73. Wurst FM., Kelso E., Weinmann W., Pragst F., Yegles M., Sundström Poromaa I., Measurement of direct ethanol metabolites suggests higher rate of alcohol use among pregnant women than found with the AUDIT -a pilot study in a population-based sample of Swedish women, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 198(4):407 1-5, 2008.

74. Appenzeller BM., Agirman R., Neuberg P., Yegles M., Wennig R., Segmental determination of ethyl glucuronide in hair: a pilot study, *Forensic Sci. Int.*, 20;173(2-3):87-92, 2007.
75. Kinnunen PM., Lange LG., Identification and quantitation of fatty acid ethyl esters in biological specimens, *Anal. Biochem.*, 1;140(2):567-76, 1984.
76. Laposata M., Fatty acid ethyl esters: ethanol metabolites which mediate ethanol-induced organ damage and serve as markers of ethanol intake, *Prog. Lipid Res.*, 37(5):307-16, 1998.
77. Doyle KM., Cluette-Brown JE., Dube DM., Bernhardt TG., Morse CR., Laposata M., Fatty acid ethyl esters in the blood as markers for ethanol intake, *JAMA*, 9;276(14):1152-6, 1996.
78. Auwärter V., Sporkert F., Hartwig S., Pragst F., Vater H., Diefenbacher A., Fatty acid ethyl esters in hair as markers of alcohol consumption. Segmental hair analysis of alcoholics, social drinkers, and teetotalers, *Clin. Chem.*, 47(12):2114-23, 2001.
79. Pragst F., Auwaerter V., Sporkert F., Spiegel K., Analysis of FAEE in hair as possible markers of chronically elevated alcohol consumption by headspace solid-phase-microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), *Forensic Sci. Int.*, 1-13:3095, 2001.
80. Pragst F., Yegles M., Determination of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in hair: a promising way for retrospective detection of alcohol abuse during pregnancy? *Ther. Drug Monit.*, 30(2):255-63, 2008.
81. Wurst FM., Alexson S., Wolfersdorf M., Bechtel G., Forster S., Alling C., Aradóttir S., Jachau K., Huber P., Allen JP., Auwärter V., Pragst F., Concentration of fatty acid ethyl esters in hair of alcoholics: comparison to other biological state markers and self reported-ethanol intake, *Alcohol*, 39(1):33-8, 2004.
82. Hartwig S., Auwärter V., Pragst F., Effect of hair care and hair cosmetics on the concentrations of fatty acid ethyl esters in hair as markers of chronically elevated alcohol consumption, *Forensic Sci. Int.*, 131(2-3):90-7, 2003.
83. De Giovanni N., Donadio G., Chiarotti M., Ethanol contamination leads to Fatty acid ethyl esters in hair samples, *J. Anal. Toxicol.*, 32(2):156-9, 2008.
84. Helander A., Beck O., Ethyl sulfate: a metabolite of ethanol in humans and a potential biomarker of acute alcohol intake, *J. Anal. Toxicol.*, 29(5):270-4, 2005.

85. Raftogianis RB., Wood TC., Weinshilboum RM., Human phenol sulfotransferases SULT1A2 and SULT1A1: genetic polymorphisms, allozyme properties, and human liver genotype-phenotype correlations, *Biochem. Pharmacol.*, 15;58(4):605-16, 1999.
86. Dresen S., Weinmann W., Wurst FM., Forensic confirmatory analysis of ethyl sulfate, a new marker for alcohol consumption, by liquid-chromatography electrospray ionization/tandem mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15(11):1644-8, 2004.
87. Santillan-Valverde MC., García-Garibay M., Biosynthesis of congeners during alcohol fermentation, *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 40(1-2):109-19, 1998.
88. Urban R., Liebhardt E., Spann W., Comparative studies on the concentrations of congeners of alcoholic beverages in stomach, blood and urine, *Beitr. Gerichtl. Med.*, 41:223-7, 1983.
89. Peters FT., Drummer OH., Musshoff F., Validation of new methods, *Forensic Sci. Int.*, 165:216-224, 2007.
90. Musshoff F., Madea B., New trends in hair analysis and scientific demands on validation and technical notes, *Forensic Sci. Int.*, 165:204-215, 2007.

TABLE DES MATIERES

I.	INTRODUCTION.....	9
II.	EPIDEMIOLOGIE DE L'ETHYLISME	11
II.1.	GENERALITES.....	11
II.2.	DEFINITIONS	11
II.3.	DOMMAGES SANITAIRES ET SOCIAUX ATTRIBUABLES A L'ALCOOL EN FRANCE	12
II.3.1.	<i>Dommages sanitaires engendrés par l'alcoolisme</i>	<i>12</i>
II.3.2.	<i>Evaluation de l'impact médico-social de l'éthylisme</i>	<i>15</i>
III.	INTERET TOXICOLOGIQUE DES CHEVEUX.....	18
III.1.	STRUCTURE DES CHEVEUX.....	18
III.2.	INCORPORATION DES XENOBIOTIQUES DANS LES CHEVEUX.....	22
III.3.	ANALYSE TOXICOLOGIQUE DES CHEVEUX.....	26
IV.	LES MARQUEURS BIOLOGIQUES DE L'ETHYLISME	28
IV.1.	GENERALITES.....	28
IV.2.	METABOLISME DE L'ETHANOL.....	29
IV.3.	MARQUEURS INDIRECTS DE L'ETHYLISME.....	32
IV.3.1.	<i>Gamma Glutamyl Transferase (GGT).....</i>	<i>32</i>
IV.3.2.	<i>Volume Globulaire Moyen (VGM).....</i>	<i>33</i>
IV.3.3.	<i>Alanine et Aspartate Amino Transferases (ASAT et ALAT).....</i>	<i>34</i>
IV.3.4.	<i>Transferrine déficiente en carbohydrates (CDT).....</i>	<i>35</i>
IV.4.	MARQUEURS DIRECTS DE L'ETHYLISME	39
IV.4.1.	<i>L'éthanol.....</i>	<i>39</i>
IV.4.2.	<i>L'Ethyl-Glucuronide (EtG).....</i>	<i>40</i>
IV.4.3.	<i>Les Ethyl-Ester d'Acides Gras (FAEE)</i>	<i>44</i>
IV.4.4.	<i>Autres marqueurs directs de l'éthylisme.....</i>	<i>45</i>
IV.4.4.1.	<i>L'Ethyl-sulfate</i>	<i>45</i>
IV.4.4.2.	<i>Les congénères de l'éthanol</i>	<i>46</i>
V.	MISE AU POINT DU DOSAGE DE L'ETHYL-GLUCURONIDE DANS LES CHEVEUX..	47
V.1.	MATERIELS ET METHODES	47
V.1.1.	<i>Matériels.....</i>	<i>47</i>
V.1.2.	<i>Procédure de décontamination et d'extraction des échantillons capillaires.....</i>	<i>47</i>
V.1.3.	<i>Système chromatographique et conditions analytiques.....</i>	<i>48</i>
V.1.4.	<i>Calibration et procédure de validation de la méthode analytique</i>	<i>50</i>
V.1.4.1.	<i>Préparation de la gamme de calibration pour le dosage de l'EtG.....</i>	<i>50</i>
V.1.4.2.	<i>Procédure de validation de la méthode analytique</i>	<i>51</i>
V.2.	VALIDATION DE LA TECHNIQUE ANALYTIQUE.....	52
VI.	MISE EN APPLICATION DU DOSAGE DE L'ETHYL-GLUCURONIDE DANS LES CHEVEUX AU C.H.U. DE LIMOGES	59
VI.1.	ETUDE PRELIMINAIRE.....	59
VI.1.1.	<i>Objectifs.....</i>	<i>59</i>
VI.1.2.	<i>Patients étudiés.....</i>	<i>59</i>
VI.1.3.	<i>Résultats.....</i>	<i>62</i>
VI.2.	EXEMPLE D'APPLICATION : CAS MEDICO-LEGAUX.....	65
VII.	DISCUSSION	67
VIII.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	69
IX.	BIBLIOGRAPHIE.....	70

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

BON A IMPRIMER N° 3336

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

LAMOUREUX Fabien – L’Ethyl-glucuronide, marqueur de l’éthylisme : mise au point du dosage dans les cheveux et applications – Thèse : Pharm. ; Limoges ; 2008.

RESUME : La détection de l’Ethyl- β -D-6-glucuronide (EtG), métabolite de phase II de l’éthanol présente un intérêt en clinique ainsi qu’en toxicologie médico-légale afin d’établir un diagnostic d’éthylisme. Nous présentons la mise au point d’une technique de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem destinée à la détection de ce marqueur biologique dans les cheveux : 30 mg de cheveux finement coupés et décontaminés ont été déposés sur des cartouches « graphite » d’extraction en phase solide après avoir été soumis aux ultrasons en milieu aqueux. La séparation chromatographique de l’EtG a été obtenue au moyen d’une colonne Uptisphere-3SI et sa détection a été effectuée en mode d’ionisation négatif. Notre technique analytique permet d’atteindre une limite de détection de 4 pg/mg, une limite de quantification de 10 pg/mg avec des courbes de calibration linéaires de 10 à 3000 pg/mg de cheveux. La répétabilité et la reproductibilité de cette technique sont acceptables avec une précision et un biais relatif toujours inférieurs à 20% dans la gamme de concentrations étudiées. Nous présentons également les résultats préliminaires de la mise en application de cette technique analytique : des prélèvements capillaires de 5 patients décédés pour lesquels un éthylisme chronique était documenté, de 12 patients éthyliques chroniques admis dans le service des Urgences du C.H.U. de Limoges et de 7 patients déclarant une consommation modérée de boissons alcoolisées ont été analysés. Les résultats obtenus suggèrent qu’une concentration ≥ 50 pg/mg permet d’établir un diagnostic d’éthylisme chronique avec une excellente spécificité. Des études complémentaires seront nécessaires pour déterminer des concentrations seuils. Compte tenu de la petite quantité de cheveux nécessaires au dosage de l’EtG, cette analyse pourra être réalisée en association aux tests effectués en routine dans les contextes médico-légaux, recherche de stupéfiants en particulier.

MOTS CLES : toxicologie médico-légale, éthyl-glucuronide, analyse capillaire, chromatographie liquide, spectrométrie de masse en tandem, extraction en phase solide.

ABSTRACT: The detection of Ethyl- β -D-6-glucuronide (EtG), a stable Phase II metabolite of ethanol, is of interest in both a clinical and forensic context with the aim of monitoring alcohol abuse. We present a validated liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method dedicated to EtG analysis in hair: 30 mg of a washed and cut hair sample were cleaned-up, after an ultrasonication step, with graphite solid phase extraction cartridges. Liquid chromatography was then performed using an Uptisphere-3SI Column and the detection was operated in the negative ion mode for detection. The method exhibits a detection limit of 4 pg/mg, a quantification limit of 10 pg/mg and the calibration curves were linear from 10 to 3000 pg/mg. Intra- and inter assay precision standard deviation and relative bias were less than 20% over the calibrating range. The method was applied to several hair samples taken from 4 fatalities with documented excessive alcohol consumption habits, 12 known alcoholics according to physicians of the emergency unit and 7 social drinkers. The observed results suggest that a cut-off value of 50 pg/mg can be related to a heavy alcohol consumption without risk of false positive results. In spite of the need of further studies to definitively clarify the cut-off value choice, this assay could be routinely added to usual drug of abuse investigations in hair owing to the very low quantity of hair sample required for the assay.

KEYWORDS: forensic toxicology, ethyl-glucuronide, hair analyse, liquid chromatography, tandem mass spectrometry, solid phase extraction.

JURY

Monsieur le Professeur Gérard LACHATRE PRESIDENT
Madame le Docteur Marie-Françoise DREYFUSS. JUGE
Madame le Docteur Christine VALLEJO JUGE
Monsieur le Docteur Jean-Michel GAULIER, DIRECTEUR
Monsieur François-Ludovic SAUVAGE, MEMBRE INVITE