

UNIVERSITE DE LIMOGES  
FACULTE DE PHARMACIE

Année universitaire 2011 – 2012

Dosage de l'éthylglucuronide dans les cheveux : optimisation  
analytique d'une méthode et application à des cheveux  
d'abstinents

**THESE**

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

*Présentée et soutenue publiquement le 15 juin 2012 à Limoges*

par

**Victor FLORANTY**

*Né le 24/05/1987*

**Examineurs de la Thèse**

M. le Pr Gérard LACHATRE

M. le Dr Patrick TROUILLAS, Maitre de conférences

M. le Dr Jean-michel GAULIER, Praticien Hospitalier

M. le Dr Laurent IMBERT, Assistant hospitalo-Universitaire

PRESIDENT

JUGE

DIRECTEUR DE THESE

MEMBRE INVITE



UNIVERSITE DE LIMOGES  
FACULTE DE PHARMACIE

Année universitaire 2011 – 2012

Dosage de l'éthylglucuronide dans les cheveux : optimisation  
analytique d'une méthode et application à des cheveux  
d'abstinents

**THESE**

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

*Présentée et soutenue publiquement le 15 juin 2012 à Limoges*

par

**Victor FLORANTY**

*né le 24/05/1987*

**Examineurs de la Thèse**

M. le Pr Gérard LACHATRE

M. le Dr Patrick TROUILLAS, Maitre de conférences

M. le Dr Jean-michel GAULIER, Praticien Hospitalier

M. le Dr Laurent IMBERT, Assistant hospitalo-Universitaire

PRESIDENT

JUGE

DIRECTEUR DE THESE

MEMBRE INVITE

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**

1<sup>er</sup> VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences

2<sup>ème</sup> VICE-DOYEN : Monsieur Serge **BATTU**, Maître de Conférences

**PROFESSEURS** :

<b>BENEYTOUT</b> Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>BOTINEAU</b> Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE
<b>BROSSARD</b> Claude	PHARMACOTECHNIE
<b>BUXERAUD</b> Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>CARDOT</b> Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>CHULIA</b> Albert	PHARMACOGNOSIE
<b>CHULIA</b> Dominique	PHARMACOTECHNIE
<b>DELAGE</b> Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
<b>DESMOULIERE</b> Alexis	PHYSIOLOGIE
<b>DREYFUSS</b> Gilles IMMUNOLOGIE	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-
<b>DUROUX</b> Jean-Luc INFORMATIQUE	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET
<b>LOUDART</b> Nicole	PHARMACOLOGIE
<b>ROUSSEAU</b> Annick	BIOSTATISTIQUE

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES  
DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :**

**LACHATRE** Gérard

TOXICOLOGIE

**MOESCH** Christian  
ENVIRONNEMENT

HYGIENE HYDROLOGIE

**ROGEZ** Sylvie

BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE

**MAITRES DE CONFERENCES :**

**BASLY** Jean-Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

**BATTU** Serge  
BROMATOLOGIE

CHIMIE ANALYTIQUE ET

**BEAUBRUN-GIRY** Karine

PHARMACOTECHNIE

**BILLET** Fabrice

PHYSIOLOGIE

**CALLISTE** Claude  
INFORMATIQUE

BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET

**CLEDAT** Dominique

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

**COMBY** Francis

CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

**COURTIOUX** Bertrand

PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE

**DELEBASSEE** Sylvie  
IMMUNOLOGIE

MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-

**DEMIOT** Claire-Elise

PHARMACOLOGIE

**FAGNERE** Catherine

CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

**FROISSARD** Didier

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

**JAMBUT** Anne-Catherine

CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

**LABROUSSE** Pascal

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

**LEGER** David

BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

**LIAGRE** Bertrand

BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

**LOTFI** Hayat

TOXICOLOGIE

**MARION-THORE** Sandrine

CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

**MARRE-FOURNIER** Françoise

BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

**MILLOT** Marion

PHARMACOGNOSIE

**MOREAU** Jeanne  
IMMUNOLOGIE

MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-

**POUGET** Christelle

CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

**SIMON** Alain

CHIMIE GENERALE ET MINERALE

**TROUILLAS** Patrick  
INFORMATIQUE

BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET

**VIANA** Marylène

PHARMACOTECHNIE

**VIGNOLES** Philippe  
INFORMATIQUE

BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET

**PROFESSEUR CERTIFIE :**

**MARBOUTY** Jean-Michel

ANGLAIS

**ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES  
PHARMACEUTIQUES :**

**IMBERT** Laurent

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

## **REMERCIEMENTS :**

Je remercie toutes les personnes qui ont pu m'aider dans la réalisation de cette thèse, en particulier : Jean Michel Gaulier, Julien Morichon et Magalie Mercerole.

# **SOMMAIRE**

Introduction : .....	1
L'éthylisme : .....	3
Epidémiologie de l'éthylisme : .....	5
Marqueurs biologiques de l'éthylisme : .....	8
A. Généralités .....	8
B. Pharmacocinétique de l'éthanol .....	8
1) Absorption et distribution .....	8
2) Métabolisme .....	9
C. Les marqueurs biologiques .....	11
1) Les marqueurs indirects .....	11
- Les transaminases	
- La gamma glutamyl transférase	
- Le volume globulaire moyen	
- La transferrine déficiente en carbohydate	
2) Les marqueurs directs .....	13
- L'éthanol	
- L'éthylsulfate	
- Les esters d'acide gras et d'éthanol	
- Le phosphatidyléthanol	
- L'éthylglucuronide	
D. L'éthylglucuronide .....	16
1) Pharmacocinétique et métabolisme .....	17
2) Différentes méthodes d'analyse dans le cheveu .....	19
3) Dosage et applications de l'éthylglucuronide dans les autres matrices .....	21
4) Interprétation des concentrations capillaires et urinaires de l'éthylglucuronide ...	21
<b>Physiologie du cheveu .....</b>	<b>23</b>
A) Anatomie du cheveu .....	23
- La tige	
- Le bulbe	
- Les glandes annexes	
B) Cycle pileux .....	26
<b>Incorporation des drogues dans les cheveux .....</b>	<b>28</b>
A) L'absorption par les cellules matricielles .....	28
B) La fixation des molécules après kératinisation .....	29
C) Interactions entre la mélanine et les drogues .....	29
D) Biotransformations pouvant s'effectuer dans le cheveu .....	30
E) Autres voies d'incorporation dans le cheveu .....	30
F) Elimination des substances du cheveu .....	30

G) Intérêt toxicologique du cheveu .....	32
<b>Méthodes de dosage de l'éthylglucuronide .....</b>	<b>33</b>
A) Méthode d'analyse avec extraction solide .....	33
1) Principe général du dosage .....	33
2) Mode opératoire .....	33
3) Phase analytique .....	36
B) Méthode d'extraction sans extraction solide .....	38
<b>Résultats .....</b>	<b>39</b>
A) Optimisation de la chromatographie .....	39
B) Essai d'extraction par le méthanol et sans SPE .....	44
C) Résultats obtenus chez les patients abstinents .....	46
1) Recherche de la limite de quantification .....	47
2) Recherche de la limite de détection .....	48
3) Résultats de l'étude chez les patients abstinents .....	51
<b>Syndrome d'alcoolisation fœtale et les perspectives du dosage de l'éthylglucuronide ...</b>	<b>53</b>
A) Lésion et conséquences de la prise éthanol aux cours de la grossesse sur le développement fœtal du cerveau .....	54
1) Désordres observés chez les individus atteints de SAF .....	54
2) Pouvoir tératogène de l'éthanol sur les structures cérébrales .....	55
B) Marqueurs biologiques permettant de caractériser le SAF .....	56
1) Principe du dosage des esters d'acide gras et d'éthanol dans le méconium et les cheveux .....	57
2) Recherche de l'éthylglucuronide dans le méconium et les cheveux de nouveaux nés .....	58
<b>Conclusion .....</b>	<b>60</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>61</b>

# Introduction

En France et dans toutes les sociétés occidentales, l'éthanol est la « drogue » la plus consommée. Depuis un certain nombre d'années, la consommation d'éthanol est toutefois en baisse en France. En effet, on a vu une diminution de la consommation journalière de vin, au profit cependant d'une consommation plus occasionnelle, avec une tendance à l'augmentation des doses prises.

L'éthanol est métabolisé au niveau du foie. Il produit plusieurs métabolites dont l'éthylglucuronide. Cette substance fait partie des marqueurs qualifiés de « directs » de l'alcoolisation. En effet, il est produit par glucuroconjugaison directe de l'éthanol. Bien entendu, il n'est pas le principal métabolite de l'éthanol qui est généralement métabolisé par oxydation en acétaldéhyde, et en acide acétique. L'éthylglucuronide est un métabolite intéressant, car son dosage dans l'urine et le sang permet d'augmenter la fenêtre de détection de la prise de boissons alcoolisées. Le dosage dans le cheveu permet de suivre l'histoire de la consommation d'éthanol. En effet à chaque prise d'éthanol, l'éthylglucuronide se fixe dans le cheveu. Cette propriété est intéressante dans le domaine de la toxicologie pour faire la preuve d'une consommation chronique. L'éthylglucuronide peut être utilisé en pratique : en médecine légale, pour faire la preuve de l'abstinence ou de la consommation chronique, dans la restitution de permis de conduire, en néonatalogie, dans le syndrome d'alcoolisation fœtale. Ces mesures d'éthylglucuronide dans les cheveux demandent une grande sensibilité car les concentrations à mesurer sont de l'ordre du pg/mg ; dans le Service de toxicologie du centre hospitalier universitaire de Limoges, nous utilisons la chromatographie liquide couplée avec un spectromètre de masse en tandem.

Mon travail se divise en deux parties. Une partie théorique incluant quelques généralités sur l'alcoolisme, les marqueurs biologiques de la consommation d'éthanol, l'éthylglucuronide, la physiologie du cheveu, l'incorporation des drogues dans le cheveu. La seconde partie est

consacrée au dosage de l'éthylglucuronide dans les cheveux de patients abstinents afin d'observer les concentrations d'éthylglucuronide présente dans cette population. Pour ce travail personnel, la méthode analytique qui existait précédemment a été optimisée sur un instrument analytique plus puissant. Un consensus semble se dégager dans les différents laboratoires qui dosent l'éthylglucuronide avec un « cut off » caractérisant l'abstinence à 7 pg/mg [53], et l'enjeu de ce développement a été de diminuer la limite de quantification de la méthode analytique en dessous de ce seuil. En parallèle nous avons testé l'efficacité d'une nouvelle méthode d'extraction, en éliminant la phase d'extraction sur support solide.

# L'éthylisme

L'éthylisme se caractérise par une consommation répétée et abusive d'éthanol. L'organisation mondiale de la santé (OMS) nous 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* ». On retrouve cette maladie dans le chapitre V de la classification de l'OMS, elle fait partie des troubles mentaux et comportementaux dus aux substances psychoactives (F10-F19).

On considère que la consommation d'éthanol à risque, c'est-à-dire qui ne présente pas de risques majeurs pour la santé à court terme mais qui est susceptible d'en entraîner à moyen et long terme, commence à partir de cinq verres standards (environ, dix grammes d'éthanol) par jour chez les hommes, et quatre verres chez les femmes. Dans le cadre de la consommation occasionnelle, la conduite à risque commence à plus de quatre verres par occasion. A la suite de la consommation à risque, vient la consommation nocive, c'est-à-dire qu'il existe des méfaits pour le buveur sur le plan de la santé (psychique et physique), ainsi que des problèmes sociaux. Le sujet à ce stade ne présente pas de dépendance, mais une telle consommation peut entraîner des lésions graves. Enfin la dépendance, n'est pas définie par le rythme des prises, mais plutôt par un ensemble de symptômes qui sont : la dépendance physique et la dépendance psychique. La dépendance physique est caractérisée par un besoin d'éthanol pour assurer l'homéostasie de l'organisme. Elle s'explique par la tolérance qui est une adaptation du métabolisme du patient à l'éthanol. La tolérance vise à diminuer les effets de l'éthanol: elle explique par ailleurs en partie l'augmentation progressive des doses chez l'éthylique. La dépendance physique se manifeste cliniquement par l'apparition d'un syndrome de sevrage à l'arrêt de l'éthanol. La dépendance psychique est le fait d'avoir une envie irrésistible de consommer de l'éthanol [1, 2].

Du point de vue épidémiologique en France, on considère, que 20% de la population a un usage à risque, c'est-à-dire plus de 5 verres par jours [3]. L'éthylisme est responsable de beaucoup d'accidents du travail et de la route. La France a longtemps été le premier pays

consommateur d'éthanol dans le monde, mais depuis les années 1960 cette consommation est en constante diminution. Ceci ne veut pas dire que les français diminuent leurs problèmes avec l'éthanol, mais cela traduit plutôt un changement dans le mode de consommation. Autrefois la consommation était quotidienne, surtout à base de vin. Maintenant, l'apparition de nouveaux comportements, surtout chez les adolescents avec « la biture express ou binge drinking », induit une consommation moins importante sur la durée, mais tout aussi malfaisante pour la santé. Les personnes âgées ne sont pas en reste car on constate parfois une augmentation de consommation après 65 ans qui est souvent due à la solitude. La consommation actuelle se base sur la recherche d'une ivresse. Ainsi en 2006, 14,4% des français avouaient avoir été ivres dans les douze mois précédents. On considère en France qu'un million de personnes seraient alcoolodépendantes, et dix millions de personnes ont une consommation excessive ou à risque. Cela entraîne l'apparition de morbidité dans la population. On sait que la prise quotidienne de moins de 20 gramme n'augmente pas le risque d'apparition de maladies liées à l'éthanol. Mais chez la femme, la prise de plus de 10 g d'éthanol augmenterait le risque de cancers mammaires. On sait que les risques commencent à augmenter généralement pour des doses allant de 20 à 50g. Il est décrit dans ce cas des cirrhoses, des troubles cardio-vasculaires avec augmentation du risque trombo-embolique et d'AVC (accident vasculaire cérébral). Quand la consommation dépasse les 50 g d'éthanol, aux risques déjà énoncés, s'ajoute le risque de cancer des voies aéro-digestives qui est multiplié par deux par rapport à la population normale. Ce risque croit fortement avec l'augmentation de la consommation. Il existe également des complications psychiatriques graves : ainsi 9% des hommes et 2,5% des femmes présenteraient des troubles psychiatriques au cours de leur vie liés à l'éthanol. Dans le cas d'ivresse, on note une majoration des risques d'accidents de la route ou de la vie quotidienne.

Du point de vue de la mortalité, des chiffres de 1995 donnaient 46 000 morts induits par la prise d'éthanol. Mais ce chiffre ne prend en compte que la mortalité associée aux complications. On sait bien sûr que ce chiffre augmente fortement si on ajoute tous les accidents qui sont liés à la prise d'éthanol. Ainsi en 2005, 2 300 accidents de la circulation ont été attribués à une consommation excessive d'éthanol [3].

# Epidémiologie de l'éthylisme

L'éthanol est la substance psychoactive la plus utilisée en France, souvent sous forme de vin. Bien que la consommation diminue chaque année, on constate l'apparition de nouveau comportement surtout chez les jeunes. Avant, la consommation d'éthanol était quotidienne et essentiellement sous forme de vin. Effectivement, elle a fortement diminué en passant de 26 litres par habitants en 1960 à 12 litres par habitants en 2005. La diminution de consommation s'est surtout faite au dépend du vin, alors que la consommation de bière et de spiritueux est stable. Quant à l'alcool fort, il est en augmentation [4]. Maintenant la consommation devient plus occasionnelle, mais en plus grande quantité. L'alcoolisation a des conséquences sanitaires graves sur la population. Ainsi beaucoup de décès sont imputables directement ou indirectement à la consommation d'éthanol. En 2002 on a recensé 22 000 décès dus à une consommation régulière et abusive d'éthanol [3]. Sur le plan mondial, c'est sur le continent Européen que l'on consomme le plus d'éthanol. Mais c'est aussi le continent qui produit le plus de boissons alcoolisées avec environ un quart des boissons alcoolisées mondiales, et la moitié de la production de vin.

Sur le plan de la consommation, on constate également une tendance à la diminution dans les pays où elle était forte, et une tendance à l'augmentation dans les pays où l'on buvait peu. Ce phénomène contribue à une « harmonisation » de la consommation moyenne Européenne à environ 11 litres par adulte et par an. Environ 58 millions d'européens ont une consommation d'éthanol supérieure à 40 g/jour pour les hommes, et 20 g/jour pour les femmes, c'est-à-dire environ 15 % de la population. On considère que 23 millions d'Européens sont dépendants à l'éthanol [4]. Dans de grandes études, comme ELAES portant sur 40 000 personnes, qui ont été menée aux Etats unis, les résultats nous donnent un aperçu de la dépendance alcoolique dans les pays industrialisés. Elle concernerait 13,3 % de la population. Environ 20% des buveurs seraient dépendants selon les critères du DSM IV (Diagnostic and Statistical Manual). Cette étude montre également une prédominance masculine pour l'usage (78% versus 55%) et la dépendance (18,6% versus 8,4%). Il existe des inégalités sociodémographiques : les conduites addictives sont plus fréquentes chez les personnes divorcées ou non mariées (environ 3 fois plus), chez les personnes à faibles

revenus (environ 2,2 fois plus que la population moyenne). L'usage simple, selon cette étude, serait plus fréquent dans les milieux les moins à risques c'est-à-dire les mariés, les haut revenus et les urbains [5].

En ce qui concerne les jeunes, il existe une tendance au *binge drinking*, qui est une ingestion d'éthanol sur une courte durée (environ cinq verres en moins de deux heures) dans le but de trouver l'ivresse. Cette pratique débute souvent à l'adolescence vers 12 à 13 ans et s'intensifie après le baccalauréat. Ainsi les 18 -25 ans représentent plus de la moitié des « buveurs express ». Cette pratique est toujours associée à un contexte festif ou à des rites initiatiques (bizutage). Il semblerait que l'exclusion scolaire et le chômage des jeunes favorisent ce genre de comportement. Le passage à la vie universitaire est également un facteur d'augmentation de cette pratique. On sait que les parents défaillants ou éthyliques constituent un facteur de risque supplémentaire. Les adeptes de ce type de consommation recherchent plutôt l'amusement et la désinhibition, que l'anxiolyse. Ceci marque une grande différence avec le profil type de l'éthylique jeune qui présente souvent une comorbidité psychiatrique.

Sur le plan des conséquences sur la santé de ce type de consommation, il n'existe pas de corrélation avec des troubles métaboliques (augmentation des triglycérides et du LDL cholestérol). Mais certains auteurs mentionnent une corrélation avec l'artériosclérose qui impliquerait probablement les médiateurs de l'inflammation. Un grand nombre de malaises avec chute serait dus à ce type de consommation [6].

En ce qui concerne le Limousin, la région rentre dans l'ensemble dans la moyenne nationale avec toutefois des particularités qui sont dues essentiellement à la situation démographique avec un taux élevé de personnes âgées, et géographique avec 40% de la population en zone rurale. Le taux de décès par éthylisme et cirrhose est plus élevé que la moyenne des régions (0,59 pour 1000 contre 0,39 pour la moyenne nationale). Chez les jeunes la consommation est à peu près dans la moyenne, mais les ivresses aiguës semblent plus fréquentes que dans le reste de la France [7].

En conclusion, on peut retenir de ces différentes études que l'Europe est le continent où l'on consomme le plus d'éthanol à cause de l'usage traditionnel. La France est le pays où l'on produit le plus de boissons alcoolisées, conséquence d'une tradition vigneronne très forte. Sur le plan de la consommation par habitants la France se classe au sixième rang mondial, avec un changement des comportements. On s'aperçoit, surtout chez les jeunes d'une tendance à la prise moins fréquente, mais en plus grande quantité, appelé « binge drinking » comme c'est le cas dans les pays Anglo-Saxons et du nord de l'Europe.

# Marqueurs biologiques de l'éthylisme

## A) Généralités

L'intérêt de l'utilisation de marqueurs biologiques de l'éthylisme est de caractériser l'état de la consommation de boissons alcoolisées du patient, et en particulier l'état d'éthylisme chronique. On peut utiliser ces marqueurs dans le cadre de suivi d'abstinence, comme pour la restitution de permis de conduire, mais également en médecine légale, ou simplement en médecine classique ou psychiatrique.

Le diagnostic de l'éthylisme présente plusieurs aspects. Pour ce qui est de la partie biologique, il existe plusieurs marqueurs. Ils ont chacun des spécificités propres. Selon le mode de consommation, certains seront plus pertinents que d'autres. La classification des marqueurs biologiques distingue deux types de marqueurs : les marqueurs directs, et les marqueurs indirects. Les marqueurs directs sont l'éthanol lui-même ou un produit du métabolisme de l'éthanol, tel que l'éthylglucuronide. Les marqueurs indirects sont des modifications de facteurs biologiques qui sont induits par la consommation chronique d'éthanol : on peut citer l'activité plasmatique de certaines enzymes hépatiques qui augmentent en cas d'éthylisme, telles que la gamma glutamyl transférase.

## B) Pharmacocinétique de l'éthanol

### 1) Absorption et distribution

L'éthanol est absorbé dans l'estomac (environ 20% de la quantité absorbé) par diffusion passive, et dans le duodénum (80% de la dose ingérée). La vitesse de résorption va dépendre de plusieurs paramètres, mais essentiellement de la concentration en éthanol de la boisson et de la vitesse de vidange gastrique. L'éthanol se distribue bien dans tous les organes du fait de son hydrosolubilité ; son volume de distribution sera fonction de l'hydratation du sujet. Il ne se lie pas aux protéines plasmatiques [8].

## 2) Métabolisme

Le métabolisme de l'éthanol est essentiellement oxydatif. Le métabolite majeur est l'acétaldéhyde. Environ 95 à 98% de l'éthanol est métabolisé en acétaldéhyde, le reste est éliminé sous forme inchangée dans les urines, par voie pulmonaire, ou sudorale. L'éthanol est oxydé par deux voies principales qui font intervenir deux enzymes différentes : l'alcooldeshydrogénase, ou le Microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) qui fait intervenir les cytochromes P450 (CYP2E1) [9]. Il existe aussi des métabolites mineurs comme l'éthylsulfate, les esters éthyliques d'acides gras (FAEE), le phosphatidylethanol et l'éthylglucuronide [10].

L'alcooldéshydrogénase est une enzyme cytosolique et mitochondriale présente dans les hépatocytes. Elle présente une forte affinité pour l'éthanol, mais elle est très vite saturée ( $K_m=1\mu\text{mol/L}$ ) ; son cofacteur est le NAD. Il existe plusieurs iso-formes, situées sur le chromosome 4. En revanche, le métabolisme par le MEOS présente une plus faible affinité, mais une capacité de métabolisme beaucoup plus importante, ce qui en fait une voie métabolique majeure lors d'une éthanolémie supérieure à 0,5 g/L. Cette enzyme est d'origine microsomale ; son cofacteur est le NADPH. Elle peut être induite par la consommation prolongée d'éthanol. L'inconvénient essentiel de l'activation de cette enzyme est la production en grande quantité de radicaux libres.

L'acétaldéhyde est ensuite transformé en acétate par une aldéhyde-déshydrogénase (ALDH) qui est une enzyme mitochondriale. Cette enzyme présente une affinité très importante pour l'acétaldéhyde ; il en existe une vingtaine d'iso-formes. Une faible activité de cette enzyme explique l'intolérance à l'alcool chez certaines personnes, car l'acétaldéhyde est toxique, et dans ce cas, il s'accumule.

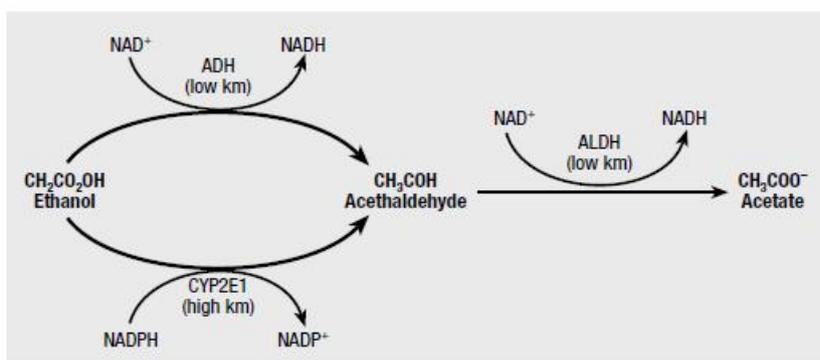


Fig. 1 | Pathways of ethanol metabolism in the liver. ALDH=acetaldehyde dehydrogenase;  $\text{NAD}^+$ =nicotinamide adenine dinucleotide;  $\text{NADH}$ =reduced  $\text{NAD}^+$ ;  $\text{NADP}^+$ =nicotinamide adenine dinucleotide phosphate;  $\text{NADPH}$ =reduced  $\text{NADP}^+$ ; ADH = alcohol dehydrogenase; CYP2E1 = cytochrome P-450 isoform 2E1.

## Schéma des différentes voies d'oxydation de l'éthanol [11]

Il existe aussi des métabolites mineurs comme l'éthylglucuronide, l'éthylsulfate, le phosphatidyléthanol et les esters d'acides gras et d'éthanol (FAEE). L'éthylglucuronide (etG) est le produit de la réaction d'un acide glucuronique avec l'éthanol, tout ceci catalysé par une UDP-glucuronyl-transférase. L'éthylsulfate provient de la sulfoconjugaison de l'éthanol, et l'enzyme permettant ce métabolisme est une sulfotransférase. Le phosphatidylethanol est un métabolite qui se forme au niveau des membranes cellulaires en contact avec l'éthanol, sous l'action de la phospholipase D [12].

Enfin les esters d'acides gras et d'éthanol sont formés grâce à l'action de FAEE-synthétases et acylCoA-Ethanol-O-Acyltransférase [13].

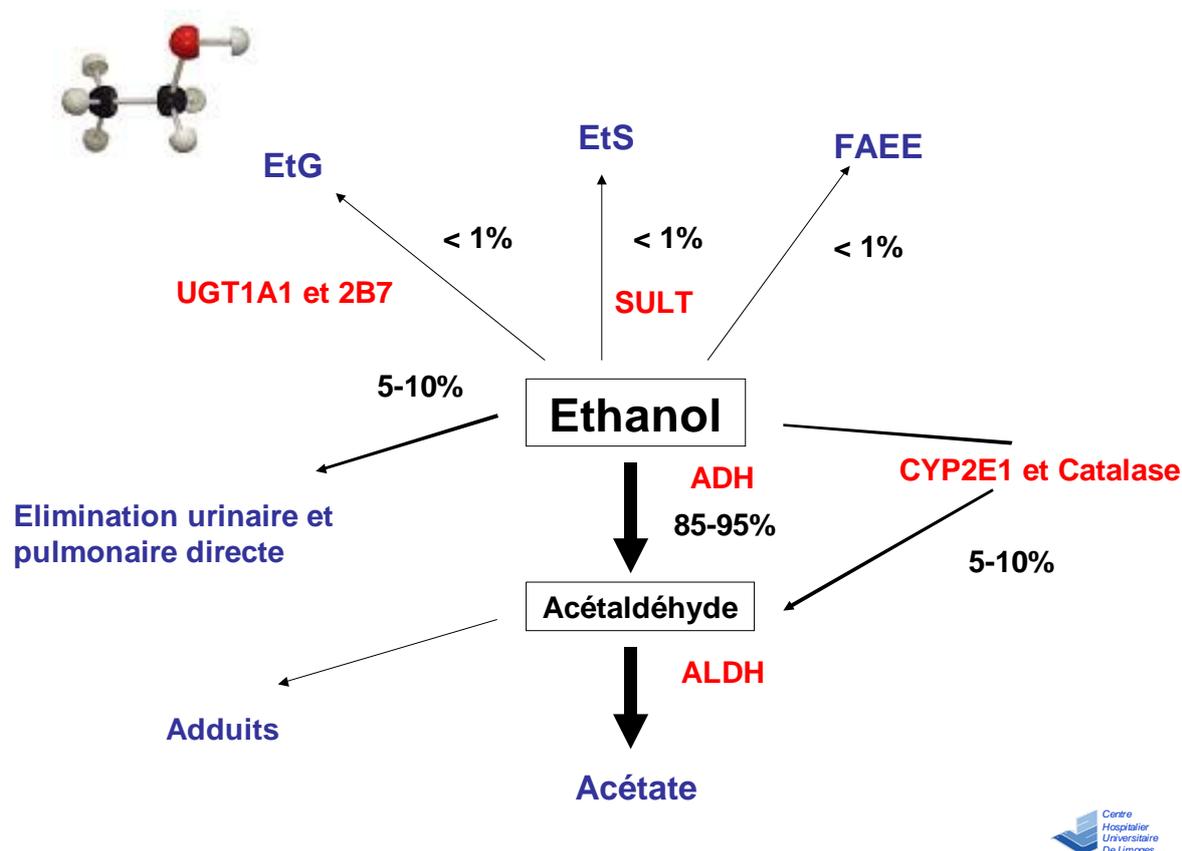


Schéma représentant les voies métaboliques de l'éthanol en cas de prise modérée

## C) Les marqueurs biologiques

### 1) Les marqueurs indirects

Les marqueurs indirects sont des marqueurs biochimiques qui devraient être à un niveau anormal en cas de consommation chronique d'alcool. Chacun de ces marqueurs a une spécificité et un délai de normalisation différent. On sait que l'éthanol induit des lésions cellulaires qui se traduisent par l'augmentation de certaines protéines enzymatiques du sang. On observe une augmentation des activités plasmatiques d'enzymes hépatiques : ALAT (alanine-amino transférase), ASAT (aspartate amino transférase) et gammaGT (gamma glutamyl transférase). Il existe également un défaut de sialylation de la transferrine : les CDT (carbohydre déficient transferrine). Enfin la consommation chronique entraîne une augmentation du VGM (volume globulaire moyen). Pour avoir le moins de risque possible de faux positif, on combine souvent ces différents marqueurs biochimiques, en sachant que les CDT sont de loin le meilleur marqueur de consommation alcoolique avec une spécificité de 70%.

#### - Les transaminases

Il existe deux types de transaminases : ALAT (alanine-amino transférase), ASAT (aspartate amino transférase). L'augmentation sérique de l'activité de ces enzymes traduit une souffrance des hépatocytes par l'altération de leurs membranes cellulaires. Mais cette augmentation est peu spécifique à l'alcoolisme, car ces enzymes sont aussi révélatrices de maladies hépatiques non alcooliques.

ASAT est le marqueur enzymatique intéressant dans la recherche de l'alcoolisme. Il existe deux iso-formes majoritaires de l'ASAT : l'ASAT m qui est mitochondriale et l'ASAT c qui est cytoplasmique. L'ASAT m est majoritaire elle représente de l'ordre de 80% de l'activité des ASAT totale ; l'ASAT c et les autres, environ 20% [10]. Dans la pathologie alcoolique on observe une forte augmentation de l'ASAT m. Ceci est expliqué par la toxicité directe de l'éthanol sur les mitochondries. On peut utiliser pour le diagnostic le rapport ASAT m/ASAT

total : ce rapport se normalise après quinze jours d'arrêt de consommation, ce qui en fait un marqueur intéressant de suivi d'abstinence [14].

L'ALAT est une enzyme qui est moins spécifique de l'alcoolisme que l'ASAT. On utilise le rapport ASAT / ALAT pour discriminer les maladies hépatiques alcooliques des non alcooliques. On sait que dans 90 % des cas, un rapport supérieur à 2 sera en faveur d'une maladie hépatique alcoolique [15].

- La gamma glutamyl-transférase

La gamma glutamyl-tranférase ( $\gamma$ GT) est une enzyme spécifique des canaux biliaires. Elle marque une certaine souffrance hépatobiliaire, mais son augmentation sérique peut être liée à d'autres atteintes organiques comme les maladies rénales, l'infarctus du myocarde, les pancréatites ou encore la consommation de certains médicaments. Dans l'alcoolisme la  $\gamma$ GT est un marqueur cependant intéressant à utiliser, car sa demi-vie est de vingt jours. Elle est utilisée comme marqueur de désintoxication alcoolique, surtout dans la restitution de permis de conduire. En général, du fait de la faible sensibilité comme marqueur d'alcoolisme (30 à 50%), elle est utilisée en combinaison avec d'autres marqueurs [15].

- Volume globulaire moyen

Le volume globulaire moyen (VGM) est un paramètre hématologique qui augmente en cas d'alcoolisme. En effet, on constate la présence d'une anémie macrocytaire avec des valeurs normales en vitamine B12 et en folates. La cause de cette anémie n'est pas encore tout à fait élucidée, mais il semblerait que l'éthanol ait une toxicité directe sur les cellules de la moelle osseuse [16]. Le VGM a une faible sensibilité dans la détection de l'alcoolisme (environ 50%), mais on sait qu'il est plus spécifique que la  $\gamma$ GT. Traditionnellement on utilise ces deux marqueurs en combinaison. Le VGM est un paramètre qui ne permet pas de discerner les buveurs intermittents, mais seulement les buveurs chroniques car la toxicité globale s'exerce au long cours [15].

- Transferrine déficiente en carbohydate

La transferrine est une glycoprotéine destinée à transporter le fer dans le plasma : sa synthèse est hépatique. Cette protéine est dans sa forme majoritaire liée à quatre acides sialiques (n=4). Dans le cas de consommation régulière d'éthanol, on observe un défaut de sialylation de la transferrine (n=0, 1, 2) et la présence de ce qu'on appelle les CDT (carbohydate deficient transferin). En général, la valeur normale des CDT est de moins de 2 %, mais on sait qu'elles peuvent également augmenter dans des maladies autres que l'alcoolisme comme par exemple : dans les carences martiales, la grossesse, le syndrome de déficience en carbohydate des protéines, certaines maladies hépatiques non alcooliques. La spécificité de ce marqueur est moyenne d'environ 70 %. La demi-vie de la transferrine étant de 17 jours, c'est un marqueur qui va augmenter à moyen terme. Il sera donc un bon marqueur d'alcoolisme chronique. Ce marqueur va augmenter dès que les doses d'éthanol vont dépasser 50g par jour.

Les méthodes analytiques de dosage des CDT font appel à la chromatographie liquide, l'électrophorèse capillaire, ou l'immunochimie [10].

## 2) Les marqueurs directs

- L'éthanol

Le premier des marqueurs que l'on peut doser est l'éthanol. Il peut être dosé dans de nombreux liquides biologiques : urine, sang, liquide gastrique. Il est très utile dans le cadre d'accidents de la route ou de contrôles routiers, mais il est plus difficile à utiliser en *post-mortem* car les microorganismes peuvent le produire rapidement (entéro-bactéries et levures du genre *Candida*). Du point de vue judiciaire, seules les méthodes de chromatographie en phase gazeuse et la distillation et oxydoréduction selon Cordebard ont valeur légales. L'éthanol peut toutefois également être dosé par méthode enzymatique. La méthode de choix est donc la chromatographie en phase gazeuse couplée avec un détecteur

à ionisation de flamme, qui a l'avantage d'être une méthode peu coûteuse et peu consommatrice de sang.

- L'éthylsulfate

L'éthylsulfate est un métabolite qui est moins utilisé que l'éthylglucuronide. Il est produit au niveau du foie par les sulfotransférases SULT 1A1 et 1A2 [17]. Du point de vue pharmacocinétique l'éthylsulfate est peu différent de l'éthylglucuronide, avec un pic plasmatique de l'ordre de 5 heures après l'ingestion d'éthanol. Il commence à apparaître dans les urines environ une heure après la consommation d'éthanol, et reste détectable pendant une trentaine d'heures [18]. Il peut être dosé par chromatographie liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Il n'existe pas de dosage immunologique. S'il ne présente pas plus d'intérêt que l'éthylglucuronide, ce métabolite est également extrêmement stable car il a été retrouvé lors d'une exhumation 27 ans après le décès [10]. Pour certains auteurs, il pourrait renseigner sur l'exposition transdermique quand il est dosé dans les urines en combinaison avec l'éthylglucuronide. L'éthylsulfate ne dépasserait dans ce cas jamais le seuil de 100 ng/L, alors que l'éthylglucuronide peut être produit à plus de 2000 ng/L, en cas d'utilisation intensive de solution hydroalcoolique. [19].

- Les esters d'acides gras et d'éthanol

Les esters d'acides gras et d'éthanol constituent un groupe de substances qui présente un intérêt de dosage dans les cheveux. En effet, ces esters sont détectables à partir de 24 heures après la consommation d'alcool éthylique. Ils peuvent être utilisés en combinaison avec l'éthylglucuronide pour évaluer une consommation chronique. Mais c'est le dosage dans le méconium qui présente probablement le plus grand intérêt pour évaluer l'alcoolisation du fœtus lors de la grossesse. La méthode de dosage fait appel à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse [10].

- Le phosphatidyléthanol

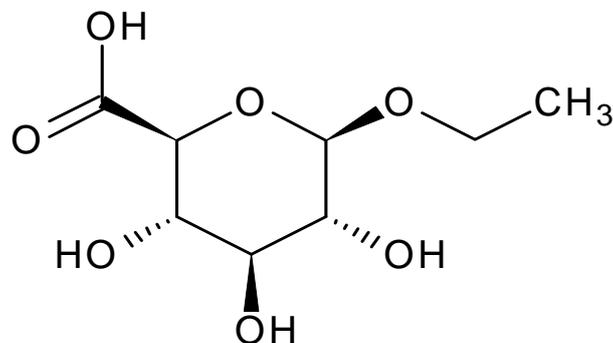
Le phosphatidyléthanol est un phospholipide formé par l'action de la phospholipase D en présence d'éthanol. C'est un marqueur très spécifique de la consommation d'éthanol qui se normalise en quinze jours après l'arrêt de la consommation chronique. Il est utilisé dans certains pays comme la Suède, dans les autopsies pour déterminer la consommation excessive d'éthanol. Le dosage est délicat, et fait appel à la chromatographie liquide [10].

- L'éthylglucuronide

L'éthylglucuronide est un métabolite de l'éthanol très hydrophile (ethyl- $\beta$ -D-6-glucuronide). Il est formé dans le foie par conjugaison entre une acide glucuronique et de l'éthanol à l'aide d'une enzyme, l'UDP-glucuronosyltransferase. Il présente l'intérêt d'élargir la fenêtre de détection de l'éthanol quand on le dose dans le sang ou dans l'urine. Il peut également être dosé dans les cheveux où il constitue alors un marqueur d'alcoolisme chronique. Il a été découvert en 1901, chez l'animal. Mais ce n'est que bien plus tard qu'on a pu le doser chez l'homme avec l'apparition de la chromatographie en phase gazeuse. Le chapitre suivant lui est consacré.

## D) L'éthylglucuronide

Le métabolisme des alcools secondaires et tertiaires par le foie est connu depuis 1885. La glucuroconjugaison des alcools primaires a été découverte en 1901 avec la découverte de l'éthylglucuronide. Il a fallu environ cinquante ans pour qu'en 1952 Kamil isole l'éthylglucuronide de l'urine de lapin. En 1967, l'éthylglucuronide a été isolé dans de l'urine humaine par Jaakonmaki. Cette étude a été confirmée par plusieurs autres entre 1973 et 1983, en utilisant des méthodes de chromatographie en phase gazeuse. C'est dans les années 90 avec le perfectionnement des appareils de détection que l'éthylglucuronide a été pressenti pour devenir un marqueur incontournable de la consommation chronique d'éthanol. De nos jours, on est capable de déterminer avec ce marqueur si la personne est alcoolique, mais des controverses sont actuellement en cours sur la discrimination des buveurs sociaux. Il se pourrait que l'éthylglucuronide soit également un marqueur du syndrome d'alcoolisation fœtale [20].

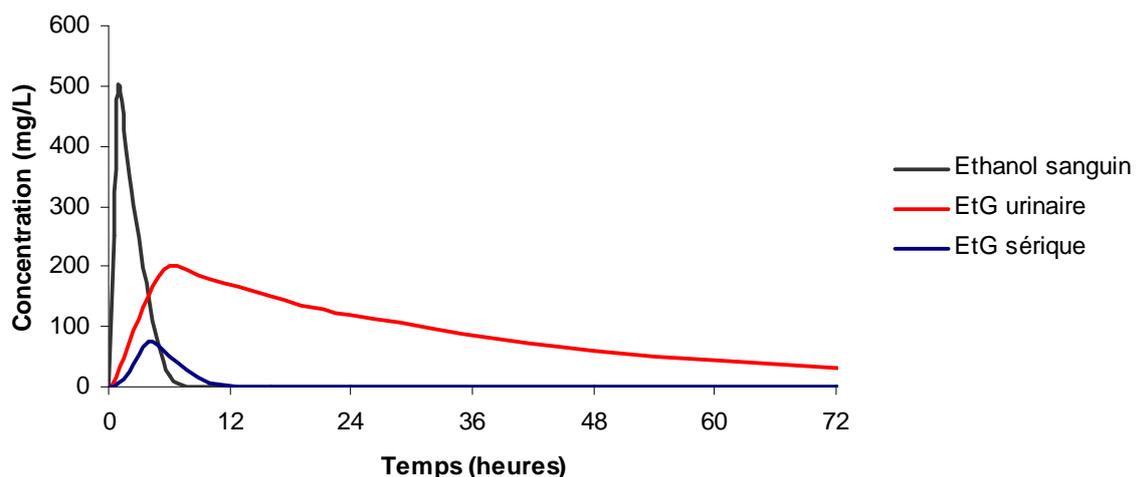


Structure chimique de l'éthylglucuronide

## 1) Pharmacocinétique et métabolisme

### - Pharmacocinétique

Dans le sang la concentration maximale est obtenue en environ 4 heures, et la durée de détection est d'environ 10 heures. Il est difficile de corréler une dose ingérée d'éthanol avec la concentration sanguine d'éthylglucuronide.. Pour ce qui est des urines, la concentration maximale sera de plusieurs dizaines de milligrammes par litres, avec 0,5% de la dose d'éthanol éliminée sous forme d'éthylglucuronide [21]. L'urine est donc la matrice la plus intéressante pour le dosage de celui-ci. Du côté de la détection, la fenêtre de détection se situe de trente à quarante heures voire jusqu'à 80 heures, et parfois jusqu'à 100 heures selon la dose d'éthanol prise. On peut également le doser dans les cheveux : il représente ici l'histoire de la consommation de boissons alcoolisées. On pense qu'il est incorporé aux cheveux essentiellement par la sueur et le sébum [22], car il est fortement hydrophile et passe donc difficilement à travers les membranes plasmiques des cellules matricielles. Il est utilisé dans cette matrice comme marqueur d'alcoolisme chronique.



Courbe comparant la concentration en fonction du temps : de l'éthanol sanguin, de l'Etg urinaire, de l'Etg sanguin.

- Métabolisme et élimination

L'éthylglucuronide est produit au niveau du foie par un métabolisme de phase II. Il s'agit d'une réaction de glucuroconjugaison entre l'éthanol et un acide glucuronique qui est catalysée par une enzyme l'UDP-glucuronosyltransferase. Le métabolisme de l'éthanol par cette voie est mineur de l'ordre de 0,5% de l'éthanol ingéré [20]. L'étude sur les microsomes humains a montré que presque toutes les isoformes de l'enzyme peuvent produire de l'éthylglucuronide à l'exception des isoformes UGT1A1 et 1A6. Les deux isoformes les plus actives sont responsables de plus de 80 % du métabolisme microsomal : il s'agit de l' UGT2B7 et 1A9 (71.6% et 12.1%) [23]. Certains auteurs évoquent, une voie mineure de formation d'éthylglucuronide directement dans les cheveux par les cellules matricielles. Car elle possèdent l'équipement enzymatique nécessaire au métabolisme de phase II [24].

L'élimination de l'éthylglucuronide du sang se fait par la voie conventionnelle, c'est à dire par le rein. On le retrouve dans les urines où il peut être dégradé par des enzymes de la flore bactérienne (*Escherichia Coli*, *Klebsiella pneumoniae*) [25], surtout, lors de recherches *post-mortem* dans le cadre de la médecine légale. L'élimination du cheveu semble se faire par les soins d'hygiène capillaires habituels (shampoings) car certains auteurs ont constaté une diminution significative au cours de la pousse : c'est pourquoi il est préconisé de doser les segments les plus proches de la racine [26].

## 2) Différentes méthodes d'analyse dans les cheveux

Sur le plan analytique, beaucoup de techniques ont été utilisées comme la chromatographie sur couche mince, l'électrophorèse capillaire, l'immunochimie, la chromatographie liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, ou à la spectrométrie de masse en tandem. Ces dernières méthodes sont celles qui donnent les meilleurs résultats, c'est pourquoi elles sont les plus utilisées. La chromatographie gazeuse présente l'inconvénient de nécessiter une dérivation pour rendre la molécule volatile. On peut aussi utiliser pour le dosage dans les urines ou le sérum des méthodes immunologiques qui ont une sensibilité plus faible.

On constate que les méthodes de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem sont celles qui donnent les meilleurs résultats avec certains auteurs qui arrivent à des limites de quantification qui avoisinent les 3 pg/mg. Les limites inférieures de détection sont de l'ordre du pg/mg. Ceci permet de ne plus se cantonner au diagnostic de l'éthylisme chronique, mais permet d'envisager de « prouver l'abstinence ».

A l'heure actuelle, les différents laboratoires se sont entendus sur une valeur limite d'éthylglucuronide dans les cheveux. On admet qu'en dessous de 7 pg /mg, le patient peut être abstinent. Au dessus de 30 pg/mg, il s'agit d'une consommation chronique d'éthanol [27]. Le tableau suivant répertorie les différentes méthodes de dosages utilisées pour la recherche de l'éthylglucuronide dans les cheveux.

Auteur / année	Prise d'essai	Présentation de l'échantillon	Solvant de décontamination	Méthode d'extraction	Dérivatif	Mode de détection	LDQ/LDD pg/mg
Alt (2000) [28]	100 mg	Environ 1mm	Eau	SPE US	BSTFA	CG-SM	
Skopp (2002) [29]	50 mg	Poudre	MeOH / eau	US / filtration	MSTFA	CG-SM	2200/5000
Janda (2002) [30]	100 mg	Petite pièces	MeOH / acétone	SPE US		CL-SM/SM	51/102
Jurado (2004)[31]	100 mg	Environ 1mm	Eau / acétone	US eau	PFPA	CG-SM	25/50
Yegles (2004)[32]	30 mg	Poudre	n Heptane	SPE / US	PFPA/ PFPOH	CG-SM	2/4
Morini((2006) [33]	100 mg	1-2 mm	Dichlorométhane/méthanol	Eau +US		LC-SM/SM	2/3
Paul 2008 [34]	10 mg		Eau	SPE +US	BSTFA	GC-SM/SM	
Karbouche(2009) [35]	30 mg	Poudre	Eau	SPE +US	PFPA	GC-SM/SM	3/8,4
Lamoureux (2009) [36]	30 mg	1-2 mm	Eau / dichlorométhane	SPE +US		CL-SM/SM	4/10
Bendroth(2008)	100 mg		Dichlorométhane/méthanol	eau US		CL-SM/SM	0,9/2,5
Alvarez (2009) [37]	100 mg	1mm	Tween 80 /eau	n Hexane/eau micro-onde	BSTFA	CG-SM	100/300
Conccheiro (2009) [38]	100mg	Poudre	Dichlorométhane/méthanol	Eau US filtration		LC-SM/SM	25/50

US : ultrason  
SPE : solid phase extraction  
CG : chromatographie gazeuse

SM : spectrométrie de masse  
LDD : limite de détection  
LDQ : limite de quantification

CL : chromatographie liquide  
BSTFA : N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide  
MSTFA : N-méthyl-N- trifluoroacétamide

PFPA : perfluoropropionique anhydride  
PFPOH : pentafluoro-1-propanol

Tableau récapitulatif des différentes méthodes de dosage de l'éthylglucuronide dans les cheveux.

### 3) Dosage et applications de l'éthylglucuronide dans les autres matrices

L'éthylglucuronide peut être dosé dans le sang et dans l'urine. S'il est dosé dans l'urine il peut augmenter la fenêtre de détection de l'éthanol jusqu'à 48 heures après la prise d'éthanol. Schloegl a essayé de doser l'éthylglucuronide dans la moelle osseuse, le foie, le muscle, le tissu graisseux. Les résultats sont concluants dans le foie et l'urine ; dans la moelle osseuse les concentrations sont en général plus faibles que dans le sang. La putréfaction des corps semble être un facteur de disparition rapide de l'éthylglucuronide [39]. A cause de cette dégradation, on a cherché à caractériser l'éthylglucuronide dans l'humeur vitrée, qui est un milieu où les dégradations bactériennes sont décalées dans le temps. Les valeurs seraient divisées par deux par rapport au sang [40]. Des études ont été faites dans la sueur pour démontrer que l'éthylglucuronide est excrété dans la sueur après une consommation d'éthanol. Les concentrations varient en fonction de la dose administrée d'éthanol : elles sont de l'ordre du microgramme par litre [41]. La sueur nous intéresse tout particulièrement car l'éthylglucuronide serait incorporé dans la matrice du cheveu essentiellement par cette voie [22]. Enfin certaines études ont eu pour but de rechercher l'éthylglucuronide dans la salive. Il est détectable dès deux heures après la prise d'éthanol, et comme dans les autres matrices, il est détectable bien après le pic plasmatique de l'éthanol (environ 14 heures) [42].

### 4) Interprétation des concentrations capillaires et urinaires de l'éthylglucuronide

Nous avons vu précédemment que l'éthylglucuronide était présent dans les urines environ 80 heures et parfois jusqu'à 100 heures [21]. Lorsqu'on détecte dans les urines de l'éthylglucuronide, cela caractérise la prise de boissons alcoolisées. Le problème qui se présente lors de l'interprétation des valeurs des concentrations d'éthylglucuronide, c'est que nous sommes exposés passivement à de l'éthanol dans notre environnement, comme par exemple dans les aliments, les solutions d'hygiène buccales, les médicaments. Cette exposition « accidentelle » à l'éthanol est potentiellement en mesure d'être à l'origine de

faux positifs. C'est pourquoi, la définition d'une valeur « cut off » a été indispensable. On sait qu'une concentration inférieure à 0,1 mg/L d'urines est en faveur d'une abstinence de consommation de boissons alcoolisées au cours des 2 derniers jours. Lorsque la concentration est située entre 0,1 et 1 mg/L, elle est difficilement interprétable car elle peut refléter une alcoolisation plusieurs jours avant le prélèvement urinaire et/ou un faible apport exogène d'éthanol, non pas par le biais de boissons alcoolisées, mais par des aliments ou l'utilisation de produits d'hygiène buccale. Mais quand la concentration est supérieure à 1,0 mg/L d'urines, il s'agit du seuil de positivité, c'est en faveur d'une consommation de boissons alcoolisées au cours des 2 derniers jours **[43 à 52]**.

Sur le plan du dosage capillaire d'éthylglucuronide, les valeurs limites ont longtemps été discutées. Effectivement, la communauté scientifique a été obligée d'introduire des valeurs « cut off », afin d'uniformiser les résultats obtenus entre les différents laboratoires dans le monde. Les concentrations suivantes font l'objet à l'heure actuelle d'un consensus. Une concentration capillaire inférieure à 7 pg/mg de cheveux pourrait être en faveur d'une abstinence. Lorsque la concentration capillaire est inférieure à 30 pg/mg, cela correspond au plus à une consommation occasionnelle et modérée de boissons alcoolisées. Enfin quand la concentration capillaire est supérieure à 30 pg/mg, elle traduit un éthyisme chronique, c'est-à-dire une consommation de plus de 60 grammes d'éthanol par jour, depuis plusieurs semaines (définition de l'OMS) **[53], [55], [27]**.

# Physiologie du cheveu

Le cheveu est un phanère qui est constitué d'un follicule pileux à l'intérieur du cuir chevelu et d'une partie aérienne à l'extérieur. Il est très riche en kératine et mélanine. La kératine lui confère une grande résistance physique, la mélanine lui donne sa coloration. La pousse du cheveu s'effectue en plusieurs phases de différentes longueurs qui durent environ 4 ans au total.

## A) Anatomie du cheveu

### - La tige

La tige aérienne du cheveu est composée de cellules fortement kératinisées qui se répartissent en trois couches concentriques : la cuticule, le cortex et la médula. La cuticule est la couche la plus externe, et on peut la diviser en deux parties exocuticule à l'extérieur et l'endocuticule à l'intérieur. Elle sert à protéger le cheveu contre les agressions physicochimiques extérieures. Elle est formée de 5 à 10 couches de cellules en forme de tuiles qui contiennent de nombreuses protéines. Le cortex est la couche qui donne au cheveu l'élasticité et la coloration. On y rencontre les mélanocytes qui sont responsable de la production de mélanine et de la coloration capillaire. Les cellules du cortex ont une forme de galet et se regroupent en filaments : elles sont très riches en kératine. Enfin, la médula est formé de cellules plus lâches où on ne retrouve pas de kératine.

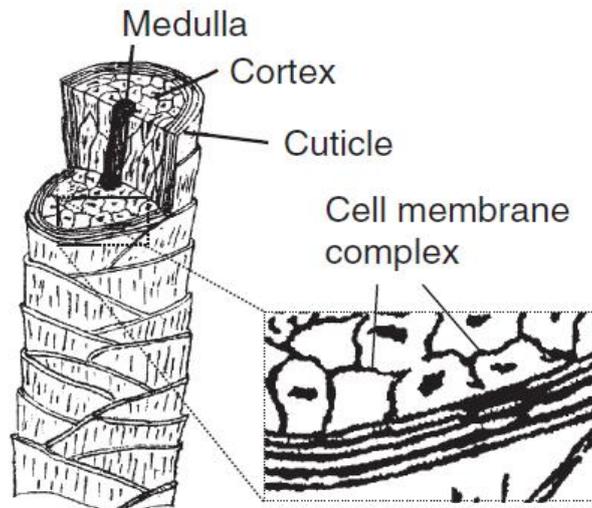


Figure représentant la structure du cheveu

- Le bulbe

Le bulbe pileux est la partie intérieure du cheveu où est formé le cheveu. Il est composé de la papille qui concentre les terminaisons nerveuses, les vaisseaux lymphatiques et sanguins. Cette zone est entourée de trois gaines concentriques : la gaine épithéliale interne, la gaine épithéliale externe et la gaine du tissu conjonctif. La zone la plus profonde est le lieu où se multiplient les cellules germinatives (cellules matricielles) qui donnent des kératinocytes, et qui forment les trois couches concentriques du cheveu. Ces cellules germinatives ont un cycle cellulaire qui est parmi les plus rapides du corps humain. C'est la forte vascularisation du follicule pileux qui apporte les éléments nécessaires à la croissance du cheveu. Il s'agit également du lieu où s'incorporent le plus les xénobiotiques. Cette zone matricielle contient également un autre type cellulaire, les mélanocytes qui sont responsables de la coloration des cheveux. Ils produisent les mélanosomes qui sont incorporés au kératinocytes par des dendrites qui ont la faculté de traverser la membrane plasmique [55].

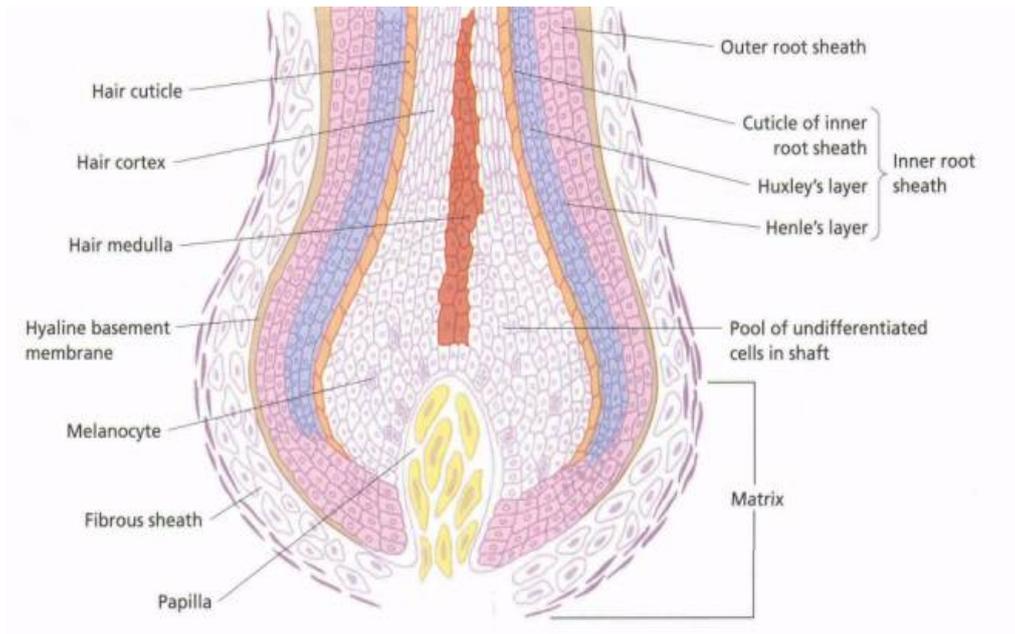


Schéma du bulbe

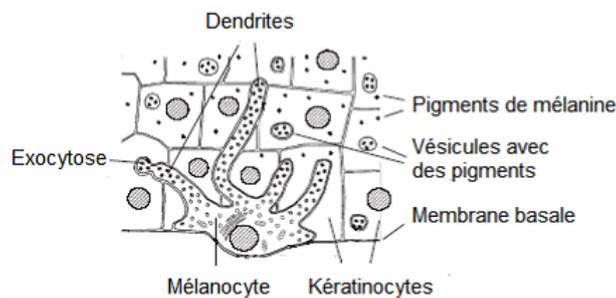
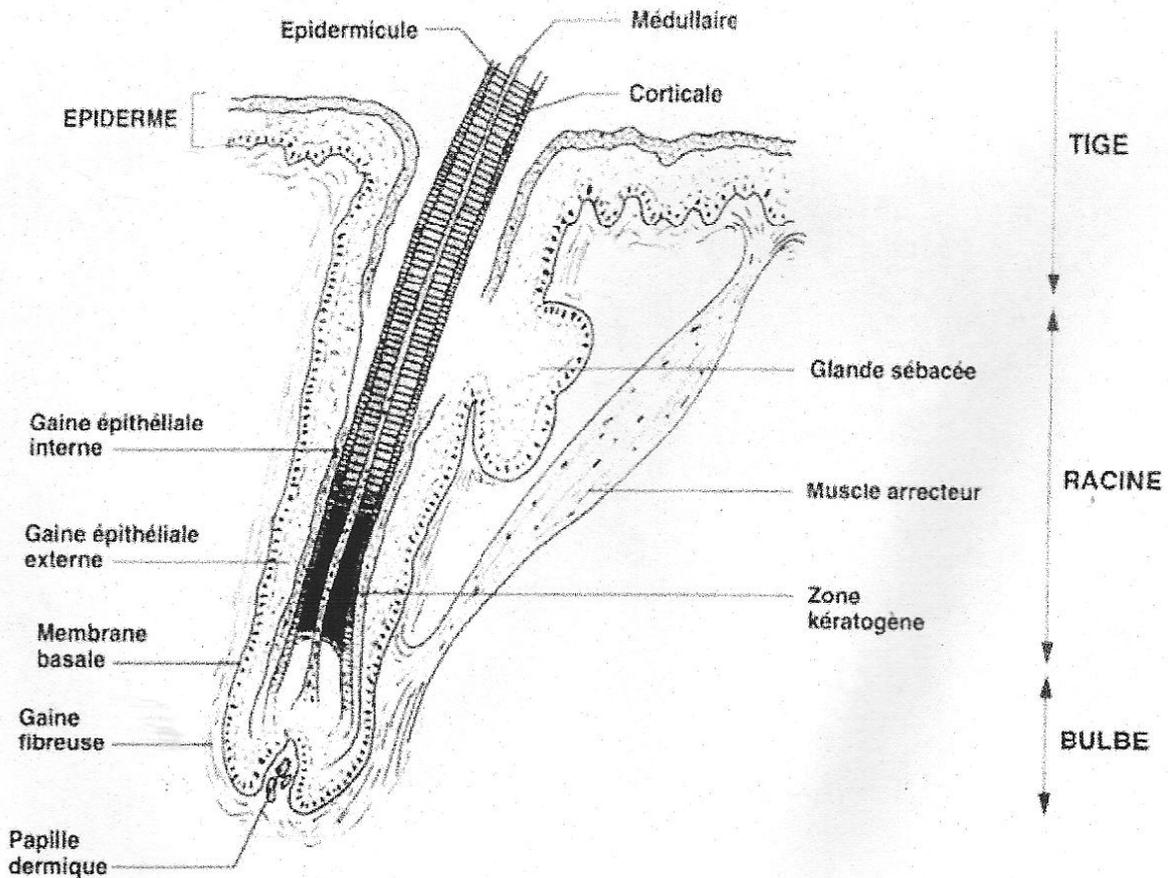


Schéma d'incorporation des mélanosomes

- Glandes et annexes

Les glandes sébacées sécrètent le sébum qui est un liquide qui a pour but de lubrifier le poil : elles sont placées entre la papille et la partie aérienne du cheveu. On constate la présence d'un muscle horripilateur qui est souvent actionné par l'action du froid, ou d'un stress intense.



Représentation schématique du follicule pileux et des glandes annexes

## B) Cycle pilaire

On distingue trois grandes phases dans le cycle pilaire, et la durée est très variable d'une phase à l'autre. La première de ces phases est la phase anagène, vient ensuite la phase catagène, et enfin la phase telogène. La phase anagène peut être découpée en six périodes différentes :

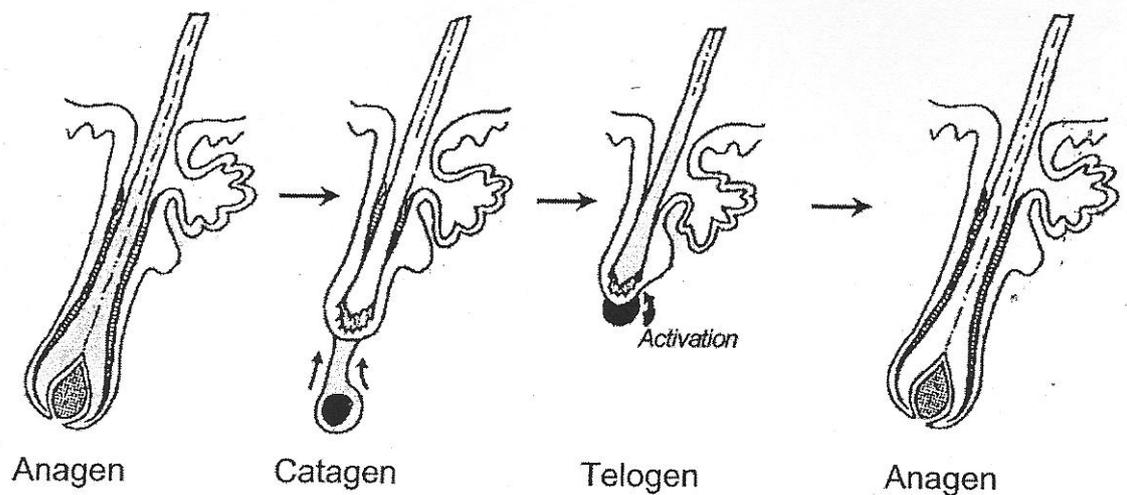
- La phase anagène 1 est le point de départ de la régénération du follicule pileux à partir des cellules souches de kératinocytes peu différenciés
- La phase anagène 2 se caractérise par un enveloppement de la papille dermique par les cellules matricielles
- La phase anagène 3 est caractérisée par une forte croissance mitotique des cellules matricielles et le début de la différenciation des mélanocytes

- En phase anagène 4, le cheveu commence sa croissance environ jusqu'au niveau de la glande sébacée. C'est également le début d'une forte angiogénèse au niveau de la papille.

- Lors de la phase anagène 5, le cheveu va sortir du follicule pileux.

- La phase anagène 6 est la phase de croissance visible du cheveu. Elle est la plus longue et elle dure jusqu'à l'épuisement des cellules matricielles (environ 2 à 5 ans). Lors de la phase de croissance, les cellules du cheveu subissent des étapes de maturation. Les cellules souches de kératinocytes sont, au début de leur maturation, riches en organites. Ils les perdent au fur et à mesure de l'expression des gènes de la kératine. Ces kératinocytes suivant leur localisation, vont donner des cellules médullaires, corticales et cuticulaires.

Ensuite vient la phase catagène, elle correspond à l'arrêt des la multiplication des cellules matricielles avec une mort par apoptose. Elle dure environ deux semaines. La dernière phase, la phase télogène, est celle qui précède la chute : le cheveu est « mort », elle dure environ deux mois. On considère que 85% des cheveux sont en phase anagène et 15% en phase catagène et télogène [56].



Différentes phases du cycle pileux

# Incorporation des drogues dans les cheveux

Les drogues consommées et les métabolites comme l'éthylglucuronide peuvent être retrouvées dans les cheveux par plusieurs mécanismes. Le plus connu d'entre eux est la diffusion passive à partir du sang vers les cellules matricielles. Mais on connaît beaucoup d'autres voies mineures qui ont leur importance dans la quantité de substances incorporées. Comme dans tout système ouvert, on constate une certaine élimination au cours de la pousse des cheveux [26]. Mais la substance peut néanmoins être retrouvée et dosée s'il y a eu consommation. L'incorporation capillaire dépend de plusieurs facteurs physicochimiques et pharmacocinétiques de la drogue, mais également de facteurs individuels comme l'ethnie d'appartenance. En effet, les asiatiques ont des cheveux qui retiennent mieux les xénobiotiques que les caucasiens blonds.

## A) L'absorption des substances par les cellules matricielles

Les échanges entre le sang et le cheveu se font au niveau de la papille capillaire. La forte vascularisation à ce niveau permet en effet d'assurer la nutrition des cellules matricielles qui ont un cycle cellulaire parmi les plus rapides de l'organisme. Le passage des xénobiotiques du sang vers la cellule matricielle se fait par diffusion passive à travers la membrane plasmique selon un gradient de concentration. Cette diffusion dépend de plusieurs facteurs : les deux plus importants sont la liposolubilité et le poids moléculaire. Mais on sait également que le pKa et la configuration moléculaire de la substance sont très importants. Les caractéristiques pharmacocinétiques, comme le taux de liaison aux protéines plasmatiques, constituent également des facteurs qui influencent grandement ce type de transfert à travers les membranes biologiques. Les molécules lipophiles sont bien mieux incorporées dans les cellules matricielles car les membranes plasmiques sont composées de lipides. Un haut poids moléculaire est un frein au passage transmembranaire des substances. De plus, quand la molécule est de haut poids moléculaire, il existe plus de chance de présence de groupements hydrophiles qui freinent l'absorption. Le pKa de la

molécule est également une valeur essentielle, il détermine en effet l'équilibre sanguin entre la forme ionisée et non ionisée de la molécule. En sachant que seule la forme non ionisée sera capable de traverser la membrane plasmique des cellules matricielles. Quant au taux de liaison aux protéines plasmatiques de la drogue ou de la molécule recherchée, il joue un rôle important car le processus tend à diminuer la concentration plasmatique de la substance à analyser, et donc le passage dans les cellules matricielles par gradient de concentration [24].

## B) Fixation des molécules après la kératinisation

Durant la kératinisation les cellules matricielles subissent de profonds changements avec une déshydratation sévère et une destruction des organites cellulaires. On sait que la kératine offre aux molécules ionisées à pH 5 un large panel de sites de fixation. C'est pourquoi on observe que les molécules ionisées à pH 5 sont bien mieux fixées. Les autres molécules peuvent être éliminées au cours de cette phase car le gradient de concentration est en faveur de la sortie cellulaire [24].

## C) Les interactions entre la mélanine et les drogues

Les mélanocytes produisent la mélanine qui est contenue dans des mélanosomes. Ces mélanocytes sont des cellules bien différentes des kératinocytes. En effet, leurs membranes plasmiques ont une composition bien différente. Les mélanocytes ont un cytosol qui est à pH plutôt acide, ce qui favorise également l'accumulation des molécules basiques. De plus, l'affinité des polymères de mélanine à l'égard des drogues crée un gradient de concentration en faveur de l'entrée dans la cellule. Par la suite, les mélanosomes produits par les mélanocytes sont incorporés dans les kératinocytes et vont migrer lors de la pousse longitudinale du cheveu. C'est pourquoi on constate de grandes différences entre les individus en fonction de la coloration des cheveux [24].

## D) Biotransformations pouvant s'effectuer dans le cheveu

On sait que les cellules capillaires sont pourvues d'équipements enzymatiques qui leur permettent de produire des métabolites. Les cellules matricielles avant leurs spécialisations en kératinocytes sont capables de produire des métabolites de phase 1, où entrent en jeu des réactions d'oxydations, réductions, hydrolyses. Ces cellules sont également capables de produire des réactions de phase 2 de conjugaison. Toutes ces réactions ont lieu dans le réticulum endoplasmique des cellules matricielles avant la disparition des organites induits par la différenciation en kératinocyte. Ceci nous intéresse dans le cadre de l'éthylglucuronide car il s'agit d'un métabolite de phase 2. Cette voie est très mineure, mais on peut imaginer qu'une infime partie de l'éthylglucuronide retrouvé dans les cheveux provient du métabolisme dans la cellule matricielle [24].

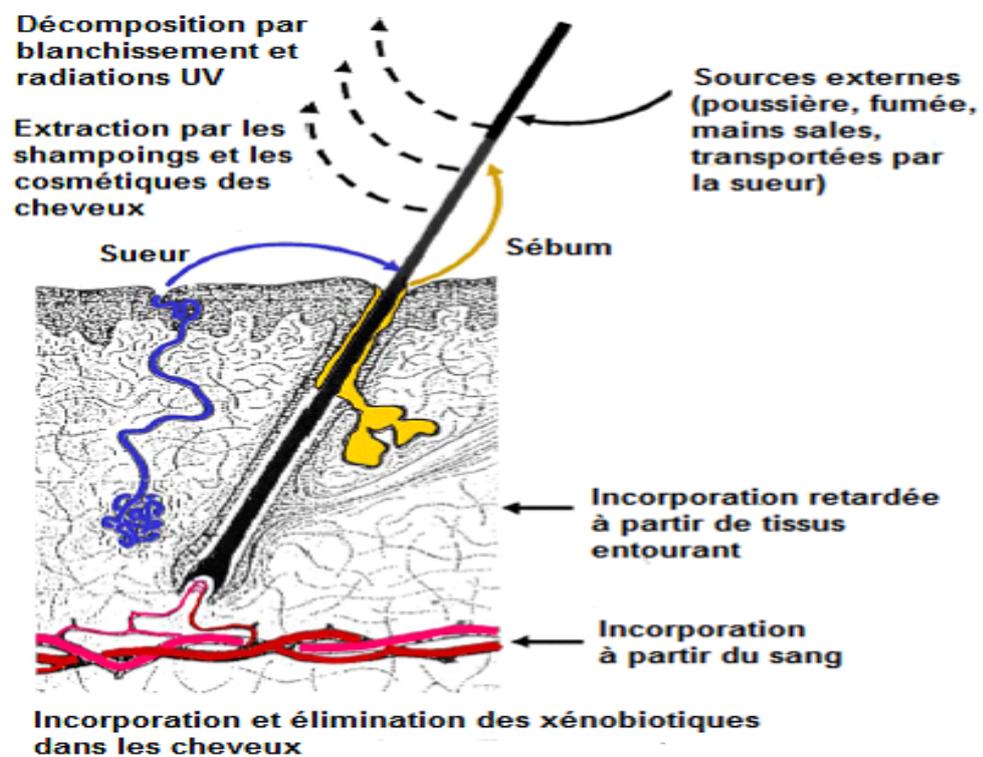
## E) Les autres voies d'incorporation dans le cheveu

Il existe d'autres voies mineures d'incorporation dans le cheveu. On peut citer la diffusion à travers les compartiments profonds de la peau : le derme et l'hypoderme. Mais le mécanisme le plus décrit est l'incorporation à partir du sébum et de la sueur. Il semblerait que l'éthylglucuronide soit incorporé au cheveu par cette voie [22]. En effet, ces deux liquides sont produits par des glandes qui ont un contact étroit avec le sang. D'autre part, on constate une incorporation passive par des contaminations extérieures (fumées, environnement) sans que la personne soit consommateur actif de la substance. Mais il s'agit à ce niveau de faibles quantités, qu'il est possible de discriminer des consommations actives, par l'établissement de seuils de positivité.

## F) L'élimination des substances du cheveu

L'élimination des drogues va dépendre du traitement que subissent les cheveux. On sait que les shampoings et les traitements capillaires diminuent la quantité d'analyte retrouvé dans les cheveux. Les conditions climatiques sont aussi un facteur de perte de substances (soleil, vent, pluie). Certaines substances sont peu stables dans le cheveu : il a été montré avec des

études segmentaires de la perte de substance au cours de la pousse. On se rend compte que les substances ionisées sont bien conservées lors de la pousse.



Représentation schématique des différentes voies d'incorporation dans le cheveu

Finalement on peut dire que la pharmacocinétique des xénobiotiques dans les cheveux ressemble grandement à ce que l'on peut observer dans les autres organes, avec une diffusion passive à partir du sang, un métabolisme possible de la substance et une élimination. [24]

## G) Intérêt toxicologique du cheveu

En toxicologie il est intéressant de pouvoir caractériser une consommation aiguë, ce que l'on peut faire avec par exemple une analyse dans le sang ou dans l'urine. Mais au bout d'un certain temps plus ou moins long suivant les caractéristiques pharmacocinétiques, les substances d'intérêt disparaissent de ces milieux. Le cheveu est différent des autres organes car il est isolé, les substances qui s'y trouvent incorporées ne sont pas éliminées de la même façon que dans les autres organes. C'est pourquoi on peut retrouver des substances dans les cheveux alors qu'elles ne sont plus présentes dans le corps. Il a un intérêt majeur en médecine légale car sa forte kératinisation permet une très bonne conservation. On peut détecter des substances jusqu'à plusieurs années après la mort du sujet, voire plusieurs siècles chez certains auteurs [57]. Mais ce qui nous intéresse le plus ici, c'est que le cheveu est un marqueur de consommation chronique. En prenant l'exemple de l'éthylglucuronide, le dosage de celui-ci dans les cheveux nous donne une idée de la consommation d'éthanol aux cours des derniers mois. Ceci est très intéressant pour faire la preuve de l'alcoolisme. Les dosages capillaires ont pris beaucoup d'essor lors des vingt dernières années avec l'apparition d'instruments de dosage de plus en plus sensibles, car en effet le dosage des xénobiotiques dans les cheveux nécessite cette sensibilité avec des quantités présentes de l'ordre du picogramme par milligramme de cheveux.

# Méthodes de dosages de l'éthylglucuronide et améliorations apportées

## A) Méthode d'analyse avec extraction solide

Avant mon arrivée dans le laboratoire de toxicologie du centre hospitalier universitaire de Limoges, il existait une méthode de dosage de l'éthylglucuronide dans les cheveux. Je vais décrire ici dans le détail la procédure de cette méthode de dosage, et indiquer les changements que j'ai pu y apporter. Ces modifications concernent principalement les conditions analytiques, la procédure d'extraction est restée la même, excepté lors du test d'une nouvelle extraction : extraction liquide-liquide, avec du méthanol.

### 1) Principe général du dosage

Les cheveux sont incubés sous ultrasons dans un milieu aqueux dans le but d'extraire l'éthylglucuronide du cheveu sans le dégrader. Une phase d'extraction sur un support solide (SPE) est nécessaire pour nettoyer et purifier les hydrolysats capillaires. L'éthylglucuronide est ensuite séparé des impuretés et détecté par un système de chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

### 2) Mode opératoire

#### Préparation des cheveux

La première étape consiste à laver les cheveux prélevés : pour cela on commence par faire un bain de 2 minutes dans de l'eau desionisée. L'étape suivante est le séchage de la mèche de cheveux avec un papier absorbant. On plonge ensuite la mèche de cheveu à analyser

dans du dichlorométhane et on sèche. Cette opération est renouvelée une fois. Cette étape de lavage permet d'éliminer les contaminations par le milieu extérieur du cheveu.

Après le nettoyage des cheveux, on réduit les cheveux en poudre à l'aide d'un ciseau et de pinces jusqu'à obtention d'une fine poudre constituée de segments d'une longueur inférieure à 1 mm.

### Phase pré-analytique

Cette phase commence avec la préparation des tubes : gamme de calibrage, échantillons de cheveux à analyser. Ensuite les cheveux subissent un traitement ultrasons. Enfin on extrait par SPE et on injecte dans le système chromatographique.

#### - Préparation des tubes

On prépare dans des tubes de 15 ml le mélange suivant :

Concentration (pg/mg)	Gamme de calibrage							Echantillon à analyser
	0	5	10	50	100	500	1000	
Cheveux sans ETG (mg)	30	30	30	30	30	30	30	
Cheveux à analyser (mg)								30
solution etg 1 mg/L (µL)							30	
solution etg 100µg/L (µL)					30	150		
solution etg 10µg/L (µL)			30	150				
solution etg D5 100µg/L (µL)		15						
Methanol (µL)	150	135	120		120		120	
Eau desionisé (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2

Toutes les solutions filles sont préparées à partir d'une solution mère d'éthylglucuronide et d'éthylglucuronide pentadeutééré à 1mg/L. Les solutions sont préparées dans le méthanol.

On mélange doucement les tubes, puis on incube deux heures sous ultrasons et à température ambiante.

#### - Extraction par SPE

L'extraction de l'échantillon se fait à l'aide d'un extracteur de type vacMaster, sur des cartouches SPE de 2ml (SPE Clean Screen, UCT, USA). Elle se passe en trois phases distinctes. La première phase est le conditionnement des cartouches. Dans un second temps on retient l'éthylglucuronide sur la cartouche. Enfin la troisième phase consiste à éluer l'éthylglucuronide.

La phase de conditionnement des cartouches commence par l'imprégnation de la cartouche avec 2 mL de mélange (méthanol + acide formique 1%) : on laisse imprégner 15 secondes puis on ouvre les vannes et on laisse couler par gravitation. On rajoute ensuite selon le même procédé 2 mL d'un mélange (eau + acide formique 1%). C'est ainsi que se termine la phase de conditionnement.

La phase de dépôt de l'échantillon commence par une centrifugation des tubes qui ont été incubés aux ultrasons (5 minutes à 3000 tours par minutes). Ensuite, on dépose tout le surnageant dans les cartouches d'extractions et on ouvre les robinets pour que les surnageants passent à travers la cartouche. En même temps, on remplit les tubes où il reste les cheveux avec 2 ml d'eau afin de s'assurer de ne pas laisser d'éthylglucuronide. On centrifuge et on dépose comme précédemment les 2 mL d'eau dans les cartouches. On laisse l'échantillon traverser la cartouche puis on sèche les cartouches 25 min en ouvrant le vide de l'extracteur.

L'étape suivante est l'élution de l'éthylglucuronide des cartouches d'extractions solides. Pour cela on utilise 2 mL du mélange (méthanol + acide formique 1%). Il faut penser au préalable à changer les tubes sous les cartouches (tubes de 10 mL). Ces tubes sont mis à évaporer dans un évaporateur sous courant d'azote, jusqu'à obtention d'un résidu sec.

Jusqu'à cette étape je n'ai rien changé à la méthode qui existait précédemment au laboratoire.

#### - Préparation de l'échantillon avant l'analyse chromatographique

Précédemment dans les tubes de 10 mL contenant l'extrait sec, on ajoutait 50 µL de phase de reprise d'un mélange (acétonitrile (95%)/ tampon acétate 5mM pH=6,8 (5%)). A ce niveau j'ai augmenté le volume de reprise à 70 µL d'un mélange (acétonitrile 90%/tampon acétate

5mM pH=4,8 10%) car avec 50 µl, le volume me semblait trop faible pour « décrocher » l'éthylglucuronide des parois du tube de 10 mL. La phase de reprise a été modifiée pour être en accord avec les nouvelles conditions chromatographiques. Ensuite, il faut impérativement vortexer les tubes pour « décrocher » l'extrait des parois du tube. Enfin, on transfère le liquide du tube de 10 mL à un « vial d'injection » muni d'un insert.

### 3) Phase analytique

C'est à ce niveau que j'ai changé certains paramètres, car la chromatographie nous donnait des résultats non optimisés, avec des pics chromatographiques larges et d'intensité faible. Je propose de comparer les deux méthodes à l'aide du tableau suivant.

Méthode	Phase de reprise de l'échantillon	Volume d'injection (µl)	Colonne	Solvant B	Solvant A	Pompe	Instrument	Débit µL/min
Initiale	Acetonitrile 95% /tampon acétate pH=6,8 (5%)	20	Interchrom Uptishere 3si	Acetonitrile 95% /tampon acétate pH=6,8 (5%)	Tampon acétate 5mM pH=6,8	Perkin elmer	API 2000	200
améliorée	Acetonitrile (90%) / tampon acétate pH4,8 (10%)	20	Interchrom Uptishere 3si	Acetonitrile avec 0,1% d'acide formique	Tampon acétate 5mM pH=4,8	Perkin elmer	API 3200	300

Le réglage du spectromètre de masse est fait à l'aide du logiciel analyst par infusion d'une solution à 10 mg/L. L'ionisation est faite par électrospray avec une source turboionspray. Les conditions de fonctionnement de cette source d'ionisation sont : une température de 400°C, une tension de d'ionisation de -5 kV et le gaz nébuliseur est de l'azote. La détection de l'éthylglucuronide est faite en mode Multiple Reaction Monitoring (MRM). Nous avons choisi deux transitions : une de quantification, une de confirmation. La transition de quantification

est :  $m/z=221$  pour l'etg et  $m/z=226$  pour Etg-D5, donne l'ion fils  $m/z=75$ . Celle de confirmation est:  $m/z=221$  ou  $m/z=226$ , donne l'ion fils  $m/z=85$ .

On utilise la colonne chromatographique Uptisphere-3Si, 100 x 2 mm, 3  $\mu\text{m}$  D.I. (Interchim, France), pour l'analyse chromatographique.

Par rapport à la méthode qui existait, j'ai modifié certains paramètres essentiels : le pH de la solution de la phase A et la composition de la phase B, le débit des pompes (de 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  à 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), et la phase de reprise des échantillons. (cf. résultats p 39)

La méthode ainsi optimisée nous a permis de rechercher une limite de détection et une limite de quantification plus basses. Ceci dans le but d'analyser des cheveux de patients abstinents.

## B) Méthodes sans extraction solide

Nous avons également testé un changement d'extraction qui était effectuée précédemment sur cartouches solides (SPE). Les différences entre les deux méthodes commencent lors de la préparation des tubes, avec l'incubation aux ultrasons qui se fait dans un mélange (méthanol + acide formique 1%) au lieu d'un milieu aqueux.

Concentration (pg/mg)	Gamme de calibrage							Echantillon à analyser
	0	5	10	50	100	500	1000	
Cheveux sans ETG (mg)	30	30	30	30	30	30	30	
Cheveux à analyser (mg)								30
solution etg 1 mg/L (µL)							30	
solution etg 100µg/L (µL)					30	150		
solution etg 10µg/L (µL)		15	30	150				
solution etg D5 100µg/L (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100
Méthanol/acide formique 1% (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2

Les tubes ainsi préparés sont mis à incuber aux ultrasons pendant deux heures. A la fin de l'incubation on centrifuge les échantillons cinq minutes à 3000 tours par minute. On récupère ensuite grâce à une pipette pasteur le surnageant, au dessus des cheveux en faisant attention à ne pas trop prendre de cheveux dans la pipette. Enfin, on évapore dans des tubes de 10 mL avec un évaporateur sous courant d'azote.

Quand les tubes sont sec on les reprend avec 70 µL de phase de reprise (mélange acetonitrile 90%/tampon acétate pH 4,8 10%).

# Résultats

Il existait, avant mes travaux, une méthode de dosages de l'éthylglucuronide, notamment utilisée pour les restitutions de permis de conduire après retrait, à la suite de récidive de contrôle routier positif à l'éthanol. La méthode utilisée pouvait détecter des patients alcooliques, car le cut-off décisionnel d'éthylglucuronide est élevé :  $> 30$  pg/mg. Mais, elle n'était pas du tout optimisée pour l'instrument que j'ai utilisé, l'API 3200 QTrap. Nous avons donc optimisé la méthode sur cet instrument plus puissant que celui utilisé précédemment (API 2000) en vue d'abaisser la limite de détection et de quantification, notamment en améliorant la chromatographie. L'objectif de cette optimisation est d'explorer la possibilité de discriminer les alcooliques sociaux des abstinents. En parallèle de l'optimisation nous avons testé une méthode d'extraction différente, qui n'a pas donné les résultats escomptés : les résultats obtenus sont malgré tout présentés ici.

Une fois que la première méthode a fonctionné correctement, nous avons analysé des cheveux de patients abstinents pour savoir à quelles concentrations d'éthylglucuronide ils se situaient. Ceci pour savoir si on pouvait envisager une valeur seuil caractérisant l'abstinence.

## A) Optimisation de la chromatographie

La méthode de chromatographie précédemment utilisée au laboratoire, n'a pas été satisfaisante quand on l'a transférée de l'API 2000 à l'API 3200 QTrap. Il est apparu des problèmes de chromatographie due à des changements de matériels, avec des pics qui n'étaient pas assez réguliers (dédoublément de pics, traînées, lignes de bases très larges). Ceci diminuait fortement les performances de la méthode.

L'optimisation de la méthode a commencé par le calcul du débit optimal de la colonne. On a trouvé un résultat de  $240 \mu\text{L}/\text{min}$  de débit optimal. Comme nous avons seulement le choix

entre 200 et 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Nous avons donc changé le débit en le passant de 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  à 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Ce qui nous paraît logique au vu de l'équation de Knox qui relie la hauteur de plateau théorique (efficacité) à la vitesse de la phase mobile.

Nous avons ensuite testé un autre solvant que l'acétonitrile, le méthanol.

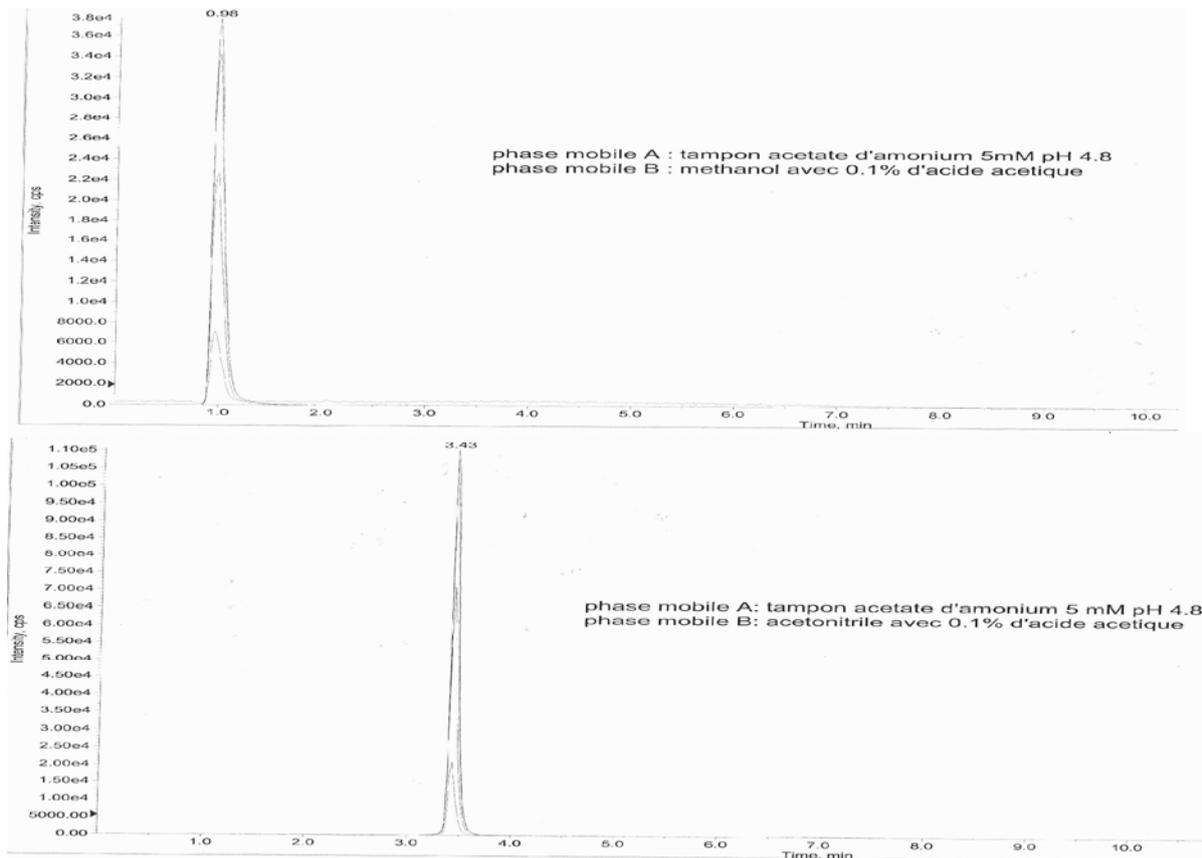


Figure représentant, en haut le pic chromatographique avec la phase mobile contenant du méthanol, en bas avec de l'acétonitrile

On constate qu'avec la phase mobile contenant du méthanol, la molécule n'est pas du tout retenue. Elle est détectée à une minute ce qui correspond au front de solvant. Ceci est dû au fait que l'éthylglucuronide est très soluble dans le méthanol, et il n'a donc pas eu d'affinité avec la phase stationnaire de la colonne chromatographique utilisée. Nous avons donc décidé de garder comme solvant l'acétonitrile, mais de changer le pH de la phase mobile. En effet à pH 6,8 on sait que les hydroxyles de l'éthylglucuronide sont proches de leur pKa. Il n'y a donc prédominance d'aucune des deux formes de la molécule. Au contraire à pH 4,8 on sait que la forme non ionisée est majoritaire. C'est sur la base de ce constat que nous avons

décidé de diminuer le pH. A partir de ce moment, les pics chromatographiques ont été plus fins.

Comme nous avons changé les phases mobiles, la phase de reprise des échantillons devait être changée : c'est ce qui a été fait dans les tests suivants. Trois pourcentages différents de phase de reprise du mélange acétonitrile/ tampon acétate d'ammonium (95/5 ; 90/10 ; 80/20) ont été testés. Entre les mélanges 90/10 et 95/5, il existe des différences minimes, mais on s'aperçoit que le pic commence à s'élargir lorsqu'on utilise un mélange 80/20. Nous avons choisi le pourcentage pour lequel le pic était le plus fin, celui qui correspond au mélange 90/10.

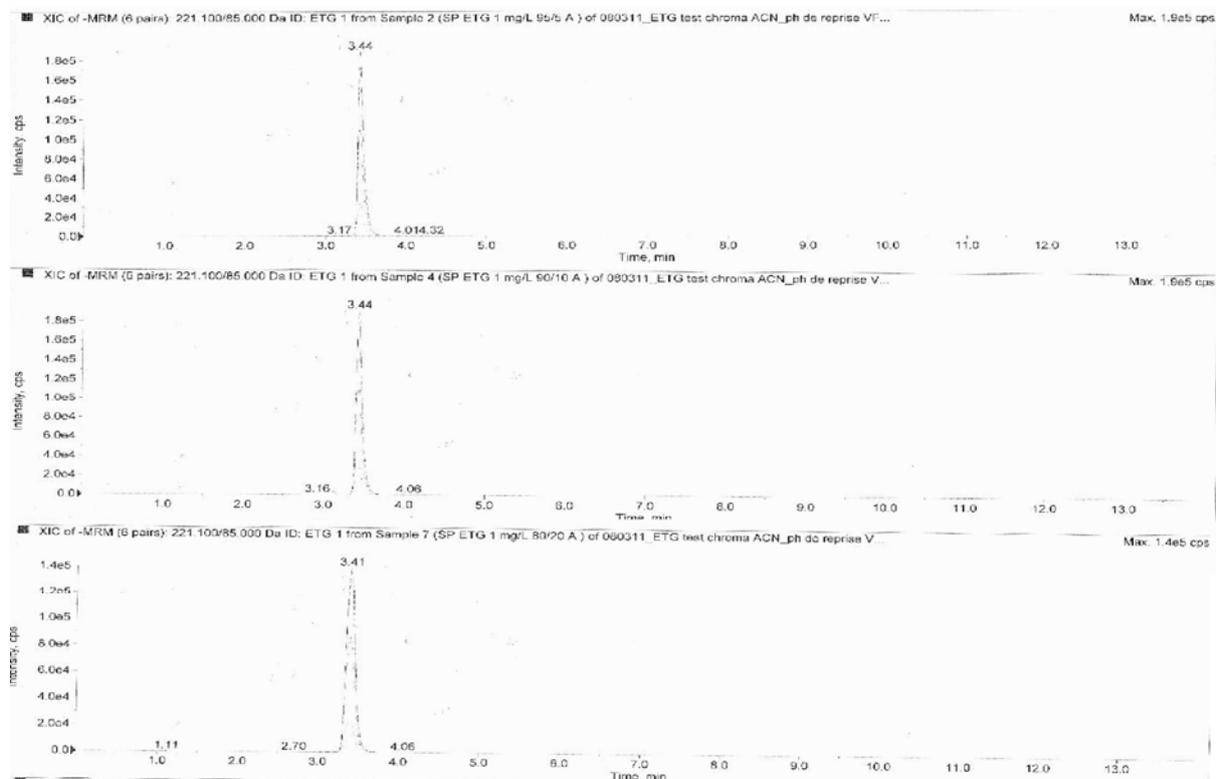


Figure représentant les pics chromatographiques de l'éthylglucuronide obtenus avec les différentes phases de reprises (95/5 ; 90/10 et 80/20, de haut en bas)

Ces optimisations terminées, nous nous sommes penchés sur le gradient de phase mobile. Il s'est avéré que les différents gradients de concentrations ne faisaient que décaler le temps de rétention sans avoir d'impact sur la finesse des pics. Nous avons choisi le gradient suivant, avec un temps de rétention de 3,45 min.

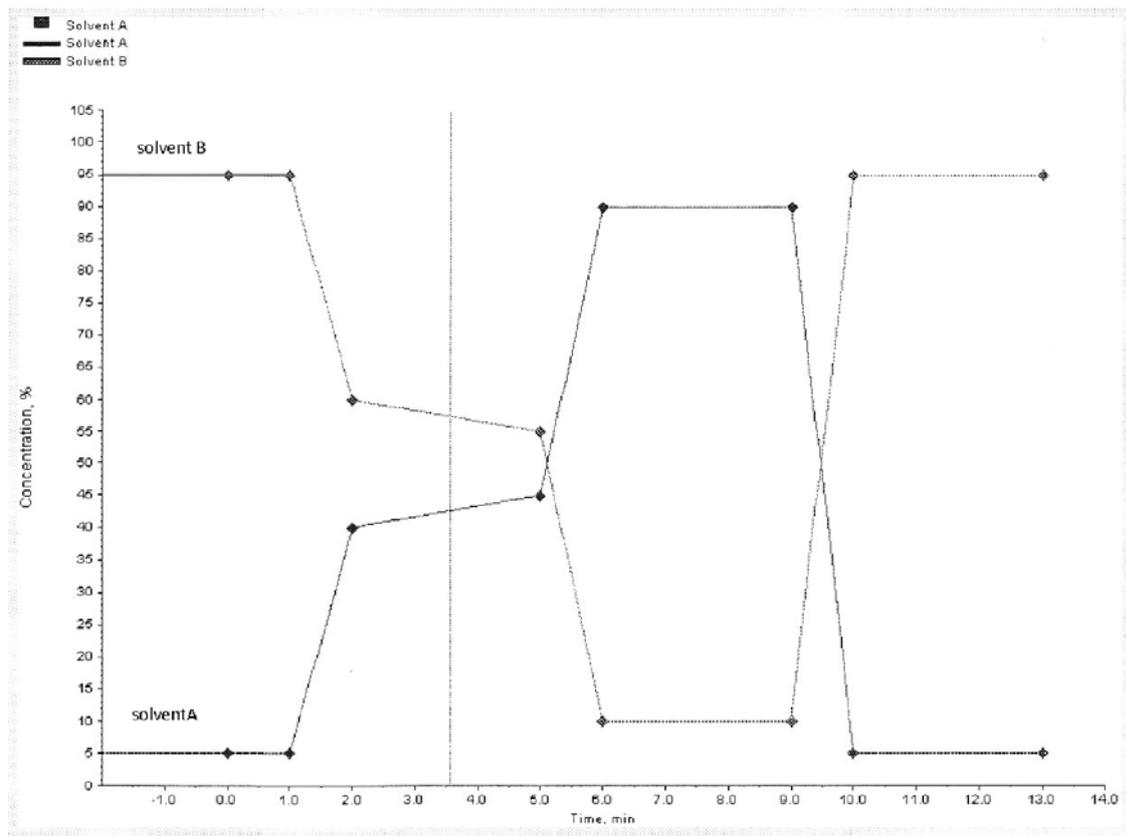


Figure représentant le gradient de solvants utilisé pour le dosage de l'éthylglucuronide

Les résultats de l'optimisation chromatographique peuvent être montrés avec la figure suivante et la comparaison de deux pics chromatographiques à 50 pg/mg. Au dessus le pic de l'éthylglucuronide après l'optimisation et en de dessous avant l'optimisation. Avant l'optimisation le pic détecté par l'appareil ne ressemble pas au standard du pic chromatographique : le pic est large et on constate un épaulement. On remarque qu'après l'optimisation, les pics sont fins. Ils ressemblent beaucoup plus à l'allure Gaussienne que doivent généralement adopter les pics chromatographiques. Ils sont beaucoup plus hauts et fins, ce qui nous permet d'améliorer la sensibilité de la méthode.

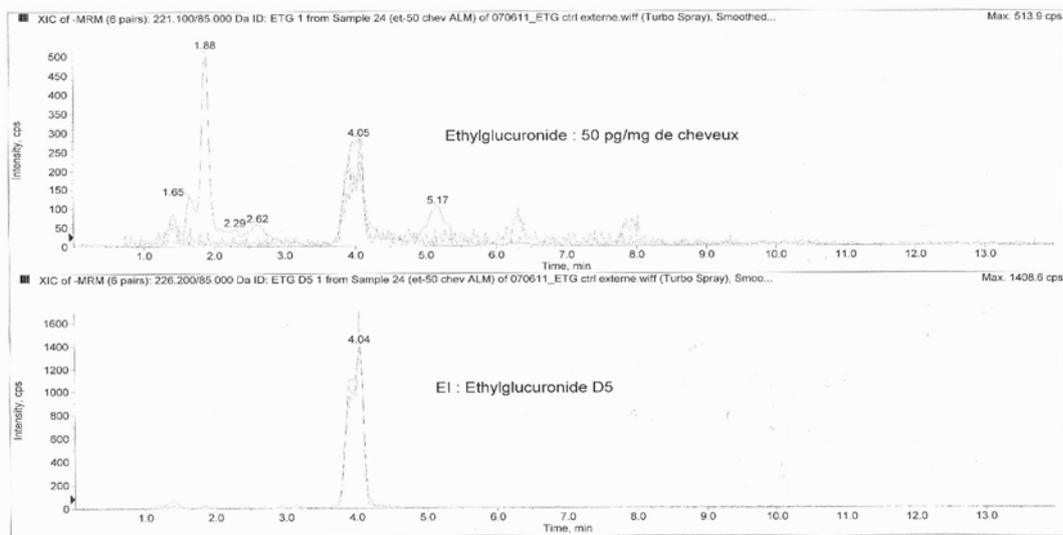


Figure représentant les pics chromatographiques avant l'optimisation

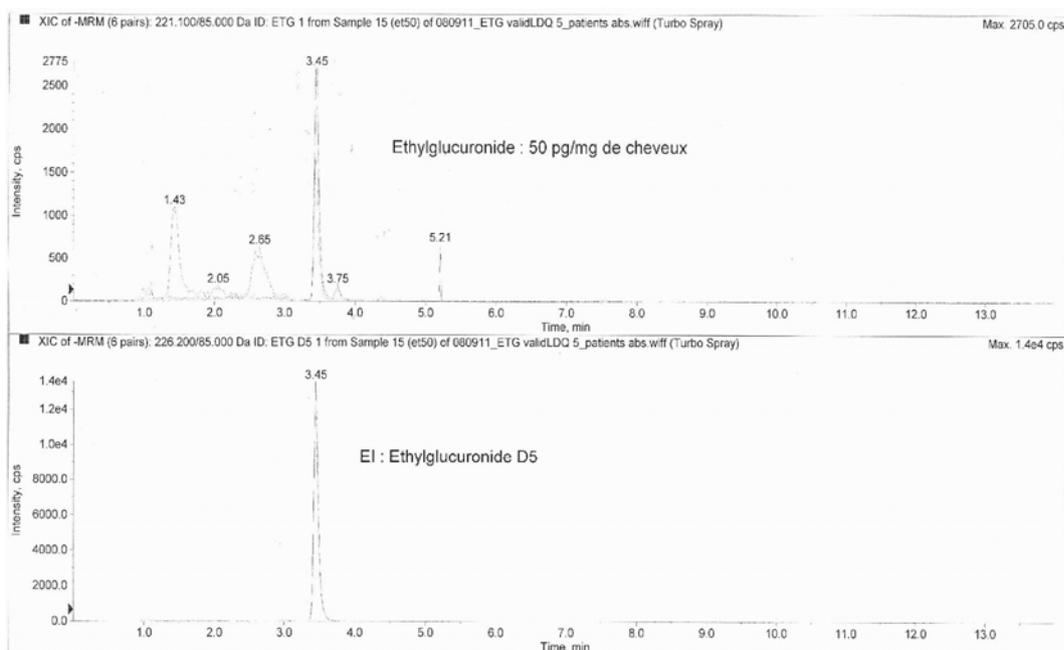


Figure représentant les pics chromatographiques après l'optimisation

## B) Essais d'extraction par le méthanol, sans SPE

En parallèle des autres manipulations, nous avons testé l'extraction directe par le méthanol. Les résultats présentés ici ne sont que partiels, mais pourraient ouvrir la voie vers une extraction moins onéreuse et plus rapide. Nous avons commencé cette expérimentation par l'extraction d'une gamme dans les cheveux. Ensuite, nous avons testé la validité de cette méthode en effectuant le dosage chez des patients positifs dont nous connaissons les valeurs d'éthylglucuronide, et enfin nous avons testé des patients abstinents.

Cette méthode a l'inconvénient essentiel de ne pas purifier l'extrait des cheveux, ce qui pourrait conduire à des pics parasites lors de la détection. Dans les gammes effectuées on ne rencontre pas plus de pics parasites qu'avec l'extraction par SPE. Mais dans la dernière expérience que nous avons effectuée, il semblerait qu'un résidu de cheveu se soit introduit dans le « vial d'injection » ce qui nous a donné des pics chromatographiques ininterprétables. L'extraction de patients « positifs à l'éthylglucuronide » nous a également donné des résultats peu convaincants. Certes, nous avons retrouvé de l'éthylglucuronide dans les cheveux testés, mais à une concentration inférieure à celle dosée avec une extraction SPE. Au vue de ces expériences, nous avons pensé que l'incubation aux ultrasons dans le méthanol n'était pas suffisante pour extraire l'éthylglucuronide du cheveu. Il est vrai que dans la littérature aucun auteur n'a essayé un autre solvant que l'eau pour incuber aux ultrasons. On peut penser qu'il s'agit d'un problème lors de l'extraction de l'éthylglucuronide du cheveu, car celui-ci est très soluble dans le méthanol : il devrait être extrait si le méthanol était en contact avec les cellules de l'intérieur du cheveu. Mais tout ceci n'est finalement que « suppositions » qui doivent être vérifiées par des expériences plus poussées. La sensibilité de la méthode est moindre qu'avec l'extraction liquide-solide, comme le montre la figure suivante qui représente deux points à 5 pg/mg.

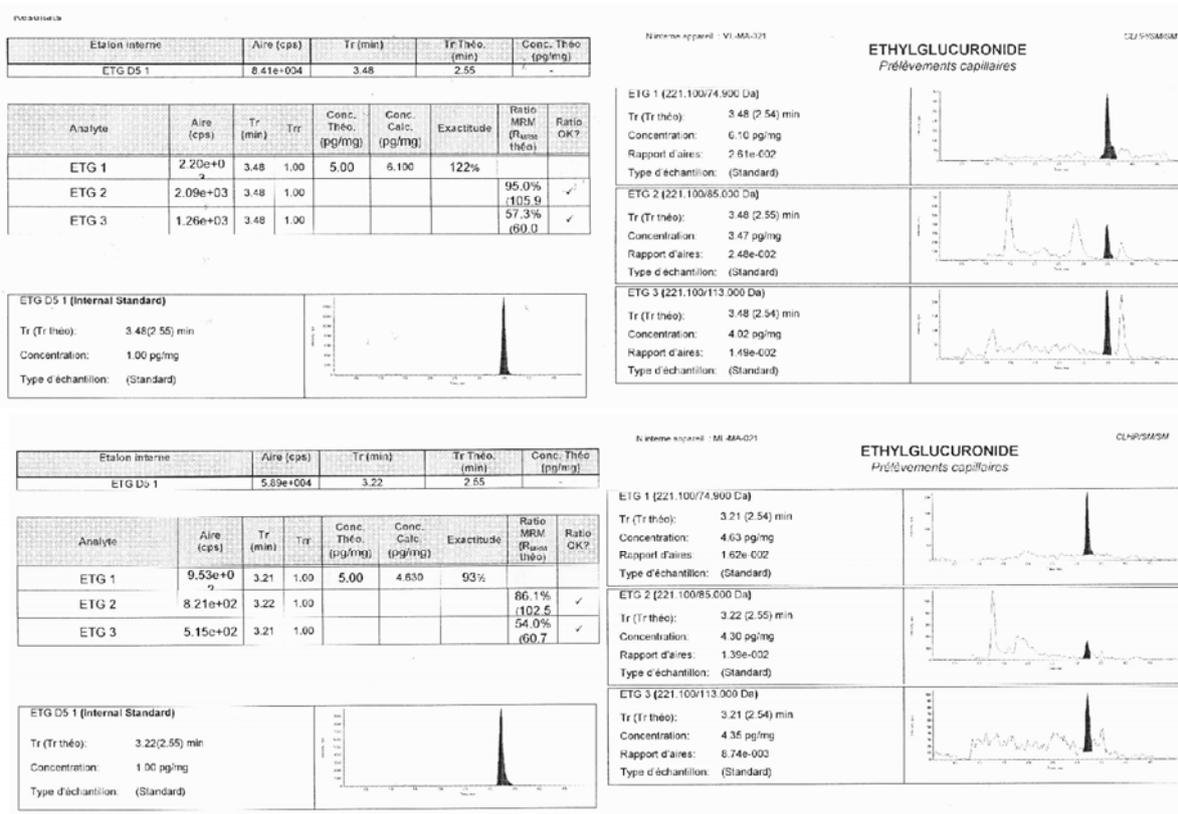


Figure montrant la différence entre deux points à 5 pg/mg le premier (en haut) avec SPE le second sans SPE (en bas)

L'aire sous la courbe varie d'un facteur deux par rapport à l'extraction par SPE pour un point à 5 pg/mg. En revanche, cet écart se réduit quand on compare deux points de gamme à 50 pg/mg. On peut en conclure qu'avec cette extraction la sensibilité est diminuée. Sur le plan de la forme des pics chromatographiques, on constate peu de différences entre les deux méthodes.

Les avantages de cette méthode sont tout d'abord sa rapidité. On gagne environ une heure par rapport à l'extraction sur phase solide. De plus, on diminue le coût car on n'utilise pas les cartouches de SPE qui sont relativement onéreuses.

Pour conclure, on peut dire que la méthode d'extraction par le méthanol n'est sans doute pas intéressante pour l'instant, car elle présente plus d'inconvénients que d'avantages.

## C) Résultats obtenus chez les patients abstinents

Au cours de mon passage dans le laboratoire, j'ai travaillé sur le dosage de l'éthylglucuronide avec la méthode qui existait au laboratoire et qui donnait de bons résultats avec l'API 2000. Après avoir optimisé quelques paramètres analytiques, nous nous sommes penchés sur l'évaluation des performances de la méthode optimisée, avec la recherche de la limite de détection (LDD) et de la limite de quantification (LDQ). En parallèle, nous avons « testé » onze patients abstinents.

L'étude des patients abstinents doit nous renseigner sur le taux d'éthylglucuronide qui peut différencier les patients abstinents totaux, de ceux des patients qui ont un usage « simple ». Il peut être intéressant de faire la preuve d'une abstinence totale chez d'anciens patients alcooliques : en médecine légale, dans un contexte, par exemple, de restitution de permis de conduire, ou de toute autre affaire où l'on doit faire la preuve de l'abstinence de l'accusé ou de la victime ; mais également en médecine de ville chez les femmes enceintes, pour évaluer les alcoolisations subies par le fœtus.

## 1) Recherche de la limite de quantification

Pour rechercher la limite de quantification à 5 pg/mg de cheveux, j'ai réalisé cinq points de concentration théorique à 5 pg/mg. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Numéros	Concentration calculée (pg/mg)	Aire d'intégration de la transition 1 (CPS)	Aire d'intégration de la transition 2 (CPS)	Rapport entre les deux transitions	Temps de rétention relatif
1	4,77	804	748	93%	1
2	5,1	792	765	96%	1
3	5,18	1280	1160	90,6%	1
4	5,71	1020	1000	98%	1
5	4,76	836	781	93,4%	1
Moyenne	5,104	946,4	890,8	94%	
Ecart type	0,38	207,97	182,11	2,86%	
Intervalle de confiance	[5,49 ; 4,71]	[1154 ; 738]	[1072 ; 708]	[91% ; 97%]	
Coefficient de variation	7,6%	21,97%	20,44%	3%	

On peut voir que la moyenne des points qui sont concentrés théoriquement à 5 pg/mg est de 5,1 soit un écart de 2 %. Toutes les valeurs enregistrées rentrent dans un intervalle de confiance d'un écart type, et le coefficient de variation est faible (7,6%). Sur le plan analytique le temps de rétention relatif est de 1 pour tous les échantillons, ce qui nous permet d'affirmer que nous sommes en présence d'éthylglucuronide et non d'un

quelconque artéfact provenant de la matrice capillaire. De plus, le rapport entre les deux transitions mesurées est de l'ordre de 90%, avec un coefficient de variation de 3%. La limite de quantification peut être validée à 5 pg /mg.

## 2) Recherche de la limite de détection

Pour la recherche de la limite de détection, on a effectué trois points à chaque concentration (0,5 ; 1 ; 2,5 pg/mg). Pour la concentration la plus basse, c'est-à-dire 0,5 pg/mg, on détecte certains pics, mais ils sont très proches du bruit de fond. Un seul point peut être réellement détecté à 0,5 pg/mg : sa concentration calculée par rapport à la gamme est de 0,834 pg/mg. Mais le rapport entre les transitions 1 et 2 est de 140% au lieu de 90%, ce qui nous indique qu'une impureté doit perturber l'intégration d'un pic. Compte tenu de cette incertitude, la limite de détection se trouve donc à une concentration plus forte.

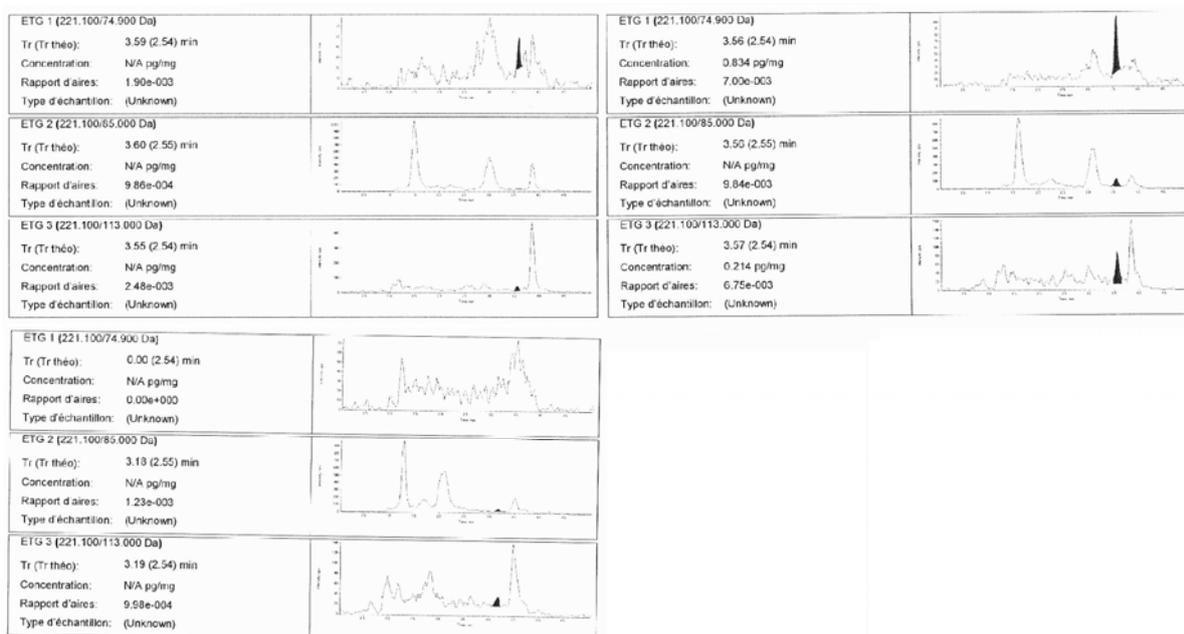


Figure représentant les intégrations sur les trois transitions des points à 0,5 pg/mg

Quand on étudie les points à 1 pg/mg, tous les points sont détectés sur les deux premières transitions avec des pics qui sont parfois difficiles à intégrer, car ils sont très proches du bruit de fond de l'appareil.

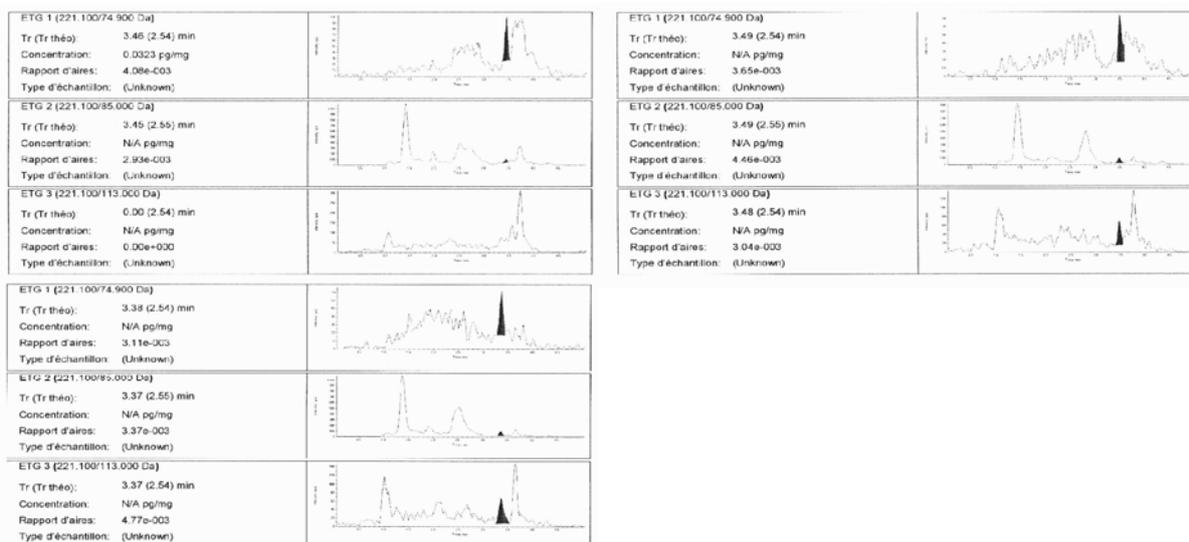


Figure représentant les points de gamme à 1 pg/mg

Quand on regarde les points à 2,5 pg/mg, on s'aperçoit d'une nette amélioration. On détecte toutes les transitions : les concentrations calculées sont de l'ordre de 2 pg/mg. Sur une population si faible (n=3) on ne peut pas tirer de conclusions statistiques. Mais quand on regarde la transition 1, on s'aperçoit que les valeurs mesurées sont très proches les unes des autres, ce qui atteste d'une grande reproductibilité entre les échantillons. Il semblerait que sur la transition 2, une interférence soit présente avec une réponse plus forte que la transition 1 alors que ce devrait être l'inverse. Toutefois, on peut estimer que la limite de détection est probablement proche de 2,5 pg/mg. Avec un signal qui est trois fois supérieur au bruit de fond.

Numéros	Concentration calculée (pg/mg)	Aire d'intégration de la transition 1 (CPS)	Aire d'intégration de la transition 2 (CPS)	Rapport entre les deux transitions (%)	Temps de rétention relatif
1	1,79	824	532	64,6	1
2	1,78	878	950	108,2	1
3	1,91	841	915	108,8	1
Moyenne	1,82	847	799	93	
Ecart type	0,072	27,61	231,89	25	
Coefficient de variation	3,96%	3,25%	29%	27%	

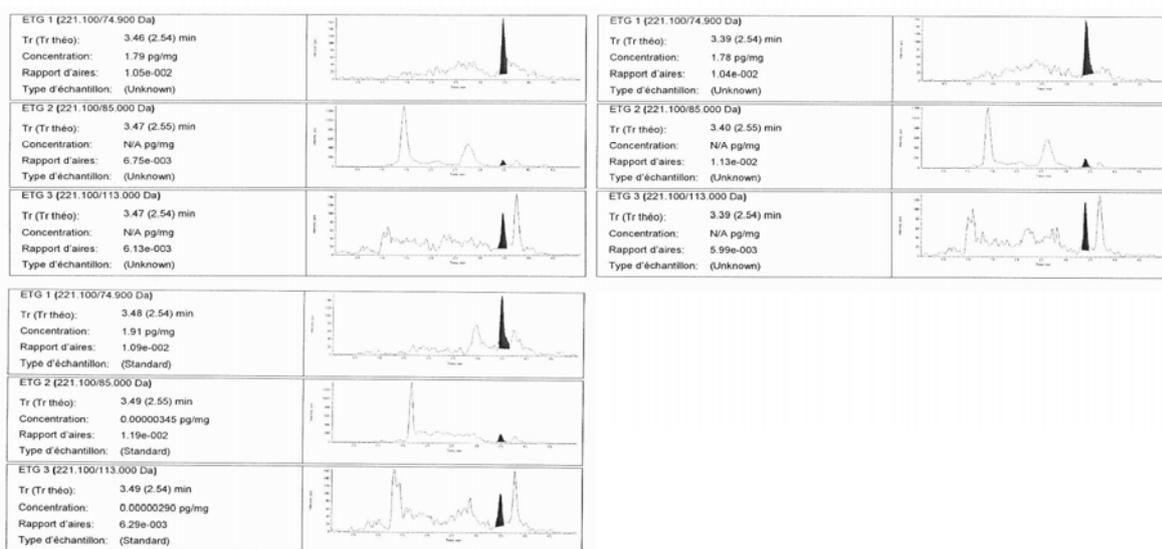


Figure et tableau représentant les résultats obtenus pour les points à 2,5 pg/mg

### 3) Résultats de l'étude des sujets abstinents

La plupart des patients sélectionnés sont des jeunes enfants, qui ne sont en général pas en contact avec de l'éthanol par voie orale. Ils ne sont toutefois pas à l'abri d'une contamination par voie cutanée. La consommation d'éthanol étant très répandue en France, nous n'avons trouvé qu'un seul adulte n'ayant pas consommé d'alcool au cours de l'année.

L'objectif était de savoir en-dessous de quel taux d'éthylglucuronide dans les cheveux, on pouvait dire qu'un patient était abstinent. On se rend compte que l'éthylglucuronide est retrouvé chez certains patients sous forme de traces, mais qui sont non quantifiables car inférieures à la limite de quantification.

Chez deux patients on retrouve une quantité que l'on pourrait éventuellement qualifier de détectable, même si les valeurs sont inférieures à la limite de détection de la méthode. Dans cinq cas, un pic qui pourrait correspondre à de l'éthylglucuronide est « décelable », mais les quantités sont extrêmement faibles et se différencient très peu du bruit de fond de l'appareil. Lorsque cela était possible (2 cas), une valeur de concentration a été calculée et nous l'avons mentionné dans le tableau suivant. Toutefois, il est clair que cette valeur de concentration n'a aucune « valeur » car bien en-deçà de la limite de quantification (5 pg/mg) définie lors de notre étape de « pré-validation ». On pourrait expliquer ces contaminations par le fait que la plupart des produits cosmétiques d'usage quotidien comme par exemple les gels douches et les shampoings, contiennent de l'éthanol. Mais on ne sait pas comment cet éthanol peut être transformé en éthylglucuronide. La seconde hypothèse que l'on peut formuler serait que l'éthylglucuronide est produit par les cellules humaines à partir d'une production d'éthanol endogène.

Finalement, on peut dire à partir de ces résultats que les personnes abstinentes se trouvent vraisemblablement en dessous ou aux alentours de un pg/mg. On ne peut pas l'affirmer car la limite de quantification de notre méthode est trop élevée (5 pg /mg). Sans doute que dans le futur, et avec l'évolution des instruments nous pourrions proposer un « cut off » de l'abstinence. Pour cela il faudrait que la limite de quantification s'approche de 0,5 pg/mg. Dans la littérature cette performance n'a pas encore été atteinte.

N°	date de prélèvement	sexe	age	Ethnie	Poids (kg)	Taille (cm)	Couleur cheveux	Etg (pg/mg)
1	20/07/2011	F	3 ans	Caucasienne	13	100	Brun	non détecté
2	20/07/2011	F	3 ans	Caucasienne	17	103	Châtain	non détecté (traces)
3	20/07/2011	M	9 mois	Caucasienne	11	74	Châtain	< LDQ (0,97 pg/mg)
4	20/07/2011	M	7 ans	Caucasienne	24	128	Brun	< LDQ (0,24 pg/mg)
5	26/07/2011	F	5 ans	Caucasienne	19	110	Châtain	non détecté (traces)
6	02/08/2011	F	8 ans	Afro-caucasien	22	124	Noir	non détecté
7	04/08/2011	F	-	Caucasienne	-	-	Noir	non détecté
8	04/08/2011	M	-	Caucasienne	-	-	Noir	non détecté (traces)
9	10/08/2011	F	6 ans ½	Caucasienne	21	119	Châtain	non détecté (traces)
11	10/08/2011	F	8 ans ½	Caucasienne	27	129	Châtain	non détecté
10	25/07/2011	M	23 ans	Caucasienne	75	182	Brun	non détecté (traces)

Tableau contenant les résultats obtenus chez des patients abstinents testés

# **Le syndrome d'alcoolisation fœtale et les perspectives du dosage de l'éthylglucuronide**

Récemment, plusieurs auteurs se sont intéressés au dosage de l'éthylglucuronide et des esters d'acides gras d'éthanol dans différentes matrices dans le but de détecter et de caractériser le syndrome d'alcoolisation fœtale. Ce syndrome s'accompagne de malformations cérébrales caractéristiques, mais aussi de retards dans le développement somatique. Toutes les études épidémiologiques montrent la difficulté d'évaluer les conséquences de ce syndrome car l'alcool consommé pendant la grossesse reste un tabou. L'éthylglucuronide étant un marqueur de consommation passé d'éthanol, il semble intéressant de le doser dans certaines matrices propres au fœtus, pour voir son niveau d'exposition. Les matrices qui ont été reconnues comme les plus pertinentes sont : les cheveux du nouveau né et le méconium. Les cheveux comme chez l'adulte sont un bon marqueur d'exposition à l'éthanol, ils ont l'avantage essentiel de garder les molécules emprisonnées à l'abri des dégradations de l'environnement pendant de nombreux mois. Le méconium constitue la matière fécale du fœtus : il est expulsé lors de la naissance ou dans les premiers jours de la vie. Il constitue une formidable matrice où l'on peut retrouver les drogues consommées par la mère lors de la fin de grossesse.

Dans le chapitre suivant, je vais décrire les lésions cérébrales qui sont liés à la prise d'éthanol par la mère. Puis on s'intéressera aux différentes méthodes de dosages de l'éthylglucuronide et des esters d'acides gras et d'éthanol, dans les deux matrices les plus intéressantes : les cheveux et le méconium.

## A) Lésions et conséquences de la prise excessive d'éthanol au cours de la grossesse sur le développement fœtal du cerveau :

Depuis 1968, avec les travaux de M Lemoine, on sait que la prise d'éthanol au cours de la grossesse donne des lésions cérébrales irréversibles qui sont regroupées sous le terme de syndrome d'alcoolisation fœtale. Les premiers travaux réalisés sur ce syndrome ont été réalisés dans le cadre d'autopsies suite aux décès de nouveaux-nés très gravement atteints. Aujourd'hui avec les progrès accomplis en imagerie médicale, on se sert de cet outil pour déterminer quelles zones sont les plus touchées lors de la survenue de ce syndrome.

La partie du cerveau la plus touchée semble être la substance blanche et en particulier les cellules gliales. On constate également des anomalies sur la substance grise avec une diminution de la surface corticale. Tout ceci contribue à la diminution observée du volume du cerveau.

### 1) Désordres observés chez les individus atteints de Syndrome d'alcoolisation fœtale

Chez les individus atteints de syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF), on constate dans un premier temps une diminution du quotient intellectuel, comme le montre certaines études. En effet, la moyenne de cette population se trouverait aux alentours de 70, alors que la moyenne de la population générale est de 80 [58]. Les lésions engendrées par l'éthanol sont diffuses à tout le cerveau, c'est pourquoi de nombreuses fonctions cérébrales sont touchées ; les fonctions les plus essentielles dont la mémoire, le langage et les fonctions motrices sont grandement affectées. Mais on constate également des déficits importants lors de l'apprentissage, dans la vision dans l'espace, et dans l'adaptation sociale. Chez les enfants atteints du SAF, l'illettrisme est significativement plus élevé que dans la population générale. On constate également une forte proportion d'enfants atteints de troubles du comportement et de l'attention, avec un taux d'hyperactifs supérieur à la moyenne générale

de la population [58]. Beaucoup d'enfants ayant eu un SAF, présentent des troubles moteurs avec un déficit d'équilibre. La plupart des symptômes décrits chez les enfants atteints de SAF peuvent être corrélés à des lésions bien précises dans le cerveau.

## 2) Pouvoir tératogène de l'éthanol sur les structures cérébrales

Les études effectuées grâce à l'imagerie médicale, ont montré que certaines zones du cerveau sont plus touchées que d'autres. Il s'agit du corps calleux, du cervelet, et des ganglions de la base. Plus précisément, on s'aperçoit que se sont des organes riches en substance blanche qui semblent les plus touchés par l'effet tératogène de l'éthanol. On constate bien souvent que les lésions de la substance blanche sont plus étendues au niveau de l'hémisphère gauche. Quant à la substance grise, elle paraît moins touchée aux premiers abords, mais on constate une densification de celle-ci. Des études PET scan du cerveau ont montré une diminution du métabolisme du glucose au niveau du thalamus. On note également une diminution notable de la transmission sérotoninergique dans le cortex frontal.

Le corps calleux fait partie des organes les plus touchés par la tératogénicité de l'éthanol. On observe un certain déplacement de cette structure cérébrale vers l'arrière avec une diminution de sa masse, due à un déficit en substance blanche. On peut corréler ces lésions à certains symptômes observés chez les enfants atteints de SAF. Il s'agit surtout des problèmes de coordinations des mouvements, des troubles de l'attention et ces symptômes expliqueraient le fonctionnement excessif qui conduit à une hyperactivité. Une autre structure essentielle du cerveau est sévèrement touchée : ce sont les ganglions de la base et plus particulièrement le noyau caudé. On constate qu'il est disproportionnellement petit par rapport à la taille du cerveau. On sait qu'il est fortement impliqué dans la régulation de l'attention. Ceci, en corrélation avec le dysfonctionnement du corps calleux, expliquerait l'hyperactivité observée chez les individus atteints de SAF. La dernière structure cérébrale touchée dont nous allons parler ici est le cervelet. Il commande et régule les fonctions motrices. On note chez les enfants atteints de SAF, une diminution notable du volume et de

la surface de celui-ci. La diminution du volume peut être associée à la diminution du ventricule antérieur, mais également à l'atteinte de la substance blanche. Les lésions observées au niveau du cervelet expliquent en grande partie les troubles moteurs observés dans le SAF. Des études récentes montrent le rôle prépondérant des cellules gliales dans l'explication de la tératogénicité de l'éthanol.

En effet, les cellules gliales sont de loin les plus touchées par la tératogénicité de l'éthanol, et ceci expliquerait en grande partie les lésions observées. On sait qu'elles jouent un rôle prépondérant dans le développement et la maturation du cerveau. Nous allons décrire en quelques lignes les fonctions les plus essentielles qui nous permettent d'expliquer la tératogénicité de l'éthanol. Les cellules gliales ont le pouvoir, au stade multipotent, de se différencier en neurones. Elles sont extrêmement importantes dans le développement du cerveau. En effet, elles commandent le guidage des cellules lors de la formation des structures cérébrales. Ces cellules sont indispensables à une neurotransmission correcte, surtout au niveau des neurones moteurs. Elles jouent un rôle prépondérant dans la formation de synapses fonctionnelles. Enfin on leur reconnaît une fonction de premier ordre dans le métabolisme du glucose au niveau des neurones [58].

Ce n'est que récemment que l'on a découvert le rôle des cellules gliales dans la toxicité fœtale de l'éthanol. La tératogénicité sur ces cellules explique en grande partie les troubles et les lésions observées dans le SAF.

## B) Marqueurs biologiques permettant de caractériser le SAF

Il est très difficile d'effectuer des études épidémiologiques qui montrent la consommation d'éthanol lors de la grossesse. Pour cela on a longtemps utilisé des marqueurs biologiques indirects comme les GGT ou la CDT. Mais ceux-ci caractérisent seulement les buveuses chroniques, au sens « d'alcooliques ». Or on sait que l'on peut voir apparaître un SAF avec des doses qui sont inférieures à celles habituellement utilisées pour définir l'alcoolisme. C'est pourquoi, on s'est orienté vers les marqueurs directs qui sont en général plus sensibles.

Après lecture des différents auteurs qui ont publiés sur le sujet, il en ressort que les deux marqueurs les plus intéressants sont l'éthylglucuronide et les esters d'acides gras d'éthanol. Ces derniers sont de loin les plus étudiés. Il en résulte une bonne sensibilité dans la caractérisation de la consommation d'éthanol au cours de la grossesse. L'éthylglucuronide est lui bien moins étudié, mais il semblerait que ce soit un marqueur pertinent du passage trans-placentaire de l'éthanol. On se rend compte en parcourant la bibliographie, qu'il y a eu plus d'engouement pour les recherches dans le méconium que dans les cheveux. Mais on aperçoit depuis quelques années une recrudescence de l'utilisation du cheveu qui a le gros avantage de pouvoir être dosé bien après l'accouchement. Toutefois, chez le nouveau-né, on se heurte au problème de la quantité de cheveux nécessaire au dosage (30 mg) qu'il est difficile de prélever sur la tête d'un nourrisson.

### 1) Le principe du dosage des esters d'acides gras et d'éthanol dans le méconium et les cheveux

La recherche des esters d'acides gras et d'éthanol dans le méconium est la plus documentée. Le méconium peut être considéré comme les matières fécales du fœtus. Il s'agit d'un liquide visqueux et collant de couleur souvent noir-verdâtre. Il est composé de bile et de résidus provenant de la desquamation du tube digestif. Il présente des avantages importants par rapport aux matrices conventionnelles : le sang et l'urine. Tout d'abord la collection de cette matrice est très facile et non invasive. En effet, celle-ci est expulsée dans les trois jours qui suivent la naissance. Le méconium concentre les éventuels esters d'acides gras d'éthanol pendant les treize dernières semaines de la grossesse, ce qui représente l'exposition à l'éthanol pendant le second et le troisième trimestre de la grossesse. Ceci est intéressant car c'est pendant cette période que la tératogénicité de l'éthanol est la plus forte [59]. On sait depuis un certain nombre d'années que les esters d'acides gras et d'éthanol augmentent fortement chez les mères « grosses buveuses » [60]. Chez les enfants nés de femme alcooliques, on a trouvé préférentiellement quatre esters d'acides gras d'éthanol dans le méconium : l'éthylpalmitate, l'éthyloléate, l'éthylstéarate, l'éthyllinoléate. Mais on constate que certains esters d'acides gras et d'éthanol sont présents dans les deux populations

étudiées, « alcooliques » et « non buveuses ». Il s'agit de l'éthyllaurate et de l'éthylmiristate. La présence d'esters d'acides gras et d'éthanol dans le méconium des enfants non exposés à l'éthanol s'expliquerait par la production d'éthanol par le métabolisme de base des cellules humaines [61]. Afin de ne pas rendre de « faux positif », le dosage des esters d'acides gras et d'éthanol s'effectue sur plusieurs esters caractéristiques de l'exposition à l'éthanol. A présent, certains auteurs ont fixé une limite au-delà de laquelle on peut dire que le fœtus a été exposé à l'alcool. Selon les laboratoires, le cut off choisi n'est pas semblable car les esters qu'ils choisissent de doser sont différents. Par exemple, on peut citer la limite 2 nmol/g de méconium qui cumule les neuf esters les plus abondants [59]. Les méthodes utilisées pour doser les esters dans le méconium sont nombreuses. Du fait de leur volatilité, on utilise surtout la chromatographie gazeuse, avec une détection par un spectromètre de masse ou deux spectromètres en tandem. Mais, on peut également utiliser la chromatographie liquide avec une détection avec deux spectromètres de masse en tandem.

En ce qui concerne les cheveux, bien peu d'études sont parues sur la recherche d'esters d'acides gras d'éthanol. Mais on sait qu'à cause de leur hydrophobie, ces esters sont très stables dans les cheveux. Ils auraient l'avantage essentiel de pouvoir être décelés plusieurs mois après la naissance. Si on superpose des études faites chez les alcooliques, il semblerait que ce soit l'éthylpalmitate et l'éthyloléate qui augmentent le plus fortement chez les alcooliques. Des études chez le cobaye montrent que les esters d'acides gras et d'éthanol sont retrouvés dans le poil des cobayes qui sont nés de mères alcooliques [62].

## 2) Recherches de l'éthylglucuronide dans le méconium et les cheveux de nouveaux-nés

L'éthylglucuronide a été bien moins étudié dans le méconium que les esters d'acides gras d'éthanol. Mais on constate depuis quelques années un intérêt grandissant pour celui-ci. Une récente étude italienne qui a testé les esters d'acides gras d'éthanol et l'éthylglucuronide dans le méconium, a montré l'efficacité d'utiliser les deux marqueurs en combinaison pour caractériser la prise de boissons alcoolisées au cours de la grossesse. On

constate également que l'éthylsulfate, proche voisin de l'éthylglucuronide, est bien moins performant que celui-ci [63]. Une étude montre également un passage trans-placentaire de l'éthylglucuronide et de l'éthylsulfate, ce qui augmenterait la concentration de ces métabolites chez le fœtus [64].

En ce qui concerne les cheveux du nouveau-né, on ne trouve pas d'auteur ayant publié sur ce sujet. Mais comme pour les esters d'acides gras d'éthanol, il s'agit d'un domaine intéressant qui va vraisemblablement se développer dans les années à venir, même si, encore une fois, il demeure limité par la difficulté à prélever des cheveux chez un nouveau-né.

En conclusion, on peut dire que le syndrome d'alcoolisation fœtale peut être actuellement caractérisé par les marqueurs directs dosés dans une matrice fœtale. Si le méconium est la matrice qui a été la plus étudiée, il reste encore des explorations à mener concernant le dosage dans les cheveux à la naissance. Au milieu des différents marqueurs de l'alcoolisme, l'éthylglucuronide qui peut d'ores et déjà être dosé dans les cheveux des mamans, semble disposer de capacité suffisante pour devenir incontournable dans quelques années. En attendant, ce sont surtout les esters d'acides gras d'éthanol qui ont pris de l'avance dans le domaine de l'analyse du méconium. Il semblerait enfin, à travers les quelques études parcourues, qu'en utilisant ces marqueurs, on se rende compte que l'éthanol est consommé plus qu'on ne le pense au cours de la grossesse [63].

## Conclusion

La recherche de l'éthylglucuronide dans les cheveux « marque » la consommation d'éthanol au cours des derniers mois. On s'aperçoit avec le dosage chez les patients abstinents qu'on peut le retrouver, mais sous forme de traces qui sont pour l'instant non « quantifiables ». On peut légitimement penser qu'il s'agit de la production du métabolisme de base de l'organisme. En effet, éthanol est produit en infime quantité dans l'organisme. Il peut s'agir aussi de contaminations extérieures car l'éthanol rentre dans la composition de beaucoup de produits. Au vu des résultats obtenus, on peut dire que les patients réellement abstinents se trouvent, probablement et généralement, en dessous de la limite de quantification évaluée ici à 5 pg/mg. Avec les résultats obtenus chez les abstinents et les éthyliques, on peut dire que la population des « social drinkers » devrait se trouver entre 5 pg/mg (voire, plus bas...) et 30 pg /mg. Mais des études approfondies doivent être mises en œuvre pour le confirmer.

La caractérisation de l'abstinence revêt un intérêt tout particulier dans la caractérisation du syndrome d'alcoolisation fœtale. En lisant la bibliographie, on s'aperçoit qu'aucune étude n'a étudié le taux d'éthylglucuronide dans les cheveux de nouveau né. L'étude approfondie de ce marqueur pourrait nous renseigner sur l'usage d'éthanol au cours de la grossesse, mais aussi ajouter un élément de preuve supplémentaire pour caractériser de syndrome d'alcoolisation fœtale.

Du point de vue expérimental, les perspectives sont là. L'utilisation d'instruments encore plus performants pourrait nous amener à diminuer la prise d'essais et favoriser alors les analyses capillaires chez les nouveaux-nés, et/ou « voir » la quantité d'éthylglucuronide qui est produite de manière endogène chez les abstinents.

## Bibliographie

- [1] Batel P, Nédélec S. *Alcool : de l'esclavage à la liberté*. Ed Demos, 2007
- [2] <http://www.alcoolinfoservice.fr>
- [3] Canarelli T, Cadet-Tairou A, Palle C; *Indicateurs de la morbidité et de la mortalité liées à l'alcool en France*
- [4] Wohl M, Adès J. Conduites alcooliques, épidémiologie et aspects cliniques. *EMC* ; 37:398-30
- [5] Grant BF. Prevalence and correlates of alcohol use and DSMIV alcohol dependence in United State: results of the national Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. *J Stud Alcohol*; 1997; 58:463-73
- [6] Petit A, Karila L, Benyamina A, Reynaud M, Aubin HJ. *"Binge drinking" among the youth* © Springer-Verlag 2009
- [7] Beck F, Legleyre S, Le Nézet O, Spilka S. *atlas régional des consommations d'alcool*, données INPES/OFDT, 2005
- [8] Norberg A, Jones AW, Hahn RG, Gabrielsson JL. Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: research and forensic applications. *Clin Pharmacokinet*; 2003; 42:1-31
- [9] Agarwal DP. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. *Pathol Biol*; 2001; 49:703-9
- [10] Kintz P, Villain M, Mandel A, Cirimele V. Chronic alcohol drinking and characterization using immuno-chemistry methods. *Ann Toxicol Anal*; 2009; 21(1): 21-25
- [11] Gemma S, Vichi S, Testai E. Individual susceptibility and alcohol effects: biochemical and genetic aspects. *ann. Ist super sanità*; 2006; 42(1):8-16
- [12] Vargaa A, Hanssona P, Johnsonb G, Christer A. Normalization rate and cellular localization of Phosphatidylethanol in whole blood from chronic alcoholics. *Allinga Clinica Chimica Acta*; 2000; 299:141–150
- [13] 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*; 2008; 30(2):255-63
- [14] Nalpas B, Vassault A, Charpin S, Lacour B, Berthelot P. Serum mitochondrial aspartate amino-transferase as a marker of chronic alcoholism: diagnosis value and interpretation in a liver unit. *Hepatology*; 1986; 6:608–614
- [15] SriRajaskanthan R, Preedy V. Biochemical markers of alcoholism and their clinical effectiveness. *Clinical Effectiveness in Nursin*; 2006; 9(3):280-285
- [16] Conigrave, KM, Davies, P, Haber P, Whitfield JB. Traditional markers of excessive alcohol use. *Addiction*; 2000; 98(2):31–43
- [17] Helander A, Beck O. Ethyl sulfate: a metabolite of ethanol in humans and a potential biomarker of acute alcohol intake. *J Anal Toxicol*; 2005; 29(5):270-4
- [18] 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*; 2004; 15(11):1644-8

- [19] Reisfield GM, Goldberger BA, Crews BO, Pesce AJ, Wilson GR. ethylglucuronide, ethylsulfate and ethanol in urine after sustained exposure to an ethanol-based hand sanitizer. *journal of analytical toxicologie* ; 2011; 35(2):85-91
- [20] Wurst FM, Kempter C, Seidl S. Ethyl glucuronide a marker of alcohol consumption and arelapse marker with clinical and forensic implications. *alcohol and alcoholism*; 1999; 34:71-77
- [21] Hoiseth G, Bernard JP, Karinen R. A pharmacokinetic study of ethyl glucuronide in blood and urine: applications to forensic toxicology. *Forensic Sci Int*; 2007; 172(2-3):119-124
- [22] Pirro V, Di Corcia D, Pellegrino S, Vincenti M, Scutteri B, Salomone A ; A study of distribution of ethyl glucuronide in different keratin matrices. *Forensic Sci Int*; 2011; 210(1-3):271-277
- [23] AlSaabi A, Allorge D, Sauvage FL, Tournel G, Gaulier JM, Picard N. Identification of the human hepatic UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) involved in the metabolism of ethanol; Présentation au 49th International Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists, San Francisco, USA, Septembre 2011
- [24] Pötsch L, Skopp G, Moeller MR. biochemical approach on the conservation of drugs molecules during hair fiber formation. *forensic science internation*; 1997; 84(1-3):25-35
- [25] 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*; 2008; 122(5):389-393
- [26] Tsanaclis L, Kingston R, Wicks J. Testing for alcohol use in hair: is ethyl glucuronide (EtG) stable in hair?. *Ann Toxicol Anal*; 2009; 21(2):67-71
- [27] Annual meeting of the Society of Hair Testing, Chamonix, France, Mars 2011
- [28] Alt A, Janda I, Seidl S, Wurst FM. Determination of ethylglucuronide in hair sample. *Alcohol alcohol*; 2000; 35(3):313-314
- [29] Skopp G, Schmitt G, Pötsch L, Drönner P, Aderjan R, Mattern R. Ethyl glucuronide in human hair. *Alcohol*; 2000; 35(3):283-5
- [30] Determination of ethyl glucuronide in human hair by SPE and LC-MS/MS. *Forensic Sci Int*; 2002; 128(1-2):59-65
- [31] Jurado C, Soriano T, Giménez MP, Menendez M. Diagnosis of chronic alcohol consumption. Hair analysis for ethyl-glucuronid. *Forensic Sci Int*; 2004; 145(2-3):161-6
- [32] 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*; 2004; 145(2-3):167-73
- [33] 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*; 2006; 41(1):34-42
- [34] Paul R, Kingston R, Tsanaclis L, Berry A, Guwy A. Do drug user use less alcohol than non drug user? A comparaisn of ethylglucuronide concentration in hair between two groups in medicolegal cases. *Forensic sci int*; 2008; 176(1):82-86
- [35] Kharabouche H, Spoker F, Troxler S, Augsburg M, Mangin P, Staub C. Development and validation of a gas chromatography-negative chemical ionisation tandem mass spectrometry method for the determination of ethylglucuronide in hair and its application to forensic toxicology. *journal of chromatographie B*; 2009; 877(23):2337-2343
- [36] Lamoureux F, Sauvage FL, Merceroille 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. *Anal Bioanal Chem.* 2009; 394(7):1895-901

[37] Alvarez I, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernandez P, Cabarcos P, Lopez P. Microwave-assisted extraction: a simpler and faster method for the determination of ethylglucuronide in hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*; 2009; 393(4): 1345-1350

[38] Concheiro M, Cruz A, Mon M, De Castro A, Quintela O, Lorenzo A, Lopez M. Ethylglucuronide determination in urine and hair from alcohol withdrawal patients. *Journal of analytical toxicologie* ; 2009; 33(3):165-161

[39] Schloegl H , Rost T, Schmidt W, Wurst FM, Weinmann W. distribution of ethyl glucuronide in rib bone marrow, other tissues and body liquids as proof of alcohol consumption before death. *forensic sci int*; 2006; 156(2-3):213-8

[40] Thierauf A, Kempf J, Auwarter V, Gnann H, wohlfarth A, Weinmann W. Ethyl sulfate and ethyl glucuronide in vitreous humor as postmortem evidence marker for ethanol consumption prior death. *forensic science international*; 2011; 210(1-3):63-68

[41] Schummer C, Appenzeller BM, Wennig R. Quantitative determination of ethyl glucuronide in sweat. *ther drug monit*; 2008; 30(4): 536-539

[42] Hegstad S, Johnsen L, Morland J, Christophersen AS. Determination of ethyl glucuronide in oral fluid by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *journal of analytical toxicology*; 2009; 33(4):204-207

[43] Halter CC. Suggesting a cut-off for ethyl glucuronide in urine for forensic proof of ethanol consumption. *46th International Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists*, Martinique, France; Juin 2008

[44] Böttcher M, Beck O, Helander A. Evaluation of a new immunoassay for urinary ethyl glucuronide testing. *Alcohol Alcohol.* 2008; 43(1):46

[45] Cruz A. Ethylglucuronide as a biomarker of ethanol intake: application to clinical and forensic cases *46th International Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists*, Martinique, France, Juin 2008

[46] Böttcher M, Beck O, Helander A. Evaluation of a new immunoassay for urinary ethyl glucuronide testing. *Alcohol Alcohol*; 2008; 43(1):46-8

[47] Rosano TG, Lin J. Ethyl glucuronide excretion in humans following oral administration of and dermal exposure to ethanol. *J Anal Toxicol*; 2008; 32(8):594-600

[48] Høiseth G, Bernard JP, Stephanson N, Normann PT, Christophersen AS, Mørland J, Helander A. Comparison between the urinary alcohol markers EtG, EtS, and GTOL/5-HIAA in a controlled drinking experiment. *Alcohol Alcohol*; 2008; 43(2):187-91

[49] Erim Y, Böttcher M, Dahmen U, Beck O, Broelsch CE, Helander A. Urinary ethyl glucuronide testing detects alcohol consumption in alcoholic liver disease patients awaiting liver transplantation. *Liver Transpl*; 2007; 13(5):757-61

[50] Høiseth G, Kristoffersen L, Larssen B, Arnestad M, Hermansen NO, Mørland J. In vitro formation of ethanol in autopsy samples containing fluoride ions. *Int J Legal Med*; 2008; 122(1):63-6

[51] Høiseth G, Bernard JP, Karinen R, Johnsen L, Helander A, Christophersen AS, Mørland J. A pharmacokinetic study of ethyl glucuronide in blood and urine: applications to forensic toxicology. *Forensic Sci Int*; 2007; 172(2-3):119-24

[52] Wurst FM, Wiesbeck GA, Metzger JW, Weinmann W. On sensitivity, specificity, and the influence of various parameters on ethyl glucuronide levels in urine--results from the WHO/ISBRA study. *Alcohol Clin Exp Res*; 2004; 28(8):1220-8

- [53] Consensus of the SoHT, Annual meeting of the Society of Hair Testing, Rome, Italia, October 2009
- [54] Use of Alcohol Markers in Hair for Abstinence Assessment, Expert meeting of the Society of Hair Testing, Rome, Italia, October 2011
- [55] Pragst F, Balikova M A. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta* ;2006; 370(1-2): 17-49,
- [56] JJ Stene. Physiologie du cheveu. *rev med Bruxelles* ; 1999
- [57] 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 Ana*; 2001; 26(8)584-585
- [58] Guerri C, Bazinet A, Riley EP. Fœtal alcohol spectrum disorders and alterations in brain and behavior. *alcohol and alcoholism*; 2009; 44(2):108-114
- [59] Caprara DL, Nash K, Greenbaum R, Rovet J, Koren G. Novel approaches to the diagnosis of fetal alcohol spectrum disorder. *neuroscience and biohehavioral reviews*; 2007; 31(2):254-260
- [60] Bearer CF, Gould S, Emerson R. fetal alcohol syndrome and fatty acid ethyl esters. *pediatric research*; 1992; 31(5):492-495
- [61] Chan D, Bar-oz B, Pellerin B. Population baseline of meconium fatty acid ethyl ester among infants of non drinking women in Jerusalem and Toronto. *therapeutic drug monitoring*; 2003; 25(3)271-278
- [62] Caprara DF, Brien JF, Iqbal U, Reynolds JN, Klein J. A guinea pig model for the identification of in utero alcohol exposure using fatty acid ethyl esters in neonatal hair. *pediatric research*; 2005; 58(6):1158-1163
- [63] Pichini S, Marchei E, Vagnarelli F, Tarani L, Raimondi F. Assessment of Prenatal Exposure to Ethanol by Meconium Analysis: Results of an Italian Multicenter Study. *alcoholism clinical and experimental research*; 2011; 36(3):417-424
- [64] Morini L, Falcon M, Pichini S, Garcia-Algar O, Danesino P, Groppi A, Luna A. Ethyl-glucuronide and ethyl-sulfate in placental and fetal tissues by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*; 2011; 418(1): 30-36

## **Table des matières:**

<b>Introduction :</b> .....	<b>1</b>
<b>L'éthylisme :</b> .....	<b>3</b>
<b>Epidémiologie de l'éthylisme :</b> .....	<b>5</b>
<b>Marqueurs biologiques de l'éthylisme :</b> .....	<b>8</b>
A) Généralités .....	8
B) Pharmacocinétique de l'éthanol .....	8
1) Absorption et distribution.....	8
2) Métabolisme .....	9
C) Les marqueurs biologiques .....	11
1) Les marqueurs indirects .....	11
- Les transaminases	
- La gamma glutamyl transférase	
- Le volume globulaire moyen	
- La transferrine déficiente en carbohydate	
2) Les marqueurs directs .....	13
- L'éthanol	
- L'éthylsulfate	
- Les esters d'acide gras et d'éthanol	
- Le phosphatidyléthanol	
- L'éthylglucuronide	
D) L'éthylglucuronide .....	16
1) Pharmacocinétique.....	17
2) Différentes méthodes d'analyse dans le cheveu .....	19
3) Dosage et applications de l'éthylglucuronide dans les autres matrices .....	21
4) Interprétation des concentrations capillaires et urinaires de l'éthylglucuronide ...	21
<b>Physiologie du cheveu</b> .....	<b>23</b>
A) Anatomie du cheveu .....	23
- La tige	
- Le bulbe	
- Les glandes annexes	
B) Cycle pileux .....	26
<b>Incorporation des drogues dans les cheveux</b> .....	<b>28</b>
A) L'absorption par les cellules matricielles .....	28
B) La fixation des molécules après kératinisation .....	29
C) Interactions entre la mélanine et les drogues .....	29
D) Biotransformations pouvant s'effectuer dans le cheveu .....	30
E) Autres voies d'incorporation dans le cheveu .....	30
F) Elimination des substances du cheveu .....	30
G) Intérêt toxicologique du cheveu .....	32

<b>Méthodes de dosage de l'éthylglucuronide .....</b>	<b>33</b>
A) Méthode d'analyse avec extraction solide .....	33
1) Principe général du dosage .....	33
2) Mode opératoire .....	33
3) Phase analytique .....	36
B) Méthode d'extraction sans extraction solide .....	38
<b>Résultats .....</b>	<b>39</b>
A) Optimisation de la chromatographie .....	39
B) Essai d'extraction par le méthanol et sans SPE .....	44
C) Résultats obtenus chez les patients abstinents .....	46
1) Recherche de la limite de quantification .....	47
2) Recherche de la limite de détection .....	48
3) Résultats de l'étude chez les patients abstinents .....	51
<b>Syndrome d'alcoolisation fœtale et les perspectives du dosage de l'éthylglucuronide .....</b>	<b>53</b>
A) Lésions et conséquences de la prise éthanol aux cours de la grossesse sur le développement fœtal du cerveau .....	54
1) Désordres observés chez les individus atteints de SAF .....	54
2) Pouvoir tératogène de l'éthanol sur les structures cérébrales .....	55
B) Marqueurs biologiques permettant de caractériser le SAF .....	56
1) Principe du dosage des esters d'acide gras et d'éthanol dans le méconium et les cheveux .....	57
2) Recherche de l'éthylglucuronide dans le méconium et les cheveux de nouveaux-nés .....	58
<b>Conclusion .....</b>	<b>60</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>61</b>

## **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.



# Dosage de l'éthylglucuronide dans les cheveux : optimisation analytique d'une méthode et application à des cheveux d'abstinents

Victor Floranty

---

## Résumé

L'éthylglucuronide est un métabolite mineur, mais spécifique, de l'éthanol permettant de caractériser la prise de boissons alcoolisées. Le dosage de l'éthylglucuronide dans les cheveux constitue, actuellement et probablement, le meilleur marqueur de l'alcoolisme chronique. Dans ce travail, une méthode analytique de dosage capillaire de l'éthylglucuronide préexistante a été optimisée. Une étape de pré-validation indique l'obtention finale d'une limite de détection et d'une limite de quantification de 2,5 et 5 pg/mg de cheveux, respectivement. Des cheveux de patients totalement abstinents ont été analysés. Les résultats indiquent des concentrations capillaires d'éthylglucuronide systématiquement inférieures à la limite de détection, dans cette population.

---

## Mots-clés

Ethylglucuronide, cheveux, chromatographie liquide avec détection par spectrométrie de masse en tandem, alcoolisme, abstinents, syndrome d'alcoolisation foetale

---

## Summary

Ethylglucuronide is a minor but specific metabolite of ethanol which can be used for the characterization of [alcoholic beverages](#) intake. Determination of ethylglucuronide in hair is [currently probably](#) the best marker for heavy drinking detection. In this work, a previously reported analytical method for ethylglucuronide determination in hair was optimized. Following a pre-validation step, the final obtained limit of detection and limit of quantitation are 2.5 and 5 pg / mg of hair, respectively. Hair samples of teetotallers were analyzed. Obtained results indicate ethylglucuronide concentrations systematically under the limit of detection in this population.

---

## Key words

Ethylglucuronide, hair, liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection, alcoholism, teetotallers, fetal alcohol spectrum disorders

---

Unité fonctionnelle de Toxicologie Biologique et Médico-légale  
Service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance  
CHU Dupuytren  
87042 Limoges