

UNIVERSITE DE LILLE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE DE LILLE

THESE DE DOCTORAT

Présentée en vue de l'obtention du grade de :

Docteur de l'Université de Lille

Domaine Scientifique : Département Biologie, Médecine et Santé

Spécialité : Pharmacologie / Toxicologie

**Développement, validation, mise en œuvre et applications
de méthodes de dosage de biomarqueurs de la consommation
d'éthanol : phosphatidyléthanol sanguin**

Soutenue publiquement le 4 octobre 2022, par

Florian HAKIM

JURY

Mme le Professeur Delphine Allorge , Université de Lille	Président du jury
M. le Professeur Aurélien Thomas , Université de Lausanne, Suisse	Rapporteur
M. le Professeur Benjamin Rolland , Université de Lyon	Rapporteur
Mme le Professeur Isabelle Morel , Université de Rennes	Examinateur
M. le Docteur Jean-michel Gaulier , CHU de Lille	Directeur de thèse

RESUME

Développement, validation, mise en œuvre et applications de méthodes de dosage de biomarqueurs de la consommation d'éthanol : phosphatidyléthanol sanguin

L'éthanol est une substance communément consommée et dont l'abus aigu ou chronique est associé à de nombreux problèmes cliniques et sociétaux. Actuellement, les biomarqueurs directs d'une consommation d'alcool, utilisés en routine, permettent d'estimer la consommation d'alcool ayant eu lieu dans les dernières heures, voire les derniers jours (jusqu'à environ 72 heures). Cette fenêtre de détection relativement étroite ne permet pas d'évaluer la consommation d'alcool ayant eu lieu antérieurement, plusieurs jours ou plusieurs semaines auparavant. Ainsi, dans de nombreuses situations, ces biomarqueurs directs ne permettent pas de répondre aux questions des cliniciens. Par exemple, lors d'un suivi de sevrage alcoolique, une fois la fenêtre de détection de 72 heures des biomarqueurs directs actuels dépassée, le clinicien ne dispose plus d'outils biologiques pour objectiver l'abstinence du patient. Concernant les biomarqueurs indirects, d'une part leur spécificité reste imparfaite et d'autre part ils ne commencent à se normaliser qu'après une phase de latence relativement importante (par exemple 2 semaines pour la transferrine carboxy-déficiente). Ainsi, ils ne permettent pas un suivi direct « en temps réel » du sevrage, ce qui ne favorise pas la motivation du patient. Dans le but de répondre aux besoins des cliniciens, nous avons développé et validé selon la norme NF EN ISO 15189 une méthode de dosage sanguin du phosphatidyléthanol (PEth) 16:0/18:1 par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Ce biomarqueur direct cumulatif dispose d'une fenêtre de détection accrue de 28 jours permettant une évaluation quantitative de la consommation d'alcool. De plus, contrairement aux marqueurs indirects, sa décroissance est *quasi* immédiate à l'arrêt de la consommation. Afin d'améliorer l'estimation des habitudes de consommations d'alcool des patients, nous avons ajouté à cette méthode deux autres biomarqueurs : le PEth 16:0/20:4 et l'éthylglucuronide sanguin ayant respectivement des fenêtres de détection de 14 et 2 jours. Ainsi, cette méthode de dosage associant plusieurs biomarqueurs permet de détecter aussi bien une consommation aiguë récente qu'une consommation chronique datant de plusieurs semaines. Cette méthode a pu être éprouvée par sa mise en place en routine au CHU de Lille ainsi qu'à travers des études cliniques. Elle a montré tout son intérêt face aux « gold standards » actuels utilisés dans le suivi de l'abstinence, notamment dans le cadre du suivi des patients en attente d'une greffe hépatique. Cet intérêt lui a valu d'être intégrée au contrat thérapeutique du dépistage des rechutes et du suivi de sevrage en service d'addictologie (protocole de recherche clinique PETHOXICO). En conclusion, le phosphatidyléthanol est un biomarqueur prometteur malgré un développement analytique complexe. Il permet une meilleure appréciation des habitudes de consommation d'alcool ainsi qu'un meilleur suivi de l'abstinence que les biomarqueurs actuels répondant ainsi aux besoins des cliniciens. Les perspectives de ce travail sont nombreuses. Plusieurs protocoles de recherches utilisant le PEth sont en cours, notamment en obstétrique pour le suivi et la prévention de la consommation d'alcool chez la femme enceinte. L'utilisation du PEth a également un attrait dans le cadre médico-légal

que ce soit chez le vivant, concernant la restitution de permis de conduire, ou en *post-mortem* dans la recherche des causes de la mort.

Mots clés : Phosphatidyléthanol (PEth), Chromatographie Liquide avec détection par Spectrométrie de Masse en tandem (CL-SM/SM), Dried Blood Spot (DBS), Ethanol, Validation

**Unité Fonctionnelle de Toxicologie - Centre de Biologie-Pathologie
CHU de LILLE Bd du Pr. J. Leclercq - CS 70001
59037 LILLE Cedex, France**

ABSTRACT

Development, validation, implementation and applications of ethanol consumption biomarkers assays: phosphatidylethanol in blood

Ethanol is a widely consumed substance, whose chronic or acute abuse is associated with many clinical and societal issues. Currently, direct biomarkers used routinely to detect alcohol consumption estimate alcohol consumption that has occurred in the last few hours or days (up to about 72 hours). Hence, not allowing the assessment of alcohol consumption that occurred before the last few days. Thus, in many situations, they do not meet the needs of clinical services. For example, in the case of alcohol withdrawal monitoring, once the 72-hour detection window of the current direct biomarkers has been exceeded, clinicians no longer have the analytical tools to objectify the patient's abstinence. Regarding indirect biomarkers, on the one hand, their specificity remains imperfect and, on the other hand they only start to normalize after a relatively long latency phase (e.g., 2 weeks for carboxy-deficient transferrin). Thus, they do not allow direct "real time" monitoring of withdrawal, which does not encourage patient motivation.

In order to meet the needs of clinicians, we have developed and validated according to the NF EN ISO 15189 standard a method for the determination of phosphatidylethanol (PEth) 16:0/18:1 in blood by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. This direct cumulative biomarker has an increased detection window of 28 days allowing for a quantitative assessment of alcohol consumption. In addition, unlike indirect markers, its decrease is almost immediate upon cessation of consumption. In order to refine the estimation of patients' alcohol consumption habits, we added to this method two other biomarkers: PEth 16:0/20:4 and blood ethylglucuronide with detection windows of 14 and 2 days respectively. Thus, this assay method combining several biomarkers can detect both recent acute consumption and chronic consumption dating back several weeks. This method has been proven by its routine implementation at the Lille University Hospital as well as in clinical studies. It has shown its usefulness, even its superiority to the current "gold standards" used in the monitoring of abstinence, particularly in the context of monitoring patients awaiting a liver transplant.

Its clinical usefulness has also led to its inclusion in the therapeutic contract for screening relapses and monitoring withdrawal in addictology, which has been the subject of a clinical research protocol, PETHOXICO. In conclusion, phosphatidylethanol is a promising biomarker despite its complex analytical development. It allows a better assessment of alcohol consumption habits and a better follow-up of abstinence than current biomarkers, thus meeting the needs of clinicians. The prospects generated by this work are numerous. Several research protocols using PEth are currently underway, notably in obstetrics for the follow-up and prevention of alcohol consumption in pregnant women. The use of PEth is also appealing in forensic contexts, whether in the living population, concerning the restitution of driving licenses, or in *post-mortem* contexts involving causes of death investigations.

Key words: Phosphatidylethanol (PEth), Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry detection (LC-MS/MS), Dried Blood Spot (DBS), Alcohol, Validation

RESUMES TOUT PUBLIC

Français

L'éthanol est une substance communément consommée et dont l'abus (aigu ou chronique) est associé à de nombreux problèmes cliniques et sociétaux. Les biomarqueurs directs (c'est-à-dire, l'éthanol lui-même et ses métabolites) d'une consommation d'alcool qui sont actuellement utilisés ne permettent pas de détecter et d'estimer cette consommation au-delà de quelques jours. D'autres biomarqueurs, indirects, qui ne sont pas liés uniquement à la consommation d'alcool, nécessitent plusieurs semaines pour se normaliser en cas de sevrage d'alcool. Ces deux inconvénients (c'est-à-dire une détection de trop courte durée et un long délai de normalisation du biomarqueur) sont à l'origine de ce travail. Ce manuscrit décrit le développement d'une méthode de dosage d'un nouveau biomarqueur direct, de longue durée de détection (un mois) et de court délai de modification, et son application dans divers contextes comme l'addiction à l'alcool, la consommation pendant la grossesse, ou les greffes de foie.

Anglais

Ethanol is a widely consumed substance whose abuse is associated with various societal issues and pathologies. Currently used biomarkers of alcohol consumption allow a maximum detection period from several hours to a few days. Other so-called indirect biomarkers, which are not exclusively produced by alcohol consumption, require several weeks to normalize when alcohol consumption is stopped. The lack of biomarkers solving these two drawbacks (*i.e.*, the short detection period of alcohol consumption and the long delay of biomarker normalization) is the origin of this work. This manuscript reports the development of an assay method of a new biomarker with a long detection period of alcohol consumption (one month) and a short modification time, followed by its application in various contexts such as alcohol addiction, consumption during pregnancy, or liver transplantation.

REMERCIEMENTS

A mes juges :

Monsieur le Professeur Benjamin ROLLAND

PU-PH, Responsable du Service d'Addictologie, CHU de Lyon

Je suis honoré que vous ayez accepté de juger cette thèse en tant que rapporteur. Je vous remercie pour votre disponibilité, veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements les plus sincères et de mon grand respect.

Monsieur le Professeur Aurélien THOMAS

Professeur, Centre universitaire romand de médecine légale, Lausanne, Suisse

Je suis honoré que vous ayez accepté d'être membre de mon CSI et de juger cette thèse en tant que rapporteur. Je vous remercie pour votre bienveillance et vos conseils durant ces trois années. Je vous remercie également pour votre disponibilité dans la lecture de ce manuscrit.

Madame le Professeur Isabelle MOREL

PU-PH, Laboratoire de Toxicologie du CHU de Rennes

Je suis honoré que vous ayez accepté d'être membre de mon CSI et de juger cette thèse en tant qu'examinateur. Je vous remercie pour votre bienveillance et vos conseils durant ces trois années. Je vous remercie également pour votre disponibilité dans la lecture de ce manuscrit.

Madame le Professeur Delphine ALLORGE

PU-PH, Laboratoire de Toxicologie du CHU de Lille.

Je te remercie de m'avoir aidé dans le développement de mon projet d'interne, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de toxicologie et d'œuvrer pour mon développement professionnel. Je te remercie chaleureusement pour la confiance que tu m'accordes.

A mon directeur de thèse :

Monsieur le Docteur Jean-Michel GAULIER

PH, Laboratoire de Toxicologie du CHU de Lille

Je te remercie pour ton implication dans tous mes travaux, pour tes conseils avisés, ta franchise et ton écoute qui m'ont été indispensables dans la réalisation de cette thèse. J'ai un grand plaisir à travailler avec toi.

Je tiens également à remercier tout particulièrement :

Mes collègues : Marie, Romain, Alexandr, Corentin, Benjamin et Nicolas pour leur aide indispensable à la réalisation de ce projet. Je les remercie également pour leur bonne humeur et leur support.

Le Dr. Elizabeth VINNER pour son aide précieuse et le temps qu'elle m'a accordé pour aborder les méandres de la Qualité au laboratoire.

Je remercie également l'équipe du laboratoire de toxicologie pour leur aide indispensable à la réalisation de ce projet.

Je remercie également mes parents, ma sœur et mon frère pour leur soutien tout au long de ces années.

Enfin je remercie Laura, ma femme, pour son soutien quotidien indéfectible, son enthousiasme dans mes projets professionnels et sa force à toute épreuve. Et ce, durant l'écriture de sa propre thèse. Je te remercie également pour Emie, ma fille, source intarissable de distractions nécessaires dans l'écriture de cette thèse.

TABLE DES MATIERES

Résumé	3
Abstract	5
Résumés tout public	6
Remerciements	7
Table des matières	9
Liste des abréviations	13
Liste des figures	15
Liste des tableaux	18
Liste des travaux en lien avec la thèse	19
Introduction	21
Partie 1 – Cadre théorique	23
Chapitre I - L'éthanol	25
1. L'alcool en France	25
2. Métabolisme toxique de l'éthanol	26
3. Pharmacocinétique de l'éthanol	28
3.1. Absorption, distribution et élimination	28
3.2. Métabolisme	28
3.2.1. Métabolisme oxydatif	28
3.2.2. Métabolisme non oxydatif	29
3.3. Variabilité interindividuelle et intra individuelle	29
4. Troubles liés à l'usage de l'alcool et sevrage	30
4.1. Définitions	30
4.2. Recommandations des différentes autorités de santé sur les risques de la consommation d'alcool ³¹	
4.2.1. Alcoolisation aigüe	31
4.2.2. Alcoolisation chronique	32
4.3. Dépistage	33
4.4. Alcool et grossesse	33
4.5. Hépatopathies alcooliques et transplantations	33
4.6. Alcoolisation et conduite automobile	34
5. En situation post-mortem	35
5.1. Redistribution post-mortem	35
5.2. Focus sur la fermentation	35
5.3. Quelles solutions ?	36
6. Les biomarqueurs d'une exposition à l'éthanol	37

6.1. Les marqueurs indirects : liés à des modifications métaboliques chez les alcooliques chroniques	37
6.1.1. Transaminases	37
6.1.2. Volume Globulaire Moyen	37
6.1.3. Gamma-Glutamyl Transférase : enzyme membranaire des hépatocytes	37
6.1.4. Transferrine désialylée	37
6.2. Les marqueurs directs (Éthanol et métabolites mineurs)	38
6.2.1. Éthanol	38
6.2.2. Ethylglucuronide	38
6.2.3. Ethyl-Esters d'Acides Gras	39
6.2.4. Phosphatidyléthanol	39
6.2.5. Ethylsulfate	39
6.2.6. Cocaéthylène	39
6.3. Utilisation de ces marqueurs dans l'alcoolisation aiguë	39
6.4. Utilisation de ces marqueurs dans l'alcoolisation chronique	40
Chapitre II - Le Phosphatidyléthanol	43
1. Généralités	43
2. Stabilité	44
3. Valeurs seuils d'interprétation	45
4. Méthodes d'analyses	48
Article 1	50
Chapitre III - Problématique	61
1. Bilan du point de vue du toxicologue-analyste	61
2. État des lieux au laboratoire de toxicologie du CHU de Lille et stratégie analytique et applicative	62
Partie 2 - Travail personnel	63
Chapitre I - Travaux Analytiques	65
1. Phosphatidyléthanol et éthylglucuronide sanguin	65
1.1. Équipement	65
1.2. Phase préanalytique	66
1.2.1. Méthodes de prélèvement	66
1.2.2. Transfert sur papier buvard	68
1.2.3. Extraction du PEth à partir des DBS	69
1.2.4. Synthèse pré analytique	71
1.3. Phase analytique	71
1.3.1. Première méthode de séparation chromatographique	71
1.3.2. Méthode de séparation chromatographique actuelle	76
1.3.3. Détection par spectrométrie de masse	77
1.3.4. Essai de vérification de stabilité	78
1.3.5. Validation	78

1.3.6.	Etude de stabilité et néoformation _____	81
Article 2:	_____	82
1.3.7.	Validation et néoformation sur dispositif Neoteryx Mitra™ _____	111
2.	Éthylglucuronide dans les cheveux _____	114
2.1.	Les cheveux : matrice d'incorporation de molécules endogènes comme de xénobiotiques _____	114
2.2.	L'éthylglucuronide _____	116
2.3.	Équipement _____	116
2.4.	Phase préanalytique _____	116
2.4.1.	Méthode de prélèvement et conservation _____	116
2.4.2.	Décontamination des cheveux _____	117
2.4.3.	Découpe des cheveux _____	117
2.4.4.	Prise d'essai _____	117
2.4.5.	Solutions mères et gammes de calibrations _____	117
2.4.6.	Extraction de l'éthylglucuronide _____	118
2.5.	Phase analytique _____	119
2.5.1.	Séparation chromatographique _____	119
2.5.2.	Infusion de l'EtG et l'EtG-D5 _____	119
2.6.	Validation _____	119
	<i>Chapitre II – Application de la méthode d'analyse _____</i>	121
1.	Intérêt d'une méthode multi analyte _____	121
2.	Mise en œuvre en routine du PEth et de l'EtG _____	121
2.1.	Transplantation hépatique _____	123
Communication 1	_____	124
Communication 2	_____	126
Article 3	_____	128
2.2.	Addictologie _____	140
Communication 3	_____	141
Communication 4	_____	144
2.3.	Obstétrique _____	146
Communication 5	_____	147
2.4.	Néonatalogie _____	150
Communication 6	_____	151
2.5.	Médico-légal _____	154
Communication 7	_____	155
Article 4	_____	158
3.	Etudes cliniques _____	162
3.1.	PETHOXICO _____	162
3.1.1.	Mise en œuvre _____	162
3.1.2.	Résultats préliminaires _____	162
3.1.3.	Conclusion _____	165
Communication 7	_____	167
3.2.	AUTOQUEST _____	170

Chapitre III - Perspectives	171
1. Toxicologie biologique	171
1.1. Transplantation	171
1.2. Addictologie	171
1.3. Obstétrique et Néonatalogie	172
2. Toxicologie médico-légale	173
2.1. Chez le vivant	173
2.2. En <i>post-mortem</i>	173
Conclusion	175
Références	177

LISTE DES ABREVIATIONS

AAP : AntiAgrégant Plaquettaire
ADH : Alcool DésHydrogénase
ALDH : ALdéhyde DésHydrogénase
ALAT : ALanine AminoTransférase
ALD: Alcoholic Liver Disease (hépatopathies alcooliques)
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ASAT : ASpartate AminoTransférase
AUC : Aire sous la Courbe
AVP : Accidents de la Voie Publique
BAC : Blood Alcohol Concentration
BAR : Bombardement par des Atomes Rapides
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CDT : Carbohydre Deficient Transferrin (transferrine désialylée)
CL : Chromatographie Liquide
CoFrAc : Comité Français d'Accréditation
CPP : Comité de Protection des Personnes
CV : Coefficient de Variation
CYP: Cytochrome P450
DBS: Dried Blood Spot
EASL : Société européenne d'hépatologie
EDTA : Éthylènediaminetétraacétique
EI : Étalon Interne
EQA : External Quality Assesement
ETCAF : Ensemble des Troubles Causés par l'Alcoolisation Fœtale
EtOH : Ethanol
EtS : EthylSulfate
ESI : ElectroSpray Ionization (ionisation par électronébuliseur)
EtG : EthylGlucuronide
FAB-MS: Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry
FAEE : Esters éthyliques d'acides gras
GGT : Gamma-Glutamyl Transférase
GR : Globule Rouge
GSH : Glutathion réduit
HCT : Hematocrit
HEPARG : cellules de lignées hépatiques
HEPT : Hauteur Équivalente de Plateaux Théoriques
HV : Humeur Vitrée
LDD : Limite De Détection
LIDQ : Limite Inférieure De Quantification
LLOQ : Lower Limite Of Quantification
LOD : Limit Of Detection
LSDQ : Limite Supérieure De Quantification

MAF : Maladie Alcoolique du Foie
ME : Matrix Effect
MEOS: Metabolizing Ethanol Oxidative System (système microsomial d'oxydation de l'éthanol)
MIN : Mort Inattendue du Nourrisson
NIAAA: National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
PA : Acide Phosphatidique
PC : PhosphatidylCholine
PEth : PhosphatidylEthanol
PLD : PhosphoLipase D
PSI : livre-force par pouce carré
QC : Quality Control
SAF : Syndrome d'Alcoolisation Fœtale
Se : Sensibilité
SM : Spectrométrie de Masse
SOHT : Society Of Haire Testing
Sp : Spécificité
SPE : Solid Phase Extraction
TCAF : Troubles Causés par l'Alcoolisation Fœtale
TH : Transplantation Hépatique
TUA : Troubles liés à l'Usage d'Alcool
ULOQ : Upper Limit Of Quantification
UGT : UDP-Glucuronyl-Transférases
US : Unité standard
VAMS : Dispositifs volumétrique de prélèvement capillaire (Volumetric Absorptive MicroSampling device)
VGM : Volume Globulaire Moyen

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Évolution de la quantité d'alcool consommée quotidiennement depuis 1961	25
Figure 2 : Mécanismes de la toxicité induite par le métabolisme de l'éthanol.....	27
Figure 3 : métabolisme oxydatif de l'éthanol.....	28
Figure 4 : Evolution de l'éthanolémie dans le temps selon le titre alcoolique de la boisson consommée (alcools forts en rouge, vin en noir, bière en violet) d'après Mitchell MC. 2014 (7)	29
Figure 5 : Ethanolémie en mg/dL à jeun (rond vide) et immédiatement après le petit déjeuner (rond plein) d'après Lands WEM. 1998 (8).....	30
Figure 6 : Législation relative aux seuils d'éthanolémie en conduite automobile.....	34
Figure 7: Molécule d'EtG.....	38
Figure 8 : Formation du PEth à partir de la PC.....	43
Figure 9 : Noyau de PEth avec ses deux radicaux R1 et R2	43
Figure 10: Evolution de la concentration en PEth en fonction de la consommation journalière chez l'homme (en bleu) et chez la femme (en rose). La médiane est représentée par la courbe noire, les écarts interquartiles par les bandes de couleur, la valeur-seuil d'interprétation de 200 µg/L par la droite verte en pointillés et la limite inférieure de quantification (LIDQ) de 20 µg/L par la ligne en pointillés noire. Selon Simon TW. 2018 (75).....	47
Figure 11: Evolution de la concentration en PEth en fonction de la consommation de 3 doses d'alcool à intervalle variable (1j/2, 1j/3, 1j/5) chez l'homme (en bleu) et chez la femme (en rose). La médiane est représentée par la courbe noire, les écarts interquartiles par les bandes de couleur, la valeur-seuil d'interprétation de 200 µg/L par la droite verte en pointillés et la LIDQ de 20 µg/L par la ligne en pointillés noire. Selon Simon TW. 2018 (75).....	48
Figure 12 : Résultat d'une recherche « phosphatidyléthanol » dans le titre ou l'abstract sur PubMed le 15/06/2022,.....	49
Figure 13 : Spectromètre de masse : CL-SM/SM XEVO TQ-S (source : www.waters.com, consulté le 20/07/2022).....	65
Figure 14 : Exemples (non exhaustif) de dispositifs volumétriques de prélèvements capillaires (VAMS) (Source : site des fabricants respectifs, consulté le 20/07/2022)	67
Figure 15 : Exemple (non exhaustif) de buvards sur lesquels sont transféré 10 µL de sang total (Source : site des fabricants respectifs, consulté le 20/07/2022)	68
Figure 16: Courbe de Van Deemter Plot.....	72
Figure 17: Premiers essais selon la méthode J.Dégion 2018.....	72
Figure 18: Chromatogramme selon la molarité d'acétate d'ammonium (2 mM à gauche et 5 mM à droite)	73
Figure 19: Chromatogramme selon la molarité d'acétate d'ammonium (10 mM).....	73

Figure 20: Chromatogramme selon le pH (3,7 à gauche et 4,7 à droite).....	74
Figure 21:Chromatogramme selon le débit (de gauche à droite : 0,4 ; 0,45 et 0,5 mL/min). 74	
Figure 22 : Chromatogramme selon la température de colonne (de gauche à droite: 60, 50 et 40°C)	75
Figure 23: Chromatogramme selon la température de colonne (de gauche à droite: 30, 25 et 20°C)	75
Figure 24: Comparaison des chromatogrammes d'un gradient moins efficace (test 11) et du plus efficace (test 20).....	76
Figure 25: Résultats de l'étude de corrélation Whatman 903™ vs Neoteryx Mitra™ pour le PEth 16:0/18:1	111
Figure 26: Résultats de l'étude de corrélation Whatman 903™ vs Neoteryx Mitra™ pour le PEth 16:0/20:4	112
Figure 27: Résultats de l'étude de corrélation Whatman 903™ vs Neoteryx Mitra™ pour l'EtG	112
Figure 28: Néof ormation dans les échantillons contenant du PEth à H0.....	113
Figure 29 : Représentation schématique de la structure des cheveux (source : https://www.cliniqueesthetique.com/cheveux , consulté le 20/07/2022).....	115
Figure 30: structure chimique de l'éthylglucuronide.....	116
Figure 31: Dosages mensuels sanguins cumulés de PEth de mars 2019 à mars 2022.....	121
Figure 32: Evolution de la répartition des services prescripteurs de PEth. Effectifs : 554 prescriptions en 2019, 968 en 2020, 1455 en 2021 et 1727 en 2022	122
Figure 33 : Prescripteurs extérieurs envoyant leurs demandes de phosphatidyléthanol au CHU de Lille.....	123
Figure 34: Répartition des concentrations en PEth lors de l'inclusion, la ligne en pointillé correspond à une concentration de 20 µg/L et celle en trait plein à une concentration de 200 µg/L (n=37, Whiskers 10-90 percentile).....	163
Figure 35: Concentrations sanguines en PEth 16:0/18:1 et 16:0/20:4 dans une population de patients hospitalisés pour sevrage alcoolique à l'admission et à la sortie (n=37, Whiskers 10-90 percentile).....	163
Figure 36: Demi-vie des PEth 16:0/18:1 et 16:0/20:4 dans une population de patients hospitalisés pour sevrage alcoolique (n=37, Whiskers 10-90 percentile).....	164
Figure 37: Demi-vie des PEth 16:0/18:1 et 16:0/20:4 dans une population de patients hospitalisés pour sevrage alcoolique. Population de sexe masculin (n=27, Whiskers 10-90 percentile)	165
Figure 38: Demi-vie des PEth 16:0/18:1 et 16:0/20:4 dans une population de patients hospitalisés pour sevrage alcoolique. Population de sexe féminin (n=10, Whiskers 10-90 percentile)	165

Figure 39: Biomarqueurs d'intérêts disponibles au CHU de Lille 171

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Recommandations des principales sociétés savantes concernant l'alcoolisation aiguë.....	31
Tableau 2: Recommandations des principales sociétés savantes concernant l'alcoolisation chronique.....	32
Tableau 3 : Biomarqueurs de la consommation aiguë d'alcool.....	40
Tableau 4 : Biomarqueurs de la consommation chronique d'alcool.....	41
Tableau 5: Récapitulatif des études indiquant une valeur seuil d'interprétation d'environ 200 µg/L de PEth.....	45
Tableau 6: Méta-analyse des relations entre les concentrations de PEth et la quantité d'alcool ingérée d'après Ulwelling W. (66).....	46
Tableau 7 : Méthode de dilution des solutions mères et préparation des solutions méthanolique pour la gamme de calibration.....	70
Tableau 8: Tableau regroupant les essais de gradients significatifs.....	76
Tableau 9: Résumé des paramètres chromatographique de la nouvelle méthode.....	77
Tableau 10 : Résumé des paramètres ESI et SM optimaux, * : ions quantifieurs.....	78
Tableau 11: Résumé des paramètres de validation.....	79
Tableau 12: Résumé des résultats de validation de méthode.....	80
Tableau 13 : Tableau retraçant la méthode de dilution des solutions mères et la constitution de la gamme de calibration et des échantillons patients.....	118
Tableau 14 : Résumé des résultats préliminaires de l'étude PETHOXICO (n=37).....	166

LISTE DES TRAVAUX EN LIEN AVEC LA THESE

Articles et revues

1. **Hakim F**, Wiart JF, Richeval C, Gicquel T, Scliffet D, Cottencin O, Allorge D, Gaulier JM. Analytical method dedicated to routine phosphatidylethanol 16:0/18:1, 16:0/20:4 and ethylglucuronide simultaneous determination in dried blood spots: additional data related to stability and real case illustrations. *Submitted to CCLM*.
2. Dharancy S, Gaulier JM, Lemahieu V, Allorge D, **Hakim F**. Les nouveaux biomarqueurs directs de consommation d'alcool. *Hépatogastro et Oncologie digestive* 2022;28(1):54-60. doi.org/10.1684/hpg.2022.2354
3. **Hakim F**, Gicquel T, Allorge D, Gaulier JM. Comments on "Evaluation and review of ways to differentiate sources of ethanol in post-mortem blood". *Int J Legal Med*. 2021;135(4):1477-1479. doi: 10.1007/s00414-021-02529-8.
4. **Hakim F**, Wiart JF, Ménard O, Allorge D, Gaulier JM. Phosphatidylethanol blood analysis. Dosage sanguin du phosphatidyléthanol. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2019;77(6):638–644. doi: 10.1684/abc.2019.1499

Abstracts

1. Menard O, **Hakim F**, Guenard C, Gaulier JM, Allorge D, Canva V, Lassailly G, Cottencin O, Louvet A, Mathurin P, Dharancy S. Usefulness of phosphatidylethanol and urinary ethyl glucuronide to monitor alcohol abstinence in patients awaiting liver transplantation. *J Hepatol* 2020;73:S274. doi: 10.1016/S0168-8278(20)31052-7
2. **Hakim F**, Hassaine S, Gicquel T, Gomez V, Wiart JF, Richeval C, Scliffet D, Cottencin O, Allorge D, Gaulier JM. Intérêt des Dried Blood Spots pour stabiliser des analytes in vitro : exemple du phosphatidyléthanol 16:0/18:1. *Toxicol Anal Clin* 2021;33(s3):s27. doi : 10.1016/j.toxac.2021.06.028
3. **Hakim F**, Ménard O, Wiart JF, Van Der Henst L, Richeval C, Allorge D, Gaulier JM. Dosage sanguin du phosphatidyléthanol 16:0/18:1, un outil d'évaluation de la consommation de boissons alcoolisées : intérêts et retour d'expérience de sa mise en œuvre en pratique. *Toxicol Anal Clin* 2021;33(1):37-38. doi : 10.1016/j.toxac.2020.10.079
4. Gaulier JM, **Hakim F**, Van Der Henst L, Tartar O, Bordat R, Wiart JF, Richeval C, Allorge D. Place et perspectives du dosage sanguin du phosphatidyléthanol 16:0/18:1 chez le nouveau-né. *Toxicol Anal Clin* 2020;32(4):s29. doi: 10.1016/j.toxac.2020.09.060
5. **Hakim F**, Wiart JF, Van Der Henst L, Tartar O, Bordat R, Richeval C, Ménard O, Allorge D, Gaulier JM. Aspects techniques, pratiques et diagnostiques de la mise en œuvre en routine d'une méthode de dosage sanguin du phosphatidyléthanol 16:0/18:1. *Toxicol Anal Clin* 2020;32(4):s22. doi: 10.1016/j.toxac.2020.09.049

Communications

1. **Hakim F**, Wiart JF, Allorge D, Gaulier JM Laboratory session: Laboratory of Toxicology - CHU Lille Annual Congress of the The Society of PEth research (PEth-NET) "PEth in mind", Bâle, Suisse, Mai 2022 (Orale)

2. **Hakim F**, Wiart JF, Gicquel T, Scliffet D, Cottencin O, Allorge D, Gaulier JM. Preliminary results of blood PEth16:0/18:1, PEth16:0/20:4 and ethylglucuronide (EtG) simultaneous determinations in a clinical study in a population of patients hospitalized for withdrawal Annual Congress of the The Society of PEth research (PEth-NET) "PEth in mind", Bâle, Suisse, Mai 2022 (Orale)
3. **Hakim F**, Wiart JF, Allorge D, Gaulier JM. Dosage sanguin de phosphatidyléthanol sur tache de sang séché (DBS) : intérêt de ce biomarqueur d'alcoolisation. 61ème Réunion Italo Belgo Franco-Suisse, Spa, Belgique, Octobre 2021 (Orale)
4. **Hakim F**, Hassaine S, Gicquel T, Gomez V, Wiart JF, Richeval C, Scliffet D, Cottencin O, Allorge D, Gaulier JM. Intérêt des Dried Blood Spots pour stabiliser des analytes in vitro: exemple du phosphatidyléthanol 16:0/18:1. 29e Congrès Annuel de la Société Française de Toxicologie Analytique, Biarritz, France, septembre 2021 (Orale)
5. Lenski M, Grenier C, Billotte M, Mazeau G, Riquet A, Gish A, **Hakim F**, Beauval N, Hennart B, Allorge D, Gaulier JM. Cas d'intoxication éthylique aiguë chez un nourrisson : considérations médico-légales et clinico-biologiques. 29ème Congrès de la Société Française de Toxicologie Analytique, 59ème Congrès de la Société de Toxicologie Clinique, Biarritz, France, Septembre 2021 (Poster)
6. Menard O, **Hakim F**, Guenard C, Gaulier JM, Allorge D, Canva V, Lassailly G, Cotencin O, Louvet A, Mathurin P, Dharancy S. Usefulness of phosphatidylethanol and urinary ethyl glucuronide to monitor alcohol abstinence in patients awaiting liver transplantation. EASL: The Digital International Liver Congress, Août 2020 (Poster)
7. **Hakim F**, Ménard O, Wiart JF, Van Der Henst L, Richeval C, Allorge D, Gaulier JM. Dosage sanguin du phosphatidyléthanol 16:0/18:1, un outil d'évaluation de la consommation de boissons alcoolisées : mise en œuvre, retour d'expérience et intérêt clinique. 58ème congrès de la STC, Bordeaux, France, septembre 2020 (Poster)
8. Menard O, **Hakim F**, Guenard C, Gaulier JM, Lassailly G, Canva V, Allorge D, Louvet A, Mathurin P, Dharancy S, Cottencin O. Nouveaux biomarqueurs d'alcoolisation : une révolution en transplantation hépatique ? Journée de la Société Française d'Alcoologie « Alcoologie, addictologie : nouvelles pratiques, nouveaux acteurs, nouveaux enjeux », Paris, France, mars 2020 (Poster)
9. **Hakim F**, Ménard O, Wiart JF, Van Der Henst L, Richeval C, Allorge D, Gaulier JM. Phosphatidyléthanol, biomarqueur d'alcoolisation : intérêt pratique. Journées d'Endocrinologie Diabétologie Métabolisme, Lille, France, Mars 2020 (Orale)
10. Gaulier JM, **Hakim F**. Dosage sanguin de phosphatidyléthanol sur DBS (Dried Blood Spot) : intérêt de ce biomarqueur d'alcoolisation. 4ème Journée de Spectrométrie de Masse en Endocrino-Métabolisme, Paris, France, novembre 2019 (Orale)

INTRODUCTION

« Dès qu'apparaissent les hommes dans le lointain de l'Histoire, nous les voyons adonnés à l'usage de certaines substances dont la destination n'est pas de les nourrir, mais de leur procurer, lorsqu'ils en sentent le besoin, un état passager d'agréable euphorie et de confort, une impression d'accroissement de leur bien-être subjectif. »... ces mots sont ceux du pharmacologue Louis Lewin (1850-1929), auteur de la première classification scientifique des drogues à laquelle appartient l'alcool. Cette substance a longtemps été considérée comme un remède, tant par certains lobbies que par certains médecins contemporains, notamment par l'instrumentalisation de la célèbre citation de Pasteur « *Le vin est la plus saine et la plus hygiénique des boissons* » (1866). Clairement, le propos n'est donc plus de débattre des effets bénéfiques de l'alcool. En ce sens, l'étude de référence parue dans le Lancet en 2018, analysant l'impact de la consommation d'alcool sur plus de 25 ans, a clos le débat et a été résumée par le directeur général de Santé publique France, François Bourdillon, par la phrase suivante : « *Les minimales et très sélectifs effets protecteurs de l'alcool sont réduits à néant par ses effets délétères* ».

Dès lors, ce travail s'intéresse aux outils pouvant être mis à disposition des cliniciens pour réduire la consommation d'alcool, que ce soit par de la prévention ou par le suivi de sevrage et d'abstinence. L'outil ou biomarqueur parfait, permettant une vision précise et certaine des consommations, quelles que soient leurs fréquences, leurs chronologies et leurs ampleurs, n'existe pas. Le meilleur moyen de s'en approcher est de cumuler des outils ou biomarqueurs dont les avantages et les inconvénients sont complémentaires.

C'est précisément l'objet de ce manuscrit dans lequel je relate le développement et la validation d'une méthode de dosage simultanée de plusieurs biomarqueurs de la consommation d'alcool, tout en apportant des exemples d'applications de cette méthode analytique sur plusieurs versants : en pratique clinique par son utilisation en routine au CHU de Lille, dans des protocoles de recherches et dans des contextes médico-légaux que ce soit chez le vivant ou en *post-mortem* dans le cadre de recherches de causes de la mort.

Ainsi, ce manuscrit se propose, dans une première partie, (1) de resituer l'alcool dans son contexte épidémiologique et toxicologique, (2) de définir les troubles liés à l'usage de l'alcool et rappeler les recommandations actuelles des différentes autorités de santé et (3) de présenter les différents biomarqueurs utilisés pour détecter une consommation aiguë comme chronique d'éthanol ainsi que leurs avantages et inconvénients avec un accent particulier sur le phosphatidyléthanol.

Le développement de la méthode analytique de son dosage ainsi que les difficultés rencontrées et les solutions que nous avons pu apporter sont détaillées dans une seconde partie, ainsi que l'étape de validation de cette méthode analytique selon la norme NF EN ISO 15189. La dernière partie présente les applications de cette méthode de dosage dans différents périmètres et situations, et les perspectives générées par ce travail en toxicologie biologique ou médico-légale.

PARTIE 1 – CADRE THEORIQUE

CHAPITRE I - L'ETHANOL

1. L'alcool en France

La France fait partie des pays européens où il est le plus consommé de boissons alcoolisées malgré une diminution régulière depuis les années 60 (Figure 1) (1). Les données du baromètre Santé-Publique-France 2017 indiquent qu'en France, 13,5 % des adultes ne boivent jamais d'alcool et que 10 % en consomment tous les jours (2). En 2009, en France, 13 % des décès chez les hommes et 5 % chez les femmes étaient attribuables à l'alcool, ce qui en fait un des plus importants facteurs de mortalité évitable (3).

La consommation d'alcool peut avoir de nombreuses conséquences. D'une part, l'alcoolisation chronique est un facteur étiologique de nombreuses pathologies : hépatopathies, troubles cardiovasculaires et neuropsychiatriques, cancers, addictions, syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF) (1)... Récemment, de nouveaux modes de consommation ont vu le jour, comme le *binge drinking*. Les conséquences sanitaires de ces nouvelles pratiques sont variées : accidents de la voie publique (AVP), violences, rapports sexuels non désirés ou non protégés, etc.

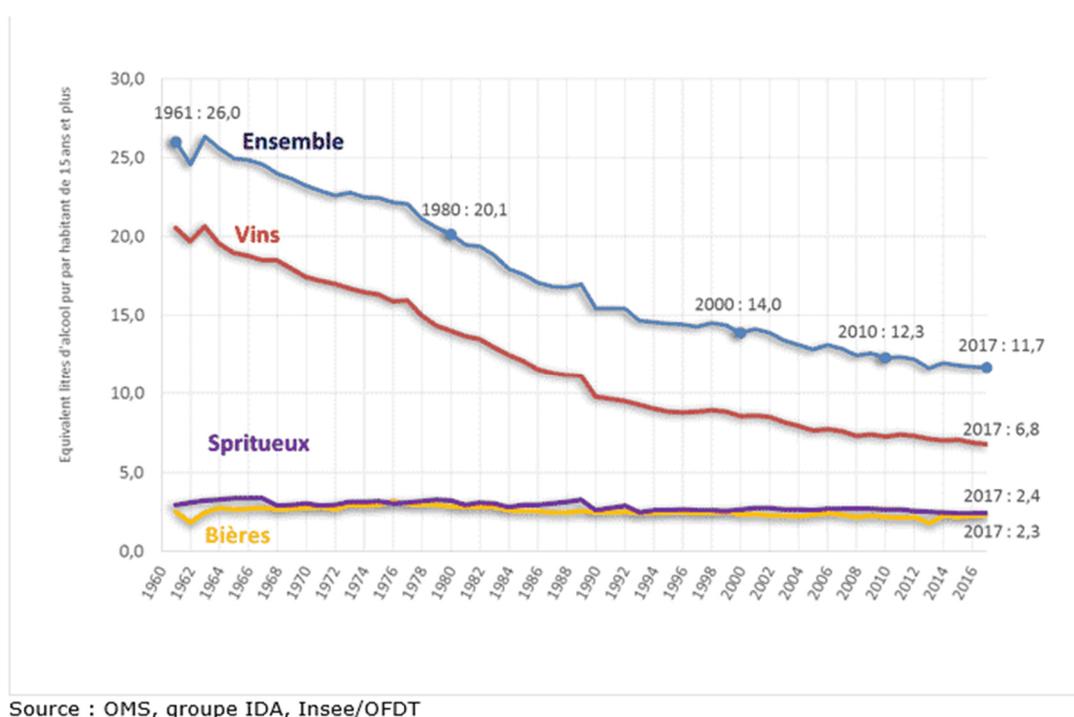
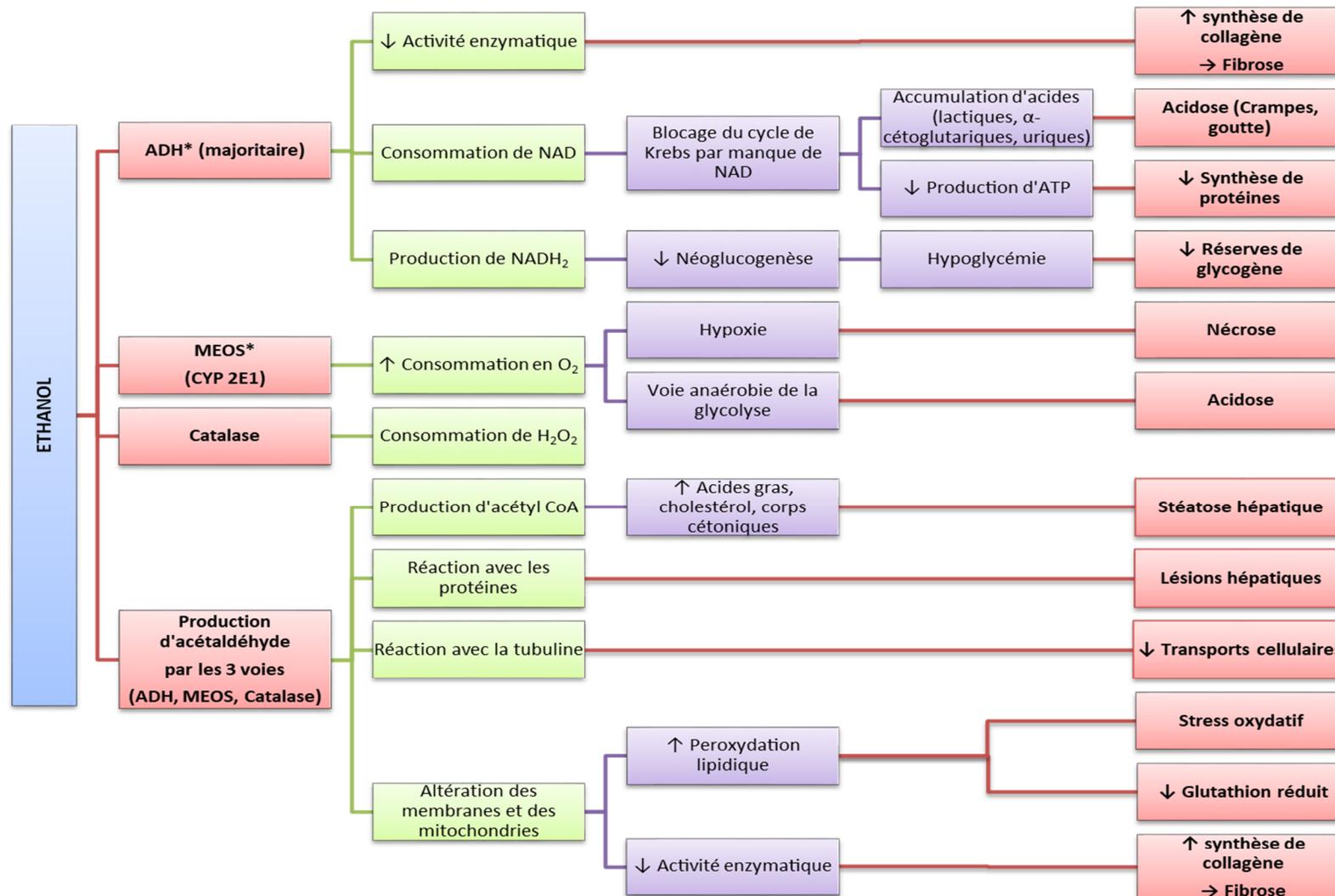


Figure 1: Évolution de la quantité d'alcool consommée quotidiennement depuis 1961

2. Métabolisme toxique de l'éthanol

Il existe plusieurs voies métaboliques de l'éthanol (Figure 2) conduisant au principal métabolite, l'acétaldéhyde, à l'origine de nombreux mécanismes toxiques. L'acétaldéhyde se lie notamment à la tubuline entraînant une diminution de la polymérisation des microtubules et par conséquent une diminution de la sécrétion des protéines qui favorise leur séquestration. L'accumulation des vésicules sécrétrices et des protéines entraîne finalement un élargissement des hépatocytes. En outre, la rétention de l' α 1-antitrypsine est associée à la progression vers la fibrose et la cirrhose hépatique. L'acétaldéhyde se lie également avec de nombreuses protéines au niveau des groupes thiols (-SH) et forme des adduits ce qui diminue l'activité de certaines enzymes, mais également est à l'origine de réactions immunologiques pouvant contribuer à des lésions hépatiques. La métabolisation de l'éthanol en acétaldéhyde puis en acétate favorise également la lipogenèse, inhibe les réactions du cycle de Krebs et perturbe la β -oxydation des acides gras ce qui induit une stéatose hépatique. L'acétaldéhyde est également à l'origine d'une altération de plusieurs fonctions de la mitochondrie (surtout en cas de consommation chronique d'éthanol) qui diminue l'oxydation des acides gras et d'autres substrats (comme l'acétaldéhyde). L'acétaldéhyde stimule la production de collagène et de la prostacycline vasculaire. La stimulation de cette prostacycline peut également expliquer l'effet « protecteur » d'une consommation modérée d'alcool sur les complications cardiovasculaires. Le CYP2E1, dont l'activité est induite par l'éthylisme chronique, augmente l'activité du système microsomial d'oxydation de l'alcool (MEOS) ce qui entraîne une production et une accumulation toxique d'acétaldéhyde intrahépatique.

En conclusion, les séquelles hépatiques induites par une consommation chronique d'éthanol sont principalement dues à l'accumulation de lipides dans le foie (stéatose hépatique) et à l'augmentation du volume des hépatocytes. Les cardiomyopathies peuvent être également, en partie, expliquées par l'inhibition de la synthèse protéique dans le cœur induit par l'acétaldéhyde. De plus, l'acétaldéhyde est également un stimulant de la production vasculaire de prostacycline (vasodilatateur et antiagrégant plaquettaire) contribuant au flush et aux effets cardiovasculaires observés après une consommation d'éthanol. Enfin, l'accumulation d'acétaldéhyde est également responsable de l'effet antabuse se caractérisant par des nausées, des vomissements, des céphalées et une asthénie (4).



*ADH : Alcool déshydrogénase, voie métabolique majoritaire se produisant principalement dans le foie

*MEOS : Metabolizing Ethanol Oxidative System, voie métabolique minoritaire et inducible par l'éthanol (chez l'alcoolique chronique, cette voie est surexprimée expliquant un métabolisme plus efficace chez cette population.). Elle fait intervenir principalement le CYP2E1.

*Catalase : voie métabolique minoritaire

Figure 2 : Mécanismes de la toxicité induite par le métabolisme de l'éthanol

3. Pharmacocinétique de l'éthanol

3.1. Absorption, distribution et élimination

L'éthanol est principalement absorbé par voie digestive (25 % par l'estomac, 75 % par l'intestin grêle) (5). Cette absorption peut être modifiée par certains facteurs comme l'alimentation ou encore la vitesse de vidange gastrique (influencée par : le jeûne, le degré alcoolique de la boisson, certains xénobiotiques...). La pénétration par voie pulmonaire est importante (environ 60 %) et nécessite, en cas de forte exposition, le port de protections respiratoires adaptées. La pénétration cutanée doit être prise en compte en cas de lésions ou chez les nouveau-nés et les nourrissons dont la peau est plus perméable.

Concernant la distribution, l'éthanol est une molécule hydrosoluble de faible masse molaire, qui diffuse donc dans tous les tissus sauf les os et les graisses. Il peut également traverser la barrière fœto-placentaire. Enfin, une partie de l'éthanol (10 à 15 %) est éliminée sous forme inchangée dans les urines, la sueur, la salive, le lait, les larmes et l'air expiré. La majorité est métabolisée (85 à 90 %) (6).

3.2. Métabolisme

3.2.1. Métabolisme oxydatif

Le métabolisme oxydatif représente 90 % du métabolisme de l'éthanol. Il est principalement hépatique (90-95 %) et secondairement gastrique et rénal (5-10 %). Plusieurs voies métaboliques existent pour l'éthanol, la voie principale est celle de l'Alcool Déshydrogénase (ADH) qui se décompose en trois étapes :

- l'oxydation de la fonction alcool en fonction aldéhyde par l'ADH (variation interindividuelle) entraîne la formation d'acétaldéhyde, métabolite toxique de l'éthanol,
- l'oxydation de la fonction aldéhyde en fonction acide par l'Aldéhyde Déshydrogénase (ALDH) entraîne la formation d'acétate,
- l'oxydation de cet acétate en dioxyde de carbone.

Les autres voies, minoritaires, sont le MEOS, utilisant le cytochrome P450 (CYP2E1) et la catalase qui fait intervenir, entre autres, la xanthine oxydase via l'eau oxygénée. Ces deux voies sont induites chez l'alcoolique chronique et, de façon moins importante, en cas d'alcoolisation aiguë (6).

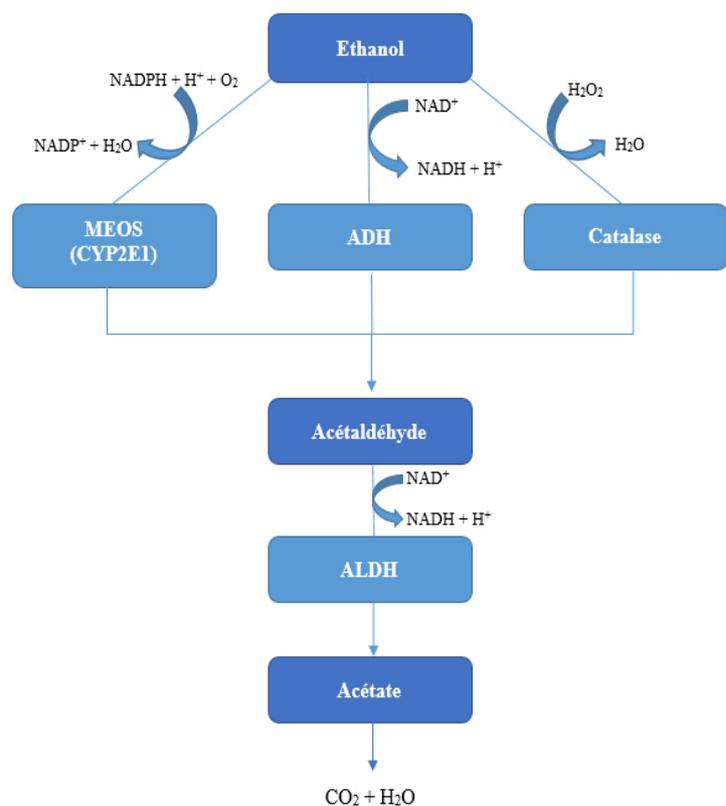


Figure 3 : métabolisme oxydatif de l'éthanol

3.2.2. Métabolisme non oxydatif

Le métabolisme non oxydatif est minoritaire et représente environ 10 % du métabolisme de l'éthanol, il induit la production de plusieurs molécules en faibles concentrations dans le sang : Les éthyliques esters d'acides gras (FAEEs) : l'éthanol estérifie des acides gras sous l'action d'une synthétase d'esters éthyliques d'acides gras. Ces FAEE, en s'accumulant, vont être à l'origine de dégâts tissulaires.

Les phosphatidyléthanolols (PEthols) : l'éthanol se lie au phosphate libéré de la phosphatidylcholine après action de la phospholipase D sur la membrane des érythrocytes.

L'éthylsulfate (EtS) : l'éthanol se fixe sur un groupement sulfate provenant de la phosphoadénosine-phosphosulfate sous l'effet d'une sulfotransférase.

L'éthylglucuronide (EtG) : l'éthanol se conjugue à l'acide glucuronique sous l'action d'une glucuronosyl transférase (6).

3.3. Variabilité interindividuelle et intra individuelle

La pharmacocinétique de l'éthanol varie selon les individus (variabilité interindividuelle) notamment en fonction du sexe, de l'âge, du poids et du métabolisme. Elle varie également chez un même individu (variabilité intra-individuelle) selon le degré alcoolique des boissons consommées (figure 4)(7), le moment de la prise (avant ou après un repas, figure 5)(8) mais également selon le profil de consommation du sujet (occasionnel ou chronique)(6). La formule de Widmark permet une estimation de l'éthanolémie maximale selon le sexe (coefficient de diffusion $\approx 0,7$ pour l'homme et $0,6$ pour la femme) :

$$\text{Ethanolémie} = \frac{\text{Quantité d'alcool pur ingérée (g)}}{\text{poids de l'individu (kg)} \times \text{coefficient de diffusion}}$$

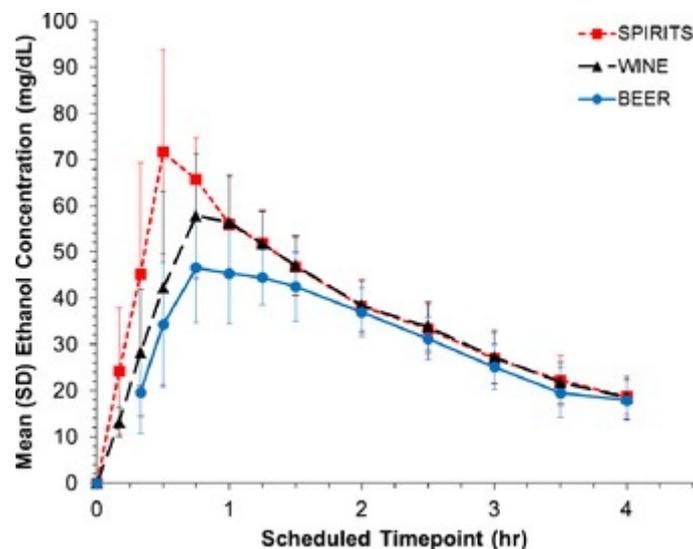


Figure 4 : Evolution de l'éthanolémie dans le temps selon le titre alcoolique de la boisson consommée (alcools forts en rouge, vin en noir, bière en violet) d'après Mitchell MC. 2014 (7)

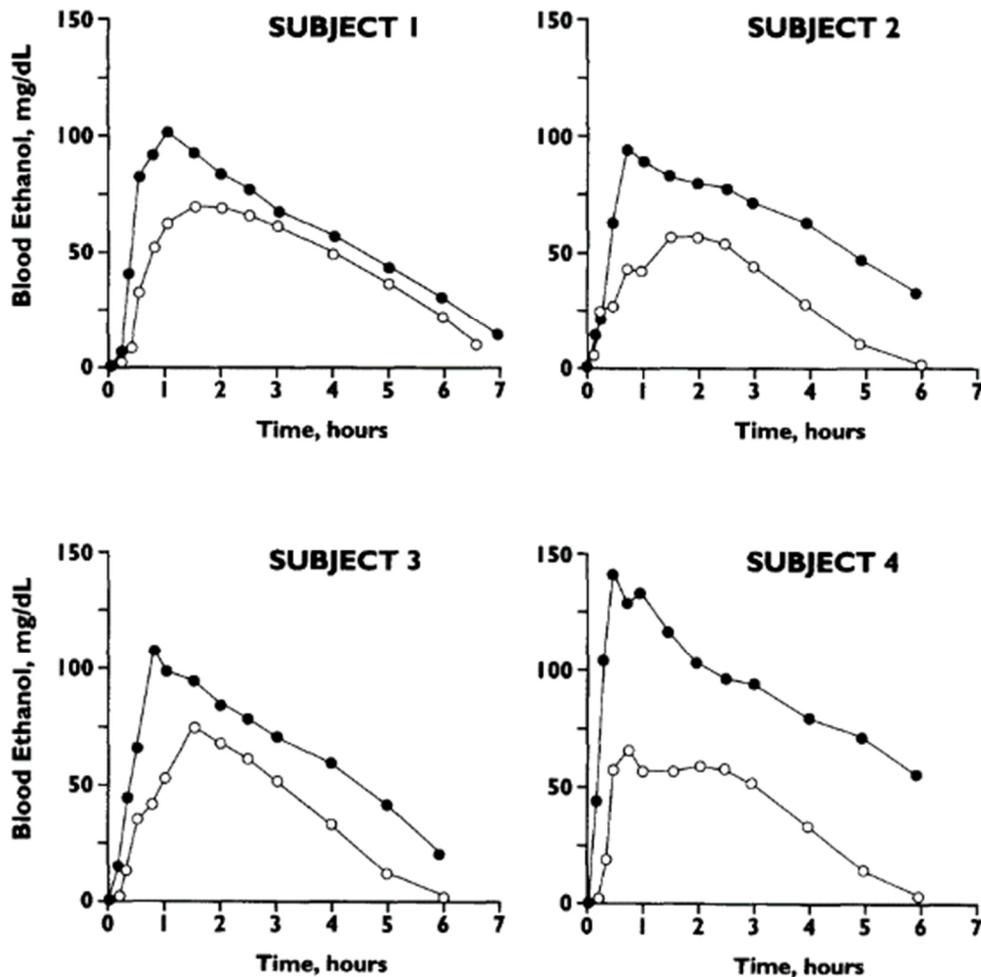


Figure 5 : Ethanolémie en mg/dL à jeun (rond vide) et immédiatement après le petit déjeuner (rond plein) d'après Lands WEM. 1998 (8)

4. Troubles liés à l'usage de l'alcool et sevrage

4.1. Définitions

Concernant la consommation d'alcool, il est important de distinguer deux profils d'usager :

- un consommateur d'alcool à risque, qui est une personne consommant plus que les recommandations actuelles françaises pour un risque limité, c'est-à-dire, plus de 10 unités standards (US) par semaine et 2 US par jour (9),
- une personne présentant des troubles liés à l'usage d'alcool (TUA).

Les TUA, font partie des maladies psychiatriques se trouvant dans la 5e édition du Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (MDSTM-V) et se définissent comme un usage d'alcool causant une déficience ou une détresse cliniquement importante (10).

4.2.Recommandations des différentes autorités de santé sur les risques de la consommation d'alcool

Les repères de consommation d'alcool ont fortement évolué au cours du temps et ne sont pas homogènes selon les pays et les sociétés savantes. Les unités standards ou doses standards utilisées dans la littérature pour quantifier une consommation d'éthanol divergent également, allant de 10 grammes d'éthanol pur en France à 14 grammes d'éthanol pur aux États-Unis.

4.2.1. Alcoolisation aigüe

Un résumé des recommandations actuelles concernant la consommation aigüe d'alcool en France comparées à celles des États-Unis est présenté dans le tableau 1.

Tableau 1 : Recommandations des principales sociétés savantes concernant l'alcoolisation aigüe

Sources	Santé Publique France	Société Française d'Alcoologie	National Institut on Alcohol Abuse and Alcoholism		Organisation Mondiale de la Santé	
	Recommandations (2019) (11)	Usage à risque (2015) (12)	« Reduced risks » (2021)	« Binge drinking » (2021) (13)	Risque d'une consommation aigüe (2000) (14)	« Heavy episodic drinking » (2000) (14)
Unité standard	10 g	10 g	14 g		10 g	
Femme	Toute consommation est à risque	> 40 g par occasion	< 14 g/J	> 56 g/J en 2h	Risque : Faible < 20 g Modéré 21 à 40 g Elevé 41 à 60 g Très élevé > 60 g	≥ 60 g au moins 1 jour dans les 30 derniers jours
Homme	Risques limités < 20 g/J	> 40 g par occasion	< 28 g/J	> 70 g/J en 2h	Risque : Faible < 40 g Modéré 41 à 60 g Elevé 61 à 100 g Très élevé > 100 g	

4.2.2. Alcoolisation chronique

Un résumé des recommandations actuelles concernant la consommation chronique d'alcool en France comparées à celles des États-Unis est présenté dans le tableau 2.

Tableau 2: Recommandations des principales sociétés savantes concernant l'alcoolisation chronique

Sources	Santé Publique France	Société Française d'Alcoologie	National Institut on Alcohol Abuse and Alcoholism		Organisation Mondiale de la Santé
Termes utilisés	Risques limités (2019) (11)	Usage à risque (2015) (12)	“Reduced risks” (2021) (13)	“Heavy Alcohol consumption” (2021) (13)	Risque d'une consommation chronique (2000) (14)
Unité standard	10 g	10 g	14 g	14 g	10 g
Femme	≤ 20 g/J ≤ 100 g/Semaine (S) Avoir des jours dans la semaine sans consommation	> 140 g/S	< 14 g/J	> 42 g/J > 98 g/S	Faible < 20 g/J Modéré 21 à 40 g/J Elevé > 40 g/J
Homme		> 210 g/S	< 28 g/J	> 56 g/J > 196 g/S	Faible < 40 g/J Modéré 41 à 60 g/J Elevé > 60 g/J

4.3. Dépistage

Le dépistage d'un TUA repose principalement et initialement sur l'utilisation d'un test de dépistage de type questionnaire (AUDIT, AUDIT-10...). Cependant, les faux positifs et négatifs existent pour ces questionnaires. De plus, il est nécessaire de déterminer si les patients qui obtiennent des résultats positifs à ces questionnaires présentent effectivement une consommation d'alcool à risque. Pour cela, outre l'interrogatoire du médecin, une évaluation objective de la consommation d'éthanol sur une période étendue constituerait une aide précieuse au diagnostic (10).

4.4. Alcool et grossesse

L'incidence de l'Ensemble des Troubles Causés par l'Alcoolisation Fœtale (ETCAF) est estimée à 0,9 % des naissances vivantes par an dans les pays occidentaux. L'alcool est la première cause de retard mental en France. Ces ETCAF vont du Syndrome d'Alcoolisation Fœtale (SAF), aux difficultés dans les apprentissages ou l'adaptation sociale. Le SAF étant la forme la plus sévère, il comprend une dysmorphie faciale (fentes palpébrales raccourcies, sillon nasolabial lisse, allongé, effacé et lèvre supérieure mince), un retard de croissance, ainsi que de nombreux troubles du développement neurologiques : retard mental, troubles du comportement, difficultés d'apprentissage, troubles du calcul, du langage, troubles autistiques. Les recommandations actuelles sont de ne pas consommer de boissons alcoolisées durant toute la durée de la grossesse, et ce, quelle que soit la quantité. En effet, les doses minimales n'entraînant pas de conséquences délétères pour le fœtus ne sont pas connues. Toutefois, c'est une consommation supérieure à un verre par jour qui semble constituer un risque significatif. L'élément premier du dépistage des ETCAF est la mise en évidence d'une consommation significative d'alcool pendant la grossesse. Ce dépistage peut être réalisé par un interrogatoire lors d'une consultation prénatale, par la réponse à un autoquestionnaire, par le dosage de biomarqueurs de la consommation d'éthanol chez la future mère, ou par un faisceau d'arguments composés d'une combinaison de ces différents indicateurs. L'objectif de ce dépistage chez les femmes enceintes est de diriger celles susceptibles de consommer de l'alcool vers un spécialiste, afin qu'un soutien médico-psychosocial de type motivationnel soit mis en place. (15)

4.5. Hépatopathies alcooliques et transplantations

Selon la société nationale française de gastro-entérologie, 50 à 75 % des cirrhoses sont d'origine alcoolique. Les hépatopathies alcooliques (*Alcoholic Liver Disease*, ALD) sont une manifestation toxique de l'effet de la consommation régulière d'éthanol sur le foie. Cette consommation régulière entraîne d'abord une stéatose, c'est-à-dire une accumulation anormale d'acides gras et de triglycérides dans les hépatocytes (> 5 % de la masse de l'hépatocyte). À ce stade, un arrêt de la consommation d'éthanol permet une réversibilité des lésions. La poursuite d'une consommation régulière excessive peut conduire à une stéato-hépatite alcoolique, qui se caractérise par une inflammation du parenchyme hépatique et une fibrose par activation des cellules stellaires hépatiques. La poursuite de ce processus de fibrose, d'atrophie des hépatocytes et, en réponse, d'une régénération des hépatocytes, entraîne l'apparition de nodules cirrhotiques (16). La prise en charge d'une hépatopathie alcoolique implique un suivi de la consommation d'alcool. De plus, l'abstinence est un

prérequis à la transplantation lorsque l'ALD le nécessite. Il existe donc un réel enjeu à surveiller ce sevrage ou cette abstinence de façon efficace. C'est dans ce cadre que l'utilisation des biomarqueurs de la consommation d'éthanol tels que le PEth sanguin est essentielle (17). Chez les patients transplantés à la suite d'une ALD, des études prospectives montrent que 50 % d'entre eux reprendront une consommation d'alcool dans les 5 ans, et chez 2 %, cette consommation sera excessive pouvant conduire de nouveau à un TUA. Les conséquences de cette rechute sont l'insuffisance hépatique, l'hépatocarcinome et la perte du greffon. Il est donc également essentiel de détecter toute reprise de consommation en post-transplantation. Pour cela, le PEth s'ajoute aux outils du clinicien dans le suivi et la prévention des rechutes auprès de patients préalablement sevrés (18,19).

4.6. Alcoolisation et conduite automobile

« L'alcool au volant » est l'une des premières causes de la mortalité routière et demeure en cause dans près d'un tiers des accidents mortels. En France, il est interdit de conduire avec un « taux » d'alcool dans le sang ou l'air expiré supérieur aux seuils autorisés par le Code de la route (Figure 6). L'influence de la consommation de boissons alcoolisées chez un individu peut être approximativement appréciée à partir l'éthanolémie.

Or, si un résultat obtenu avec un éthylomètre (c'est-à-dire une mesure de la concentration d'éthanol dans l'air expiré) constitue une valeur légale, il est rigoureusement impossible de lui faire correspondre un résultat d'éthanolémie. Effectivement, s'il est admis qu'une fois l'absorption terminée, 2100 mL d'air alvéolaire renferment autant

➤ Alcoolémie	≥ 0,5 g/L	}	Infraction (contravention)
➤ [air expiré]	≥ 0,25 mg/L		
➤ Alcoolémie	> 0,8 g/L	}	Délit (amende, emprisonnement)
➤ [air expiré]	> 0,4 mg/L		
➤ Alcoolémie	< 0,2 g/L	}	Pour les détenteurs du permis probatoire depuis juillet 2015
➤ [air expiré]	< 0,1 mg/L		

Figure 6 : Législation relative aux seuils d'éthanolémie en conduite automobile

d'éthanol que 1 mL de sang, ces 2100 mL représentent une valeur moyenne qui ne rend pas compte des variations interindividuelles parfois considérables : cette valeur peut en effet varier de 1700 mL à 4000 mL (20). Aussi, il est illusoire de vouloir transformer la teneur en éthanol de l'air expiré en « équivalent d'éthanolémie », sans prendre le risque de commettre une erreur importante. Une mesure d'éthanol de l'air expiré n'a donc qu'une seule signification : elle dépasse ou ne dépasse pas le seuil contraventionnel ou délictuel fixé par la loi. Au total, il faut retenir que « dosage sanguin » et « mesure dans l'air expiré » sont des modes distincts d'expression d'un état d'imprégnation éthylique, même si les deux sont admis par la loi.

Dans le cadre de la loi relative à la conduite sous influence de substances ou plantes classées comme stupéfiants définitivement adoptée le 23 janvier 2003, il est prévu, en cas de conduite d'un véhicule en ayant fait usage de stupéfiant, une suspension ou une annulation du permis de conduire. Pour compléter cette loi, et préciser les conditions de la restitution de permis de conduire, Décret n° 2003-293 du 31 mars 2003, stipule dans son article 6 : « le préfet soumet à des analyses ou à des examens médicaux, cliniques et biologiques, notamment salivaires et capillaires ».

À ce jour, ces modalités de restitution du permis de conduire varient selon les commissions médicales préfectorales d'un département à un autre. D'une manière générale, il est réalisé des examens cliniques et biologiques afin de vérifier l'abstinence, ou une consommation maîtrisée, de l'individu qui veut récupérer son permis. Mais, le panel des analyses varie selon la Commission Médicale « Permis Conduire » départementale. Ces panels se composent principalement des biomarqueurs indirects de la consommation d'alcool et dans de rares cas de l'éthylglucuronide urinaire ou capillaire. Le Phosphatidyléthanol ne fait pas, à ce jour, partie des biomarqueurs prescrits dans ce cadre en France contrairement à certains pays voisins comme la Belgique et la Suisse (21-22).

5. En situation *post-mortem*

5.1.Redistribution *post-mortem*

La redistribution *post-mortem* est un phénomène complexe et source d'une difficulté d'interprétation des résultats toxicologiques. Ce processus peut être en deux catégories : la redistribution depuis les organes réservoirs et les phénomènes agoniques et cadavériques. Pour l'éthanol, la redistribution depuis les organes réservoirs s'effectue principalement à partir du tractus gastro-intestinal entraînant une diffusion dans les structures vasculaires de voisinage, dans les cavités cardiaques gauches et dans une moindre mesure dans les cavités cardiaques droites. Enfin, parmi les phénomènes agoniques et cadavériques, deux influent fortement sur la redistribution de l'éthanol (23-25) :

- La lyse cellulaire, qui favorise la diffusion de l'éthanol à travers la paroi gastrique.
- La putréfaction, qui entraîne, en sus, une néoformation de l'éthanol par la fermentation, mais également une dégradation de l'éthanol, plus tardivement, lorsque les substrats privilégiés sont épuisés

5.2.Focus sur la fermentation

Chez l'individu vivant, la production endogène d'éthanol par fermentation (métabolisme anaérobie) des glucides via des levures dans le tractus gastro-intestinal, n'entraîne pas de concentration sanguine significative d'un point de vue clinique comme médico-légal, à l'exception de rares syndromes d'autobrasserie chez des patients souffrant d'infections fongiques chroniques importantes, de pathologies gastriques, ou encore chez les patients ayant subi une chirurgie abdominale comme une gastrectomie (26).

La formation *post-mortem* d'éthanol est en revanche beaucoup plus fréquente du fait de la production d'éthanol (et d'autres alcools) essentiellement par les levures et bactéries présentes dans le tractus gastro-intestinal par fermentation de divers substrats (glucides, acides aminés, glycérol, lipides...) (27-28). Cet éthanol produit peut alors se retrouver présent dans le sang au cours de la période *post-mortem* du fait de phénomène de redistribution *post-mortem*, voire par contamination directe du fait des dommages organiques en cas de décès dans des circonstances traumatiques (accident à haute cinétique, chute d'une grande hauteur, etc...). Les concentrations sanguines d'éthanol retrouvées en *post-mortem* peuvent alors atteindre 0,7 g/L et poser, en conséquence, des problèmes d'interprétation médico-légale (29).

5.3. Quelles solutions ?

Au vu des phénomènes précédemment décrits, l'interprétation d'un dosage d'éthanol en *post-mortem* est difficile. En effet, il est nécessaire de prendre en considération de nombreux facteurs, notamment, l'état du cadavre : décès dans des circonstances traumatiques, avancé du phénomène de putréfaction (lui-même influencé par le délai entre le décès et la découverte, les conditions climatiques et situationnelles subit par le cadavre durant ce délai...), la physiopathologie (diabète, jeune...). Mais également des facteurs plus facilement maîtrisables comme le type de prélèvement effectué [sang fémoral, subclavier, cardiaque gauche ou droit (ou mélangé), type de tube utilisé (conservateur - fluorure de sodium), prélèvement urinaire ou d'humeur vitrée...], la qualité de ce prélèvement (remplissage du tube avec le moins d'espace de tête possible) et les conditions de son stockage.

Les solutions dépendent donc de chaque cas.

L'analyse d'un prélèvement d'humeur vitrée (HV) présente de nombreux avantages :

- Ce milieu est « figé » en période *post-mortem*, ce qui peut expliquer des durées de détection plus élevées de certains composés exogènes (30)
- Elle est fréquemment disponible dans les premiers jours *post-mortem*. En effet, par sa position dans l'orbite oculaire, le globe oculaire est relativement protégé ce lui permet de rester parfois intact lors d'un accident traumatique.
- Elle est également peu vascularisée, *a priori* moins exposée à des sources de redistribution *post-mortem* et elle subit peu de contamination bactérienne.

Son prélèvement *post-mortem* est relativement aisé à la seringue, avec un volume disponible d'environ 2 mL par œil. Ainsi, l'humeur vitrée fait partie des prélèvements réalisables lors des levées de corps ou lorsque seul un examen de corps est effectué. L'utilisation de tubes de prélèvement contenant un conservateur fluoré a été étudiée et semble devoir être préconisée. La concentration d'éthanol dans l'humeur vitrée n'est ainsi pas influencée par les phénomènes de redistribution *post-mortem* et permet une bonne estimation de l'éthanolémie au moment du décès (en prenant en considération un ratio moyen d'éthanol dans l'HV par l'éthanolémie de 0,90 à 1,38 avec une moyenne à 1,27) (31).

Les prélèvements sanguins se feront sur un tube contenant un conservateur (fluorure de sodium) et stockés congelés. Le type de prélèvement sanguin sera, par ordre de préférence : Sang du poplité > fémoral > sang sous-clavier > sang cardiaque droit > sang cardiaque gauche (24-25, 32). D'autres matrices sont également informatives notamment l'urine, la bile, et dans une moindre mesure le contenu gastrique.

6. Les biomarqueurs d'une exposition à l'éthanol

6.1. Les marqueurs indirects : liés à des modifications métaboliques chez les alcooliques chroniques

6.1.1. Transaminases

Une consommation chronique excessive d'éthanol entraîne une augmentation des transaminases par effet inducteur enzymatique et dommages cellulaires (traduction de la cytolysse hépatique). Un rapport d'activité sérique ASAT/ALAT supérieur à 2 suggère une pathologie alcoolique (souffrance mitochondriale). La modification de l'activité des transaminases n'intervient qu'après une consommation importante et répétée de boissons alcoolisées et demeure altérée plusieurs semaines après l'arrêt de la consommation d'alcool. La sensibilité et la spécificité de ce rapport pour déceler une consommation d'alcool sont très faibles. De plus, les transaminases ne sont pas applicables en *post-mortem* et présentent peu d'intérêt comme biomarqueurs d'une consommation d'alcool.

6.1.2. Volume Globulaire Moyen

Le Volume Globulaire Moyen (VGM) est augmenté par effet direct de l'éthanol sur la membrane des globules rouges (altération par dissolution des phospholipides de la membrane du GR) et effet indirect sur le métabolisme des vitamines B9 et B12 en entraînant leurs carences, un ralentissement des divisions cellulaires et par conséquent une augmentation de la taille des globules rouges. Ce biomarqueur n'est pas spécifique de la consommation d'alcool et sa sensibilité est moyenne. Comme les transaminases, sa modification est peu précoce et plusieurs mois d'abstinence sont nécessaires à sa normalisation. Il n'est pas applicable en *post-mortem*. Il est utilisé dans la surveillance de l'abstinence.

6.1.3. Gamma-Glutamyl Transférase : enzyme membranaire des hépatocytes

L'activité de la gamma-glutamyl transférase (GGT) est augmentée par l'effet inducteur enzymatique ainsi que par les dommages cellulaires directs de l'alcool. Ce biomarqueur a une sensibilité variable selon la présence d'atteintes hépatiques et sa spécificité est faible. Son augmentation est significative après deux à trois semaines de consommation excessive d'alcool et la normalisation de sa concentration est lente (plusieurs jours à plusieurs semaines). Il n'est pas applicable en *post-mortem*. Il est proposé pour le diagnostic en association avec la mesure des formes désialylées de la transferrine (CDT), et il est utilisé dans le suivi de sevrage et la surveillance de l'abstinence.

6.1.4. Transferrine désialylée

L'éthanol entraîne une augmentation des CDT par inhibition des sialyltransférases dans l'appareil de Golgi et activation des sialidases dans la membrane des hépatocytes. Ce biomarqueur présente une bonne sensibilité et spécificité, il est relativement précoce (environ une semaine) et sa normalisation est lente avec une demi-vie de deux semaines. Ce biomarqueur n'est pas applicable en *post-mortem* et est utilisé comme marqueur de rechute et suivi de sevrage. Son principal intérêt est que ce biomarqueur n'est pas (ou peu) modifié par les pathologies hépatiques. Cependant, il n'y a pas de consensus indiquant une technique ou une valeur normale consensuelle et il présente une forte variabilité interindividuelle (33). Il est utilisé pour le diagnostic, dans le suivi de sevrage et la surveillance de l'abstinence.

6.2. Les marqueurs directs (Éthanol et métabolites mineurs)

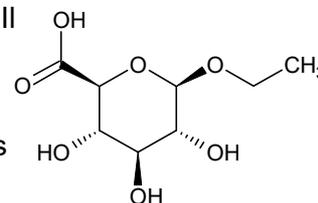
6.2.1. Éthanol

L'éthanol est le biomarqueur idéal d'une consommation d'alcool, sa sensibilité et sa spécificité sont de 100 %. La décroissance de l'éthanolémie est rapide (0,1 à 0,4 g/L/h) et possède une forte variabilité interindividuelle. De plus, un éthyisme chronique entraîne une accélération de cette décroissance par induction des voies métaboliques secondaires de l'éthanol (MEOS et catalase).

L'éthanol, est détectable dans le sang total, l'urine ainsi que dans l'air expiré, 1 heure après ingestion et sur une durée maximale de 24 heures. Ainsi, il est le marqueur d'une consommation exclusivement récente d'alcool. Il est utilisé en *post-mortem* avec une prise en compte des problèmes liés à la fermentation (33).

6.2.2. Ethylglucuronide

L'éthylglucuronide (EtG) (figure 7) est issu de la conjugaison de l'éthanol à l'acide glucuronique activé via les UDP-Glucuronyl-Transférases (UGT) 1A1 et 2B7. Il possède une bonne stabilité *in vitro* et est détectable dans plusieurs matrices : le sang (peu utilisé en routine), l'urine et les cheveux.



Dosage de l'EtG sanguin : il est détectable dès 30 minutes après ingestion avec une concentration maximale atteinte au bout

d'environ 4 heures, sa demi-vie est de l'ordre de 2,5 heures permettant une détection des consommations d'alcool sur les dernières 24 heures. Une concentration supérieure à 45 µg/L est en faveur d'une consommation récente de plus de 2 unités standards avec une sensibilité de 85 % et une spécificité de 89 % (34-35).

Figure 7: Molécule d'EtG

Dosage de l'EtG urinaire : il est détectable, par dosage immunoenzymatique, à partir de 12 heures et jusqu'à 72 heures après ingestion avec une bonne sensibilité (> 80 %) et une spécificité proche de 100% (20-22). Une concentration inférieure à 0,1 mg/L indique une abstinence au cours des dernières 48 heures alors qu'un résultat supérieur à 0,5 mg/L est en faveur d'une consommation au cours des dernières 48 à 72 heures. Ce biomarqueur est utilisé dans le contrôle de l'abstinence, la mise en évidence de consommation aiguë à distance du prélèvement et la différenciation d'une production d'éthanol *post-mortem* d'une véritable consommation *ante-mortem* de boissons alcoolisées.

Dosage de l'EtG capillaire : L'EtG s'incorpore dans les cheveux par la sueur, le sébum, le sang, le tissu environnant et les sources externes (urine, produits cosmétiques, vin...). Au-delà d'un segment de 6 cm de cheveux, les phénomènes de dégradation et de contamination rendent l'interprétation difficile. Ainsi, les cheveux poussant en moyenne de 1 cm par mois, ce marqueur permet une estimation de la consommation d'alcool au cours des 3 à 6 mois précédents le prélèvement. Il permet de différencier un abstinent ou consommateur occasionnel (≤ 5 pg/mg) d'un éthylique chronique (≥ 30 pg/mg) (36-37). Il est utilisé comme marqueur d'une consommation excessive et chronique d'éthanol chez le vivant et en *post-mortem*.

6.2.3. Ethyl-Esters d'Acides Gras

Les éthyl-esters d'acide gras (FAEE) sont les produits de réaction d'estérification entre une molécule d'acide gras et une molécule d'éthanol grâce à l'acide gras éthyl ester synthétase présente dans le foie et le pancréas. Les principaux FAEE sont respectivement l'oléate, le palmitate, le stéarate et le myristate. Ils sont détectables de façon précoce, avec un pic plasmatique à 90 minutes et persistent dans le sang au moins 24 heures. Leur spécificité et sensibilité sont bonnes pour l'alcoolisme chronique (détection dans les cheveux) et aigu (détection dans le sang). Ils présentent l'inconvénient de ne pas être corrélés avec la concentration d'éthanol et leurs dosages capillaires peuvent être contaminés par des lotions capillaires contenant de l'éthanol (incorporation majoritairement par le sébum). Aujourd'hui, le dosage de l'éthylpalmitate dans les cheveux permet de différencier un abstinent ou consommateur occasionnel (≤ 120 pg/mg pour un segment de 0-3 cm et ≤ 150 pg/mg pour un segment de 0-6 cm) d'un éthylique chronique (≥ 350 pg/mg pour un segment de 0-3 cm et ≥ 450 pg/mg pour un segment de 0-6 cm) (37).

6.2.4. Phosphatidyléthanol

Les phosphatidyléthanol (PEth) sont des métabolites mineurs de l'éthanol issu d'une voie non oxydative ayant lieu dans les membranes cellulaires par action de la phospholipase D (PLD) en présence d'éthanol et de phosphatidylcholines (transphosphatidylation). Le PEth 16:0/18:1, homologue le plus abondant, est détectable de façon précoce, avec un pic plasmatique entre 45 et 90 minutes post-ingestion (38), et une fenêtre de détection allant de 21 à 28 jours après la consommation d'alcool.

6.2.5. Ethylsulfate

L'éthylsulfate (EtS) est formé par transfert d'un groupement sulfate sur l'éthanol, catalysé par les sulfotransférases hépatiques 1A1 et 1A2. À ce jour, il n'a pas été démontré d'un intérêt supérieur à celui de l'EtG pour la prise aiguë (pic à 4 - 5 heures dans le sang, 1 heure dans urines et fenêtre de détection de 30 heures) et son étude dans les cheveux et l'urine est actuellement limitée.

6.2.6. Cocaéthylène

Le cocaéthylène est un marqueur sanguin et urinaire de la consommation concomitante d'éthanol et de cocaïne. Environ 10 % de la dose de cocaïne consommée produit du cocaéthylène par transestérification au niveau hépatique. La formation de ce biomarqueur modifie le cheminement métabolique de la cocaïne en passant d'un métabolite inactif (la Benzoylécgonine) en un métabolite actif (le cocaéthylène) produisant des effets similaires à la cocaïne (39).

6.3. Utilisation de ces marqueurs dans l'alcoolisation aiguë

Dans le cadre d'une alcoolisation aiguë, nous pouvons séparer les questions posées par les cliniciens ou magistrats :

Est-ce que le sujet est sous l'influence de l'alcool au moment du prélèvement ?

L'éthanol est, dans ce cas, le seul biomarqueur pouvant répondre sans nuance à la question.

Est-ce que le sujet a consommé dans les dernières heures, jours, voire semaines précédant le prélèvement (notamment si les faits ont eu lieu à distance des prélèvements) ?

Dans ce cas, les biomarqueurs utilisés (Tableau 3) dépendent du laboratoire traitant les prélèvements. Dans la majorité des cas, le dosage de l'éthanol urinaire est réalisé, augmentant la fenêtre de détection à 24 heures. Certains laboratoires dosent l'éthylglucuronide urinaire permettant une fenêtre de détection allongée à 3 jours. Enfin, certains biomarqueurs nécessitent un appareillage spécifique du fait du caractère mineur de leur métabolisation, notamment le PEth 16:0/18:1 avec une fenêtre de détection de 28 jours.

Tableau 3 : Biomarqueurs de la consommation aiguë d'alcool

Biomarqueur	Matrice	Fenêtre de détection	Sensibilité	Spécificité	Application en post-mortem	Contraintes / coût	Délai rendu	Intérêt / Limites
Ethanol	Sang Urine Air expiré Humeur vitrée	< 24 H	100 %	100 %	OUI	+	+	Marqueur de choix
EtG	Sang	24h	85 %	89 %	OUI	+	+	Qualitatif
	Urine	2 à 3 J	> 80 %	> 95 %	OUI	+	+	Qualitatif
EtS	Urine	30 H	> 80 %	> 90 %	OUI	+	++	Intérêt < EtG
FAAE	Sang	24 H	Non évalué	> 50 %	OUI	++	+++	Intérêt limité
PEth 16:0/18:1	Sang	3 à 4 S	Non évaluée	> 99 %	Probable	++	++	Quantitatif Manque de données
Congénères de l'éthanol	Sang	46 H (MeOH)	Faible	Faible	OUI	++	++	Intérêt limité

6.4. Utilisation de ces marqueurs dans l'alcoolisation chronique

Dans le cadre d'une alcoolisation chronique, les questions posées par les cliniciens ou magistrats peuvent être de trois natures :

Le sujet présente-t-il un « abus chronique » d'éthanol ?

Ici les caractéristiques déterminantes d'un bon biomarqueur (Tableau 4, 40-42) sont la sensibilité (Se) et la spécificité (Sp) diagnostique. Le « gold standard » actuel, en routine habituelle, pour ce dépistage sont les biomarqueurs indirects de l'éthanol, et surtout la CDT (Se = 80 %, Sp > 95 %) (43).

Toutefois, le PEth 16:0/18:1 dispose non seulement d'une meilleure sensibilité et spécificité diagnostique (Se = > 88 %, Sp > 99 %) (44) mais ajoute également une caractéristique importante : la corrélation entre les quantités d'éthanol consommées et la concentration de PEth 16:0/18:1.

Le traitement (sevrage hospitalier, suivi addictologique...) est-il efficace ?

Ici les caractéristiques déterminantes d'un bon biomarqueur sont sa courte latence (de formation et métabolisation) ainsi que son caractère quantitatif. La CDT est également le biomarqueur le plus utilisé dans ce cadre, malgré sa latence (environ 2 semaines) et son caractère quantitatif « limité ».

Le PEth 16:0/18:1 est un biomarqueur cumulatif quantitatif dont la latence est très faible (pic plasmatique en 45-90 min, décroissance immédiate).

Le sujet respecte-t-il une abstinence, ou en tout cas un contrôle d'une consommation réduite et raisonnable (Conduite en état d'ébriété, transplantation hépatique...)?

Ici, la fenêtre de détection ainsi que la sensibilité de détection d'une faible quantité consommée sont importantes. Selon le contexte et les possibilités du laboratoire, plusieurs biomarqueurs sont utilisés, notamment l'éthylglucuronide urinaire (fenêtre de détection = 72 h, détection dès 10 g consommé) (45) ainsi que capillaire (fenêtre de détection = 3-6 mois, détection si consommation > 30 g/J) (46) et la CDT (fenêtre de détection = 2 semaines, détection si consommation > 30 g/J) (47).

Le PEth 16:0/18:1 (fenêtre de détection = 4 semaines, détection dès une consommation de 14-28 g (48-49).

Tableau 4 : Biomarqueurs de la consommation chronique d'alcool

Biomarqueur d'alcoolisation chronique	Matrice	Sensibilité diagnostic	Spécificité diagnostic	Application en post-mortem	Contraintes et coût	Délai de résultat	Intérêt / Limites
ASAT/ALAT	Sérum	35 %	> 50 %	NON	+	+	Aucun intérêt / Marqueur non précoce Normalisation lente
VGM	Sérum	50 à 90 %	> 70 %	NON	+	+	Aucun intérêt / Marqueur peu précoce Normalisation très lente
GGT	Sérum	40 à 80 %	> 80 %	NON	+	+	Suivi de sevrage / Marqueur relativement précoce Normalisation lente
CDT	Sérum	60 à 80 %	> 95 %	NON	+	++	Indépendant de l'état hépatique - Sevrage et rechute / sensibilité variable selon importance de la consommation, 2 semaines d'abstinence pour normalisation
EtG	Cheveux	96 %	> 95 %	OUI	+++	+++	Marqueur spécifique d'une consommation excessive et chronique / cheveux, technicité
FAEE Ethyl Palmitate	Cheveux	Non évaluée	Non évaluée	OUI	++++	+++	Intérêt limité / cheveux, technicité nécessaire, pas mieux que l'EtG dans les cheveux
PEth	Sang	> 88 %	> 99 %	Probable	++	++	Marqueur spécifique et sensible / cumulatif, données d'interprétation à consolider

CHAPITRE II - LE PHOSPHATIDYLETHANOL

1. Généralités

Le PEth est un métabolite découvert lors d'une étude sur les interactions entre l'éthanol et le métabolisme des acides gras essentiels (50). Cette étude a été menée sur des rats traités avec 3 grammes d'éthanol par kilogramme et des analyses réalisées par chromatographie sur couche mince ont alors révélé un lipide anormal : ce lipide était un phosphatidyléthanol (51). Il est formé par la transphosphatidylation de phospholipides (principalement la phosphatidylcholine (PC)) avec l'éthanol (figure 8) (52-53). Cette réaction est catalysée par la PLD qui hydrolyse la PC en acide phosphatidique (PA). Ces PA servent de messagers lipidiques et sont impliqués dans des processus cellulaires importants comme la réorganisation du cytosquelette, l'endocytose, la prolifération, la migration et le trafic membranaire (54).

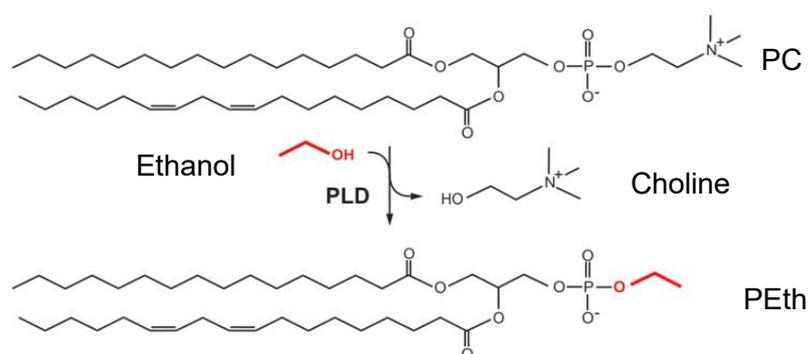


Figure 8 : Formation du PEth à partir de la PC

Il a été montré que les deux isoformes majoritaires de la PLD (PLD1 et PLD2) chez les mammifères catalysent la formation *in-vivo* de PEth (55).

Ce sont également des phospholipases qui dégradent le PEth, notamment la phospholipase A2, la PC phospholipase C et la PA phosphohydrolase (50,56–57). Nous savons également que le propranolol, un inhibiteur de la PA phosphohydrolase, bloque le renouvellement du PEth dans les hépatocytes humains. Cela indique un rôle majeur de cette enzyme dans la dégradation du PEth (50,57).

Il existe en fait 48 homologues de PEth, qui diffèrent par leurs deux chaînes d'acide gras (R^1 et R^2 , figure 9). Ils ont été découverts en 1992 (59) via Bombardement par des Atomes Rapides couplé à un Spectromètre de Masse (BAR-SM). Les plus abondants dans le sang humain sont les PEth 16:0/18:1, 16:0/18:2, et 18:1/18:1 (49). Pour exemple, le PEth 16:0/18:1 correspond à un PEth dont l'acide gras en R^1 est composé de 16 carbones sans insaturation et l'acide gras en R^2 de 18 carbones avec 1 insaturation.

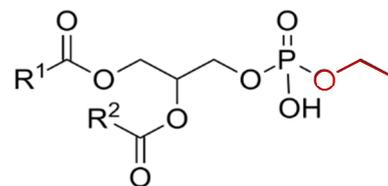


Figure 9 : Noyau de PEth avec ses deux radicaux R^1 et R^2

Parmi ces isoformes, le PEth 16:0/18:1 est le plus abondant. Il représente environ 40 % des PEth contre environ 22 % pour le PEth 16:0/18:2 (60). Ainsi, dans un souci de fluidité, lorsque nous ferons référence au PEth sans préciser la nature de ses radicaux, nous désignerons l'isoforme majoritaire, le PEth 16:0/18:1. Dans le cadre de la détection de la prise de boissons alcoolisées, il est le PEth le plus étudié avec une sensibilité supérieure à 88 % et une spécificité

de 100 % (44,60). Le PEth est retrouvé après une consommation aiguë et unique d'éthanol (\geq 14-28 g d'éthanol pur) (61), sa concentration sanguine atteint un pic entre 90 et 120 minutes. Les globules rouges (GR) ne possèdent pas l'une des enzymes responsables de la métabolisation du PEth (la PC phospholipase C) (62-63), ce qui explique l'utilisation du sang total comme matrice pour le PEth ainsi que sa longue demi-vie d'élimination (3 à 7 jours) (33, 64-66). Ainsi, le dosage sanguin du PEth permet la détection d'une consommation d'éthanol dans les 21 à 28 jours précédant le prélèvement de sang. Cette importante fenêtre de détection se rapproche de celle offerte par le dosage de l'EtG dans les cheveux. Mais les avantages du dosage sanguin du PEth sont nombreux : matrice (sang) plus usuelle et moins complexe (en termes de prélèvement et d'analyse) que les cheveux, délai d'analyse plus court et un coût analytique moindre. Cependant, le PEth présente des écueils analytiques et préanalytiques (stabilité) :

De par son appartenance à la famille des phospholipides, présents en abondance dans le sang, et sa formation en faible quantité (métabolite mineur), il n'est pas aisé d'en réaliser l'analyse et la quantification. Cependant, les récentes avancées méthodologiques et techniques permettent aujourd'hui d'en envisager le dosage en routine (67).

Le PEth est dit instable *in vitro* (dans le tube de sang) au bout de quelques jours à température ambiante (68-69). Des travaux récents proposent une solution élégante pour stabiliser le PEth dans le sang : l'utilisation de *Dried Blood Spot* (DBS). En effet, dans une goutte de sang séché sur un papier buvard, le PEth apparaît stable au moins 6 mois à température ambiante (60,70). Un second homologue, le PEth 16:0/20:4, semble, malgré une littérature peu fournie, présenter l'intérêt d'une demi-vie d'environ 2 heures (38). Cette demi-vie permettrait de disposer d'une fenêtre de détection d'environ 1 semaine et le placerait ainsi entre l'EtG urinaire et le PEth 16:0/18:1 permettant d'affiner l'estimation de la dernière consommation. Ainsi, un patient dont le PEth 16:0/18:1 est positif et le PEth 16:0/20:4 non détectable aurait une consommation d'éthanol plus ancienne (supérieure à une semaine avant le prélèvement) que si le PEth 16:0/20:4 était positif ce qui objectiverait une consommation récente (au cours de la semaine précédant le prélèvement).

2. Stabilité

Le PEth est un analyte labile dégradé par hydrolyse. Selon les études disponibles dans la littérature, sa stabilité est impactée par deux facteurs principaux : la température et l'anticoagulant présent dans le tube de prélèvement. Concernant la température, à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, il serait stable au moins 1 mois (certaines études annoncent une stabilité de 6 mois (60), d'autres une stabilité de 12 mois (68), voire de 14 mois (71)). Une étude indique une stabilité limitée à 8 jours à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (57). À $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, les études se contredisent indiquant une stabilité de quelques jours (67-68) à plusieurs semaines (69,72). Enfin, à température ambiante, les études indiquent une stabilité de plusieurs heures à plusieurs jours (67-69). Une étude (67) indique la possibilité d'une production *in vitro* de PEth dans un tube EDTA chez les patients avec une forte concentration d'éthanol dans le sang (sauf à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Concernant l'anticoagulant, seuls l'EDTA et l'héparine ont été étudiés. Il en ressort que l'EDTA semble être à préférer plutôt que l'héparine dans les tubes de sang total (probablement par prévention de l'oxydation des lipides par chélation des ions métalliques et inhibition de la PLD par diminution du calcium) (73).

L'utilisation de DBS permet de pallier à ces problèmes de stabilité. Effectivement, une fois 10 µL d'échantillon transférés sur papier buvard, les DBS sont laissés à sécher durant 1 heure. Il n'y a pas de formation de PEth dans le papier buvard 62 et les différents anticoagulants n'ont pas d'incidence sur le PEth dans le DBS (73). Le PEth présent dans le sang séché apparaît stable à température ambiante au moins 6 mois (60), voire 9 mois (74).

3. Valeurs seuils d'interprétation

Actuellement, en raison de la disparité des définitions concernant la consommation excessive d'alcool dans la littérature, et du manque de données concernant la pharmacocinétique du PEth, aucune valeur seuil d'interprétation d'une consommation excessive d'alcool ne fait l'objet d'un consensus international. Afin de définir ces valeurs, nous nous basons sur plusieurs références. Tout d'abord, concernant la consommation chronique excessive, en croisant plusieurs études (tableau 5), nous constatons qu'une valeur de 200 µg/L de PEth sanguin pour qualifier un consommateur chronique excessif peut être utilisée. Cependant, cette valeur correspond aux anciennes recommandations décrites, notamment par la NIAAA et l'OMS, d'environ 60 g d'alcool par jour pour un homme (40 g pour une femme).

Tableau 5: Récapitulatif des études indiquant une valeur seuil d'interprétation d'environ 200 µg/L de PEth

Critères	Patient en « alcohol detoxification unit »	Consommateurs excessifs selon la NIAAA (> 56g / J d'éthanol pur)	Consommateurs excessifs selon l'OMS (> 60g / J d'éthanol pur)	Consommateurs excessifs (sans définition)
Valeurs seuils d'interprétation	221 µg/L (60)	200 µg/L (75)	202 µg/L (76)	215 µg/L (41)

Dans la littérature, nous retrouvons une autre valeur seuil d'interprétation, celle de 20 µg/L, permettant de caractériser une consommation chronique supérieure à 2,5 doses standards d'éthanol par jour pour un homme et 1,5 à 2 doses pour une femme (77). Notons qu'aux Etats-Unis, la dose unitaire est définie à 14 g d'éthanol pur, ainsi, ces valeurs correspondent à 35 g/j pour un homme et entre 21 et 28 g/j pour une femme (en France, la dose standard correspond à 10 g d'éthanol pur). Cependant, une méta-analyse récente (Tableau 6) (66) montre la grande variabilité des correspondances entre la concentration sanguine de PEth et la quantité d'alcool consommée. Cette variabilité peut s'expliquer par la diversité des méthodes de recherche utilisées, mais elle met surtout en évidence l'importance de prendre en considération de nombreux facteurs. Ainsi, la date de la dernière consommation, la régularité de consommation, la quantité ingérée, le degré d'alcool des boissons, la variabilité interindividuelle du métabolisme ou encore le sexe devraient être pris en considération dans l'interprétation des résultats.

Tableau 6: Méta-analyse des relations entre les concentrations de PEth et la quantité d'alcool ingérée d'après Ulwelling W. (66)

PEth* Value	Ethanol Consumed†	Number of Subjects	Study Year and Reference	Comments
15	2.2 drinks/day (men), 1.1 drinks/day (women)	21	2015 (4)	Mean PEth after 3 month's drinking 2.2 drinks/day (men), 1.1 drinks/day (women); wide variability in PEth values (5–120 ng/mL)
<20	<2 drinks/day	–	–	"a PEth value in the low concentration range is useful to differentiate 'any drinking'... from abstinence... rather than indicate with confidence a specific amount of consumption" (33).
20	At least moderate drinking within past month			Suggested Guideline for a "Positive" PEth result; alcohol has been consumed in at least moderate amounts at some time(s) within the past month.
24	4.1 drinks/week	22	2015 (50)	The 4 weekly drinks were consumed in one or two sittings/week, ≤3 drinks per episode
28	2.4 drinks/day	21	2015 (4)	A 28 ng/mL threshold detected nonabstainers with 100% specificity (0 false positives); only 28% sensitivity for detecting nonabstainers within past month
48	4.2 drinks once a week over 4 weeks	30	2014 (30)	A study of women in early pregnancy.
73	Up to 4 drinks/day	1339	2012 (16)	The mean PEth for subjects arrested for DUI. Consumption was self-reported
100	–	56	2011 (48)	The threshold that distinguished "currently drinking" alcohol-dependent subjects from people who "did not drink"
127	2 or more drinks/day	80	2010 (48)	This value had high specificity in identifying women who drank more than 28 g (about two standard drinks) per day (44). Stranges, Freudenheim, Multi, Farinato, Russell, and Noschajski (49) found that more than two drinks per day for women and three drinks per day for men were associated with a high risk of liver damage ($n = 2943$). NIAAA defines risky drinking for females as the consumption of more than three drinks per occasion or seven drinks per week (45,46).
141	4 or more drinks/day	40	2012 (24)	The threshold for "excessive" drinking used by Helander et al. (24) ($n = 40$). NIAAA defines excessive drinking for men as the consumption of four or more drinks a day (45,49).
186	Five or more drinks for men and four or more for women on at least two occasions per month	58	2015 (50)	The mean for "binge drinkers" (five or more drinks for men and four or more drinks for women per sitting on at least two occasions during the previous month)
202	4.3 drinks/day	1339	2012 (16)	202 is the Suggested Guideline for "Highly Positive" The mean PEth for people drinking up to 60 g/or 4.3 std. drinks/day.
253	–	56	2007 (48)	The threshold to identify alcohol-dependent subjects needing detox treatment, from abstainers. Study results were recalculated using the 14 g standard unit.
499	6 drinks/day	111	2015 (19)	This is the median number of drinks consumed per day by alcohol-dependent men and women entering treatment. The range was 3.6–7 drinks/day over 6 weeks.
863 [†]	5–7 drinks/day	4	2011 (25)	Total PEth ng/mL was multiplied by 40% to convert it to the 16:0/18:1 PEth homologue equivalent
1000	7 drinks/day	144	2006 (18)	The mean PEth for those reporting about 7 drinks/day
1749	17 drink/day	57	2010 (28)	The study used alcohol-dependent patients who drank an average of 17 standard drinks per day over 7 days.
2165	14.5 or more drinks/day	144	2006 (18)	The mean for a group which reported averaging 14.5 or more drinks/day

*All PEth values are expressed as ng/mL of the 16:0/18:1 homologue. Total PEth measurements were converted by multiplying by 40%. PEth measurements in moles were converted by multiplying by 702 g/mole.

[†]Italics identifies this study as having fewer than 20 participants.

Afin de pallier à cette difficulté que représente la prise en compte de ces nombreux facteurs, la modélisation mathématique de la pharmacocinétique de formation et d'élimination du PEth semble une piste intéressante. Ainsi, Simon TW. en 2018 (75) a créé plusieurs scénarios dans lesquels il faisait varier la quantité d'alcool consommée ainsi que le rythme de consommation (figures 10 et 11). Par exemple, dans le premier scénario, les sujets consommaient une dose unitaire (DU) par jour pendant 21 jours puis restaient abstinents pendant 21 jours. Cette étude permet d'une part d'obtenir des données en fonction du sexe, de la consommation journalière, ainsi que du rythme de consommation et d'autre part de mettre clairement en évidence la variabilité interindividuelle.

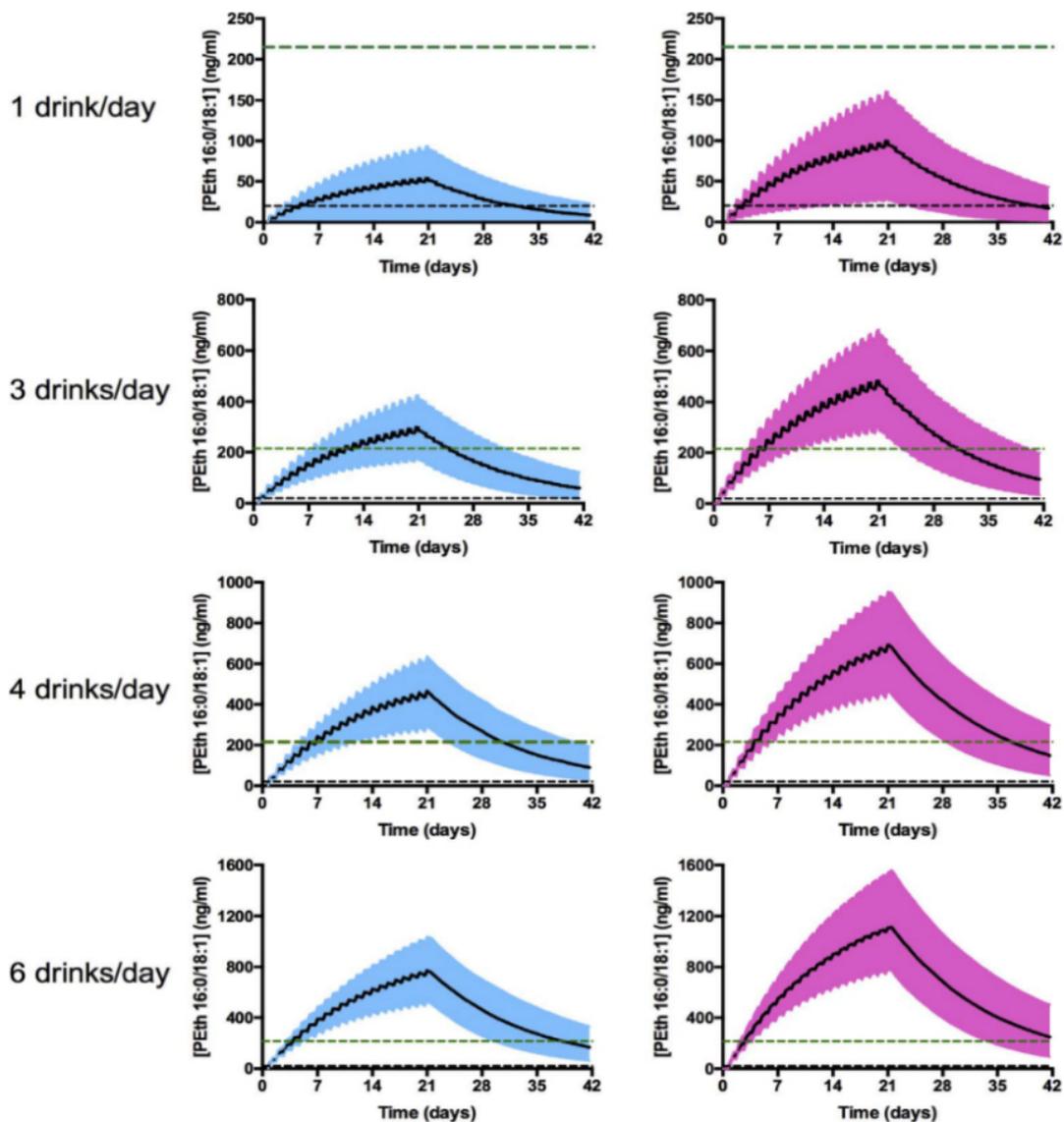


Figure 10: Evolution de la concentration en PEth en fonction de la consommation journalière chez l'homme (en bleu) et chez la femme (en rose). La médiane est représentée par la courbe noire, les écarts interquartiles par les bandes de couleur, la valeur-seuil d'interprétation de 200 $\mu\text{g/L}$ par la droite verte en pointillés et la limite inférieure de quantification (LIDQ) de 20 $\mu\text{g/L}$ par la ligne en pointillés noire. Selon Simon TW. 2018 (75)

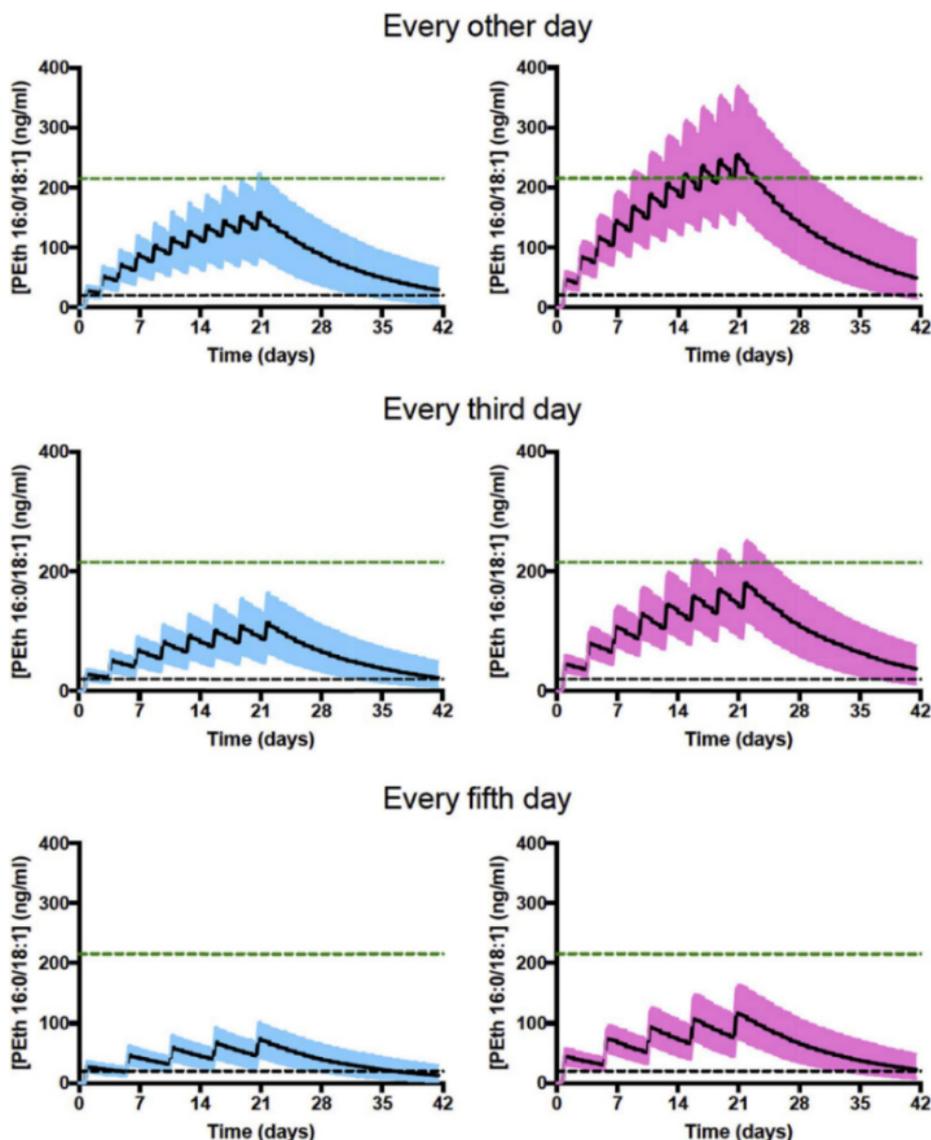


Figure 11: Evolution de la concentration en PEth en fonction de la consommation de 3 doses d'alcool à intervalle variable ($1j/2$, $1j/3$, $1j/5$) chez l'homme (en bleu) et chez la femme (en rose). La médiane est représentée par la courbe noire, les écarts interquartiles par les bandes de couleur, la valeur-seuil d'interprétation de 200 $\mu\text{g/L}$ par la droite verte en pointillés et la LIDQ de 20 $\mu\text{g/L}$ par la ligne en pointillés noire. Selon Simon TW. 2018 (75)

Pour conclure, au regard de ces résultats, dans le cadre de notre routine nous utilisons actuellement les valeurs seuils d'interprétation suivantes :

- 200 $\mu\text{g/L}$ pour définir une consommation supérieure à 42 DU/semaine chez un homme et 28 DU/jour chez une femme.
- 20 $\mu\text{g/L}$ pour définir une consommation supérieure à 10 DU/semaine.

4. Méthodes d'analyses

En ce qui concerne les méthodes d'analyses mises en œuvre retrouvées dans la littérature (67), le PEth a d'abord été analysé par chromatographie sur couche mince (CCM), qui ne permet pas une analyse quantitative. Il a ensuite été dosé dans le sang total par chromatographie liquide (CL) couplée à une détection par détecteur évaporatif à diffusion de lumière. Les limites de détection et de quantification de cette méthode étaient aux alentours de 200 $\mu\text{g/L}$. Avec une telle méthode quantitative, il a été possible d'établir une corrélation entre les concentrations sanguines de PEth et la consommation excessive d'alcool au cours

des semaines précédentes. Actuellement, l'analyse du PEth est principalement réalisée par technique de CL couplée à la spectrométrie de masse (SM) en tandem. Cette technique a permis de différencier 48 homologues de PEth différents. Parallèlement, l'augmentation de la sensibilité et de la spécificité a permis de diminuer la quantité d'alcool consommée nécessaire à détecter le PEth ainsi que la quantité d'alcool consommée entraînant une variation des concentrations de PEth.

Le dosage du PEth est effectué sur des prélèvements de sang total avec des protocoles d'extraction suivant une procédure qui repose généralement sur les éléments suivants :

- L'addition d'un étalon interne (EI) (phosphatidylbutanol, phosphatidylpropanol, PEth deutéré)
- L'addition d'un agent précipitant (isopropanol)
- Une extraction liquide-liquide par de l'hexane principalement
- Un séchage
- Une reconstitution pour l'analyse par CL-SM/SM

Les différents protocoles ont ensuite été améliorés en modifiant les composés utilisés ou en ajoutant certaines étapes comme l'utilisation de la micro-extraction dispersive liquide-liquide ou l'extraction en phase solide (SPE). Pour faciliter la phase préanalytique en routine, l'utilisation de SPE en ligne ou l'automatisation ont été également rapportées. Enfin, pour pallier à la faible stabilité du PEth dans le tube de sang, le transfert d'une faible quantité de sang sur DBS est utilisé avec plusieurs avantages : il est peu invasif si le prélèvement est effectué en capillaire (au bout du doigt), nécessite de faibles volumes (5 à 20 μ L), se stocke et se transporte facilement réduisant ainsi les coûts et permet de supprimer la néoformation post-prélèvement de PEth une fois le sang déposé sur le papier buvard. Les protocoles d'extraction sont relativement similaires à ceux sur sang total. Dans le cas du PEth, le DBS nécessite de déposer un volume précis et connu de sang et de récupérer (et d'analyser) la totalité du spot de sang, cela en raison de l'influence de la répartition des GR dans la tache de sang sur les concentrations de PEth.

Depuis ces dernières années, les dosages de PEth et leurs applications (et interprétations) font l'objet de publications de plus en plus nombreuses (Figure 12).

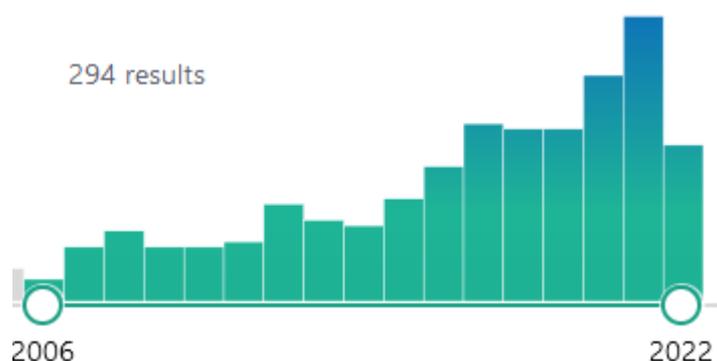


Figure 12 : Résultat d'une recherche « phosphatidyléthanol » dans le titre ou l'abstract sur PubMed le 15/06/2022,

Dans l'idée de diffuser le plus largement possible les informations concernant ce biomarqueur à la communauté scientifique francophone, j'ai écrit un article de synthèse qui a été publié dans les Annales de Biologie Clinique (**Article 1**)

Article 1

Dosage sanguin du phosphatidyléthanol / Phosphatidylethanol blood analysis

Hakim F, Wiart JF, Ménard, O Allorge D, Gaulier JM

Ann Biol Clin (Paris) 2019;77(6):638-644. doi.org/10.1684/abc.2019.1499

Dosage sanguin du phosphatidyléthanol

Phosphatidylethanol blood analysis

Florian Hakim^{1,2}

Jean-François Wiart¹

Olivier Ménard³

Delphine Allorge^{1,2}

Jean-Michel Gaulier^{1,2}

¹ CHU Lille, Unité fonctionnelle de toxicologie, Lille France

² Université Lille, EA 4483 – IMPECS – Impact de l'environnement chimique sur la santé humaine, Lille France

³ CHU Lille, Service d'addictologie, Lille France

Résumé. Cet article se propose de situer le dosage sanguin du phosphatidyléthanol (PEth) dans le panorama du dépistage d'une consommation d'éthanol provoquant des troubles liés à l'usage d'alcool (TUA), et de présenter les méthodes d'analyse disponibles, les données d'interprétation, quelques applications pratiques et les perspectives d'utilisation de ce biomarqueur. Le PEth est un métabolite mineur de l'éthanol. Parmi près de 50 homologues du PEth existants, le PEth 16:0/18:1 est le plus abondant. L'intérêt que présente le PEth par rapport aux autres biomarqueurs est l'élargissement de la fenêtre de détection d'une consommation d'éthanol. En effet, il présente une demi-vie d'élimination sanguine d'environ 5 jours, ce qui permet une estimation des consommations d'alcool sur 21 à 28 jours. Ainsi, ses principales applications en routine se situent dans le dépistage des TUA et le suivi de sevrage (en association systématique avec le dosage urinaire d'éthylglucuronide) en addictologie et en pré- et post-transplantation hépatique. Des données demeurent cependant nécessaires pour parfaire l'interprétation des concentrations sanguines mesurées et parvenir à un consensus concernant les valeurs-seuils d'interprétation.

Mots clés : *phosphatidyléthanol, alcoolodépendance, dried blood spot (DBS), spectrométrie de masse, applications cliniques*

Abstract. This article aims to place the phosphatidylethanol (PEth) blood test in the detection area of ethanol consumption causing alcohol-related disorders, to present the current methods of analysis, data on interpretation, some practical applications and the prospects of use of this biomarker. PEth is a minor metabolite of ethanol. Among nearly 50 PEth counterparts, PEth 16:0/18:1 is the most abundant. The interest that PEth brings compared to other biomarkers is the extended window of detection of ethanol consumptions. Indeed, it has a blood elimination half-life of approximately 5 days, which offers estimated alcohol consumption for a 21 to 28 days period. Thus, the detection of alcohol use disorders and withdrawal monitoring (systematically combined with urinary ethylglucuronide) in addictology and in liver pre- and post-transplantation are today its main routine applications. Nevertheless, additional data are still necessary to improve the interpretation of measured concentrations and to reach a consensus on interpretation cut-offs of blood PEth concentrations.

Key words: *phosphatidylethanol, alcohol dependence, dried blood spot (DBS), mass spectrometry, clinical applications*

Article reçu le 26 juillet 2019,
accepté le 17 octobre 2019

L'éthanol est un toxique communément consommé et dont l'abus (troubles liés à l'usage d'alcool – TUA – qui font partie des maladies psychiatriques et se définissent comme un usage d'alcool causant une déficience ou une détresse cliniquement importante) est associé à de nombreux problèmes sociétaux (sécurité routière, violences, délit et crimes...) et sanitaires. Le métabolisme de l'éthanol est principalement oxydatif (90 %). Son métabolite toxique, l'acétaldéhyde, est produit par le biais de trois voies biochimiques : alcool déshydrogénase (ADH), cytochrome P450 (CYP2E1) et catalase. Le métabolisme non oxydatif (10 %) donne lieu à la production de métabolites mineurs, dont le phosphatidyléthanol (PEth). Il existe deux

types de biomarqueurs d'une consommation d'éthanol [1], les marqueurs indirects et les marqueurs directs. Les marqueurs indirects (transaminases, volume globulaire moyen (VGM), gamma-glutamyl transpeptidase (g-GT), transferrine carboxy déficiente (CDT) sont liés à des modifications métaboliques induites chez les patients alcoolo-dépendants. Les marqueurs directs sont l'éthanol lui-même et ses métabolites mineurs, notamment l'éthylglucuronide (EtG), le PEth, l'éthylsulfate, ou encore les éthyl-esters d'acide gras. Le PEth est produit par la transphosphatidylolation de phospholipides (principalement la phosphatidylcholine) avec l'éthanol [2, 3]. Cette réaction est catalysée par la phospholipase D (PLD) qui, en l'absence d'éthanol, hydrolyse la membrane des phospholipides en acide phosphatidique (PA) [4]. Contrairement aux autres cellules, les globules rouges ne possèdent pas la phosphatidylcholine phospholipase C qui catalyse la dégradation du PEth [5, 6]. En conséquence, le sang total constitue la matrice la plus intéressante pour le dosage du PEth. En fait, il existe au moins 40 homologues de PEth, qui diffèrent par leurs deux chaînes d'acide gras. Ceux qui sont retrouvés en fortes concentrations dans le sang humain à la suite d'une exposition à l'éthanol sont les PEth 16:0/18:2, 18:1/18:1 et 16:0/18:1 [7] qui est le plus abondant (figure 1).

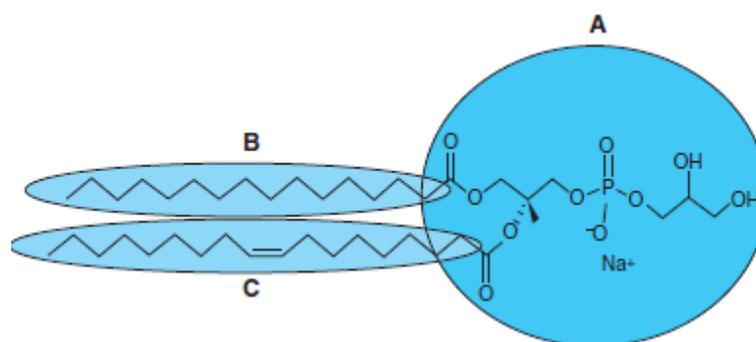


Figure 1. PEth 16:0/18:1. (A) noyau commun des PEth, (B) première chaîne d'acides gras (palmitoyle) et (C) deuxième chaîne d'acides gras (oléoyle monoinsaturée).

Le PEth 16:0/18:1 représente effectivement environ 40 % des PEth présents contre 22 % pour le PEth 16:0/18:2 [8]. Dans le cadre de la détection de la prise de boissons alcoolisées, le dosage du PEth 16:0/18:1 dans le sang est donc théoriquement le biomarqueur le plus sensible : une sensibilité de 86 % et une spécificité de 100 % sont généralement rapportées [8]. Après une consommation aiguë d'éthanol, le PEth 16:0/18:1 est retrouvé progressivement dans le sang avec un Tmax de 90 à 120 minutes. Sa demi-vie d'élimination sanguine est longue (3 à 7 jours [1, 9-11]) et son dosage sanguin permet donc théoriquement sa détection pendant les 21 à 28 jours qui suivent la consommation d'éthanol. Cette importante fenêtre de détection (3 semaines) se rapproche de celle offerte par le dosage de l'EtG dans les cheveux (3 à 6 mois) [12].

Les avantages du dosage sanguin du PEth par rapport à celui de l'EtG capillaire sont nombreux : matrice (sang) plus usuelle et moins compliquée à prélever et à analyser que les cheveux, délai d'analyse plus court, coût analytique moindre. Aujourd'hui, ce biomarqueur d'exposition à l'éthanol est devenu un outil dont l'utilisation se déploie en routine, comme en témoigne le nombre croissant de publications internationales en rapport (figure 2).

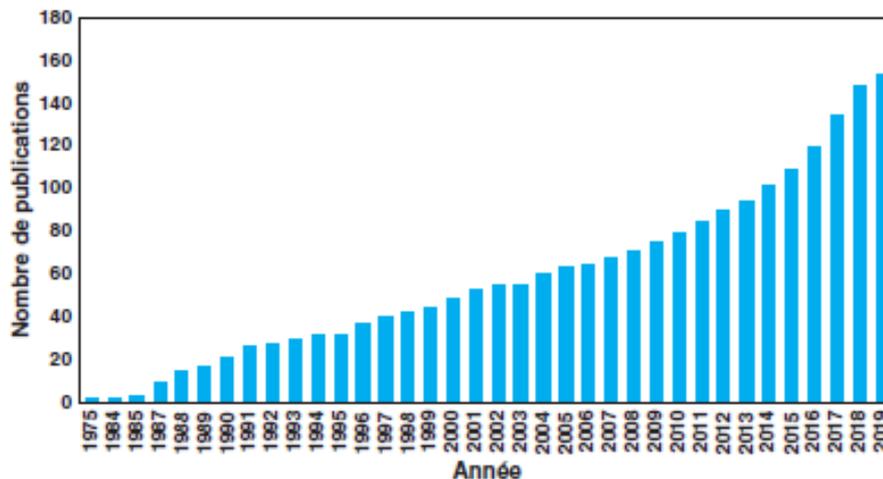


Figure 2. Nombre de publications cumulées, indexées dans PubMed et retrouvées (08/07/2019) sur la base du mot clé « phosphatidylethanol » dans le titre et/ou l'abstract

Le phosphatidyléthanol présente cependant deux difficultés :

- du fait de sa nature chimique, il n'est pas aisé d'en réaliser l'analyse et la quantification. Cependant, les récentes avancées méthodologiques et techniques permettent aujourd'hui d'en envisager le dosage en routine [13] ;
- le PEth est dit instable in vitro (dans le tube de sang) au bout de quelques jours à température ambiante [14, 15]. Des travaux récents proposent une solution élégante pour stabiliser le PEth sanguin : l'utilisation de dried blood spot (DBS) [8, 16]. En effet, dans une goutte de sang séché sur un papier buvard, le PEth apparaît stable au moins 6 mois à température ambiante [8, 17].

Méthodes de dosage

Historiquement, le PEth a d'abord été analysé par chromatographie sur couche mince (CCM) qui n'en permettait pas une analyse quantitative. Le PEth a été ensuite dosé dans le sang total par chromatographie liquide (CL) combinée à une détection par détecteur évaporatif à diffusion de lumière. Les limites de détection (LDD) et quantification (LDQ) de cette méthode étaient situées aux alentours de 200 µg/L. Avec une telle méthode quantitative, il n'était pas possible d'établir de corrélation entre les concentrations sanguines de PEth pouvant être mesurées et la consommation excessive d'alcool au cours des quelques semaines précédentes [13]. Actuellement, l'analyse du PEth est principalement réalisée par technique de CL avec une détection par spectrométrie de masse en tandem (SM/SM). Cette technique a permis de différencier près de 50 homologues de PEth différents. Mais surtout, l'augmentation des performances analytiques et le dosage spécifique du PEth 16:0/18:1 ont permis de mieux apprécier les différents niveaux de consommation (faible, modéré et excessif).

Aujourd'hui, le dosage sanguin du PEth est réalisé à partir de sang total avec des protocoles d'extraction variable, mais qui suivent une procédure reposant généralement sur les éléments suivants : addition d'un étalon interne (phosphatidylbutanol, phosphatidylpropanol ou PEth deutéré), addition d'un agent précipitant (isopropanol), extraction liquide-liquide (hexane principalement), séchage et reprise par la phase mobile pour une analyse par CL-SM/SM. Certains protocoles ont été améliorés par l'ajout de certaines étapes comme l'utilisation de la micro-extraction dispersive liquide-liquide ou l'extraction en phase solide (SPE). Pour faciliter l'étape pré-analytique, l'utilisation d'extraction online par SPE ou l'automatisation est

également proposée. Enfin, pour pallier l'instabilité pré-analytique réputée du PEth dans le tube de sang, le transfert d'une faible quantité de sang sur buvard (DBS) est utilisé avec plusieurs avantages :

- il s'agit d'une méthode alternative de prélèvement sanguin qui est peu invasive (prélèvement effectué en capillaire au bout du doigt comme avec les hémogluco-tests pour les glycémies du diabétique) avec un faible volume sanguin prélevé (5 à 20 μL) ;
- le stockage et le transport de l'échantillon (papier buvard) sont faciles et peu coûteux (température ambiante) ;
- il n'y a pas de néoformation in vitro de PEth sur DBS [13], alors que l'existence de ce phénomène dans un tube de sang a été suggérée [18].

Les protocoles d'extraction à partir d'un DBS sont relativement similaires à ceux du sang total dans un tube. Le PEth étant situé dans la membrane des globules rouges, l'influence de l'hématocrite sur les concentrations mesurées est significative. C'est la raison pour laquelle, afin de limiter cette influence, il est nécessaire (1) de déposer un volume précis et connu de sang et (2) de récupérer (et d'analyser) la totalité du spot de sang [19]. Il est ici important de préciser qu'il existe deux manières de pratiquer des analyses quantitatives sur DBS : les méthodes non volumétriques et les méthodes volumétriques. Les méthodes non volumétriques consistent à utiliser des spots de sang (obtenus généralement à partir de gouttes de sang recueillies directement au bout du doigt du patient) dont le volume n'est pas maîtrisé, et d'analyser une surface fixe (un diamètre fixe de buvard) prélevée à l'intérieur du spot de sang. Ce type de méthode offre l'avantage de s'affranchir de la contrainte de mesurer le volume de sang déposé sur le buvard. Mais dans le même temps, les résultats obtenus par ces méthodes vont subir l'influence de l'hématocrite. Cette influence est essentiellement liée aux variations de viscosité du prélèvement sanguin qui vont impacter l'étalement du sang sur le buvard, ainsi que la répartition des globules rouges dans le spot de sang. Les méthodes volumétriques consistent en un dépôt d'un volume précis de sang et en l'analyse de l'intégralité du spot de sang obtenu. Dans le cas des méthodes de dosage sanguin du PEth, ce sont les méthodes volumétriques qui sont très largement employées selon deux modalités : prélèvement au pli du coude du patient (généralement sur tubes citratés car le PEth apparaît stable dans le sang au moins quelques heures avec cet anticoagulant) et transfert d'un volume précis (pipette de précision) sur le buvard, au laboratoire, ou bien, utilisation de dispositifs alternatifs de prélèvement (de type Hemaxis®, DBS System SATM, Gland, Suisse) permettant la mesure d'un volume précis de sang prélevé au bout du doigt du patient, et son transfert direct sur un buvard par le préleveur.

Interprétation

Sur le plan de l'interprétation des résultats, la première difficulté provient du fait qu'il n'existe pas de définition « scientifique et médicale » précise et consensuelle d'une consommation excessive d'alcool. Ainsi, et par exemple, la « consommation chronique à risques élevés » est définie par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) comme étant une consommation quotidienne égale ou supérieure à 6 doses standards (soit 60 g) par jour pour les hommes, et à 4 doses standards (soit 40 g) par jour pour les femmes. En France, Santé publique France et l'Institut national du cancer ont mené récemment un travail d'expertise scientifique qui a permis de fixer de nouveaux repères de « consommation à moindre risque », avec un

maximum de 2 verres standards par jour, sans dépasser 10 verres standards par semaine, pour les hommes comme pour les femmes.

En ce qui concerne le dosage sanguin du PEth, aucune valeur seuil d'interprétation ne fait actuellement l'objet d'un consensus international. D'une manière générale, plusieurs études [8, 20-22] s'accordent sur une concentration sanguine de PEth 16:0/18:1 aux alentours de 200 µg/L pour détecter les « consommateurs excessifs » (tableau 1).

Tableau 1. Concentrations sanguines seuils de PEth 16:0/18:1 proposées dans la littérature pour la détection des « consommateurs excessifs ».

Concentration sanguine de PEth 16:0/18:1 proposée comme seuil de détection	221 µg/L [8]	200 µg/L [20]	202 µg/L [21]	215 µg/L [22]
Définition du « consommateur excessif » utilisée	Non précisée	Plus de 56 g/J d'éthanol (NIAAA)	Plus de 60 g/J d'éthanol (OMS)	Non précisée

Un autre seuil de concentration est retrouvé dans la littérature, celui de 20 µg/L. Pour dépasser cette concentration, il faudrait 2,5 doses standards d'éthanol par jour pour un homme (soit 35 g/J, car une dose standard américaine représente 14 g d'éthanol, contre 10 g selon l'OMS) et 1,5 à 2 doses/J pour une femme [23]. Plusieurs études proposent d'établir une relation entre une concentration sanguine de PEth et une consommation d'éthanol (contrôlée ou rapportée). Une méta-analyse [11] regroupe d'ailleurs ces données pour proposer, en conclusion, des valeurs seuil d'interprétation :

- < 20 µg/L : faible ou pas de consommation (< 2 doses/J, plusieurs jours par semaine) ;
- entre 20 et 200 µg/L : consommation modérée (2 à 4 doses/J plusieurs jours par semaine) ;
- > 200 µg/L : consommation excessive définie comme étant supérieure à 4 doses/J plusieurs jours par semaine.

Cependant, l'estimation d'une consommation d'alcool en fonction des concentrations sanguines en PEth doit tenir compte du fait que ce biomarqueur, au vu de sa demi-vie d'élimination sanguine longue, est cumulatif. Ainsi, la concentration sanguine va dépendre de plusieurs facteurs comme le moment de la dernière consommation, la fréquence de consommation, la quantité ingérée et la variabilité interindividuelle (sexe, métabolisme...). Au total, ces éléments expliquent fort probablement la diversité des études et des propositions de cut-offs dans la littérature [11].

En pratique

Nous avons développé une méthode de dosage du PEth sur DBS, validée selon la norme ISO 15189 et accrédité Cofrac en portée B, au CHU de Lille. Cette méthode repose sur un prélèvement sanguin sur tube citraté (nous précisons que compte tenu de la présence de cet anticoagulant liquide et donc de la dilution au 9/10 du sang, nous vérifions le remplissage correct des tubes à réception au laboratoire, et nous réalisons les gammes de calibrage dans les mêmes conditions - tubes citratés - pour corriger cette légère dilution), le dépôt de 10 µL de sang total sur un papier buvard à réception du tube, une extraction solide-liquide avec

utilisation comme étalon interne de PEth deutéré (D5) et une analyse par chromatographie liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM). La LDD (= LDQ) est de 5 µg/L. Des contrôles de qualité internes [24] et des contrôles de qualité externes [25] sont disponibles pour cette méthode, et il est possible de réaliser aisément, grâce au support DBS, des évaluations interlaboratoires. Cette méthode est mise en œuvre en routine depuis début 2019. À ce jour, les services cliniques d'addictologie et d'hépatogastro-entérologie du CHU de Lille prescrivent la quasi-totalité des demandes de dosage sanguin de PEth reçues par notre laboratoire.

En addictologie [26], le dépistage, l'évaluation et le suivi d'une alcoolo-dépendance reposent principalement sur l'entretien clinique, associé éventuellement à l'utilisation de biomarqueurs de la consommation d'éthanol (principalement l'éthanolémie ou éthalonurie, l'EtG urinaire, voire les marqueurs indirects tels que les CDT). Cependant, les données recueillies supposent une complète observance du patient vis-à-vis de son suivi, ainsi qu'une bonne alliance avec le praticien. Au-delà de 72 h (fenêtre de détection maximale de l'EtG urinaire), le clinicien ne dispose plus de marqueurs objectifs pour dépister une consommation d'éthanol. C'est dans ce cadre que le PEth, disposant d'une fenêtre de détection moyenne d'environ trois semaines, intéresse les addictologues. L'exemple suivant illustre cet intérêt : il s'agit d'un patient suivi régulièrement par le service d'addictologie pour prise en charge d'un TUA. Lors d'une consultation, ce patient déclare une absence de consommation d'éthanol depuis près d'un an et les biomarqueurs usuels (éthanolémie et EtG urinaire et capillaire) se révèlent effectivement négatifs (ou non-déTECTABLES). Cependant, il présente des concentrations sanguines de PEth situées entre 300 et 400 µg/L lors de trois consultations successives. Le clinicien décide de confronter le patient à ces résultats. Le patient indique finalement une consommation quotidienne de 2 à 3 verres. Les addictologues ont pu alors adapter sa prise en charge et les dosages sanguins suivants de PEth à 65 µg/L (3 semaines plus tard) et à 30 µg/L (7 semaines plus tard) ont confirmé une diminution significative de sa consommation d'alcool sans, toutefois, obtenir une abstinence totale.

Le service d'hépatogastro-entérologie prescrit les dosages sanguins de PEth dans des contextes d'hépatopathie alcoolique et de transplantation hépatique. La maladie alcoolique du foie (MAF) est une manifestation clinique de l'effet de la consommation régulière et abusive d'éthanol sur le foie. Cette consommation régulière entraîne d'abord une stéatose, c'est-à-dire une accumulation anormale d'acides gras et de triglycérides dans les hépatocytes (> 5 % de la masse de l'hépatocyte). À ce stade, un arrêt de la consommation d'éthanol permet une réversibilité des lésions. La poursuite d'une consommation régulière excessive peut entraîner une stéato-hépatite alcoolique, qui se caractérise par une inflammation du parenchyme hépatique et une fibrose par activation des cellules stellaires hépatiques. La poursuite de ce processus de fibrose, accompagné d'atrophie des hépatocytes et, en réponse, d'une régénération des hépatocytes, entraîne l'apparition de nodules cirrhotiques [27]. Les éléments clés permettant d'améliorer le pronostic d'une MAF sont l'arrêt total des consommations en alcool et le maintien de cette abstinence à long terme. Cette période d'abstinence est un prérequis commun lorsque l'ALD nécessite une transplantation, une durée de 6 mois étant habituellement demandée. Pour cela, il est essentiel de pouvoir documenter cette abstinence de façon efficace. C'est dans ce cadre que se situe l'utilisation des biomarqueurs de la consommation d'éthanol tels que le PEth sanguin [28]. Une fois la greffe effectuée, une abstinence totale en alcool est là encore requise. De nombreuses études ont toutefois mis en

évidence que la reprise des consommations d'alcool était relativement fréquente en postgreffe, avec une fréquence des rechutes sévères de l'ordre de 18 % après 9 ans de suivi. Celles-ci sont alors à l'origine d'une cirrhose du greffon dans près d'un tiers des cas [29]. Le repérage précoce de la reprise des consommations d'alcool en post-greffe s'avère donc être un enjeu majeur. Pour cela, l'utilisation de biomarqueurs de la consommation d'éthanol peut ici également aider le clinicien et permettre la mise en place d'une procédure de réduction des risques chez ces patients [30, 31]. À titre d'illustration, prenons le cas de ce patient de 39 ans, greffé au 1er trimestre 2017. Au 2e trimestre 2019, dans le cadre de son suivi systématique de post-greffe hépatique, ce patient a présenté une concentration sanguine de plus de 900 µg/L de PEth ; le service a alors convoqué ce patient afin qu'il bénéficie d'une prise en charge addictologique en urgence.

Conclusion et perspectives

Le dosage sanguin du PEth constitue un outil prometteur dans l'amélioration de la prise en charge des TUA. Les méthodes analytiques peuvent être mises en œuvre en routine dans des conditions (incluant le délai de rendu de résultats) en adéquation avec les nécessités et contraintes cliniques. Il est cependant indéniable que ce nouveau biomarqueur devra bénéficier dans un futur proche d'études clinico-biologiques permettant une consolidation de l'interprétation des concentrations mesurées, voire aboutissant à un consensus concernant les valeurs seuils d'interprétation (cut-offs).

Enfin, le dosage sanguin du PEth peut probablement s'appliquer efficacement à d'autres domaines de la toxicologie biologique et médico-légale.

Ainsi, et par exemple, les obstétriciens commencent à s'intéresser à cet outil pour le dépistage d'une consommation d'éthanol chez la femme enceinte [32]. L'incidence des troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF) est estimée à 0,9 % des naissances en France et l'alcool est la première cause (non génétique) de retard mental en France. L'élément premier du dépistage des TCAF est la mise en évidence d'une consommation significative d'alcool pendant la grossesse. En réalité, il n'existe pas de dose seuil d'éthanol à partir de laquelle le risque est avéré pour l'enfant à naître. Toutefois, une consommation supérieure à un verre par jour semble présenter un risque significatif. Ainsi, les recommandations actuelles sont de ne pas consommer de boissons alcoolisées durant toute la durée de la grossesse, et ce quelle que soit la quantité. Le dépistage en service de gynécologie-obstétrique repose généralement sur un autoquestionnaire lors d'une consultation prénatale, sur le dosage de biomarqueurs de la consommation d'éthanol chez la future mère, ou sur un faisceau d'arguments composés d'une combinaison de ces différents outils. L'objectif de ce dépistage chez les femmes enceintes est de diriger celles suspectées de consommer de l'alcool vers un spécialiste, afin qu'une action de prévention soit effectuée et un éventuel suivi mis en place (soutien médico-psychosocial de type motivationnel).

Dans un cadre médico-légal, certains pays comme la Suisse ou la Belgique utilisent déjà le dosage du PEth sanguin pour la restitution du permis de conduire après une condamnation à la suite de la conduite de véhicule sous l'influence de l'alcool. Le PEth sanguin peut également fournir des informations sur les habitudes de consommations d'alcool dans un cadre médico-légal plus large, par exemple en cas d'échantillons sanguins recueillis après un délai important par rapport aux faits délictueux ou criminels.

Enfin, nos premiers essais de mise en œuvre du dosage de PEth en toxicologie médico-légale post mortem semblent prometteurs, même si l'applicabilité de ce biomarqueur demeure ici assujettie à plusieurs questions incluant notamment sa stabilité in corpus mortuus.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêts en rapport avec cet article.

Références

1. Heier C, Xie H, Zimmermann R. Nonoxidative ethanol metabolism in humans-from biomarkers to bioactive lipids. *IUBMB Life* 2016 ; 68(12) : 916-23. doi.org/10.1002/iub.1569.
2. Gustavsson L, Alling C. Formation of phosphatidylethanol in rat brain by phospholipase D. *Biochem Biophys Res Commun* 1987 ; 142 : 958-63. doi.org/10.1016/0006-291x(87)91507-.
3. Kobayashi M, Kanfer JN. Phosphatidylethanol formation via transphosphatidylation by rat brain synaptosomal phospholipase D. *J Neurochem* 1987 ; 48 : 1597-603. doi.org/10.1111/j.1471-4159.1987.tb05707.x.
4. Frohman MA. The phospholipase D superfamily as therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* 2015 ; 36(3) : 137-44. doi.org/10.1016/j.tips.2015.01.001.
5. Shield KD, Parry C, Rehm J. Chronic diseases and conditions related to alcohol use. *Alcohol Res* 2013 ; 35(2) : 155-73.
6. Rowland A, Miners JO, Mackenzie PI. The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification. *Int J Biochem Cell Biol* 2013 ; 45(6) : 1121-32. doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.019.
7. Berg T, Eliassen E, Jørgenrud B, Kabashi S, Petukhov A, Bogstrand ST. Determination of phosphatidylethanol 16:0/18:1 in whole blood by 96-well supported liquid extraction and UHPLC-MS/MS. *J Clin Lab Anal* 2019 ; 33(1) : e22-31. doi.org/10.1002/jcla.22631.
8. Kummer N, Ingels AS, Wille SMR, Hanak C, Verbanck P, Lambert WE, et al. Quantification of phosphatidylethanol 16:0/18:1, 18:1/18:1, and 16:0/16:0 in venous blood and venous and capillary dried blood spots from patients in alcohol withdrawal and control volunteers. *Anal Bioanal Chem* 2016 ; 408(3) : 825-38. doi.org/10.1007/s00216-015-9169-1.
9. Schröck A, Thierauf-Emberger A, Schürch S, Weinmann W. Phosphatidylethanol (PEth) detected in blood for 3 to 12 days after single consumption of alcohol-a drinking study with 16 volunteers. *Int J Legal Med* 2017 ; 131(1) : 153-60. doi.org/10.1007/s00414-016-1445-x.
10. Hill-Kapturczak N, Dougherty DM, Roache JD, Karns-Wright TE, Javors MA. Differences in the synthesis and elimination of phosphatidylethanol 16:0/18:1 and 16:0/18:2 after acute doses of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2018 ; 42(5) : 851-60. doi.org/10.1111/acer.13620.
11. Ulwelling W, Smith K. The PEth blood test in the security environment: what it is; why it is important; and interpretative guidelines. *J Forensic Sci* 2018 ; 63(6) : 1634-40. doi.org/10.1111/1556-4029.13874.
12. Imbert L, Gaulier JM, Dulaurent S, Lachatre G. Dosages urinaire et capillaire de l'éthylglucuronide. *Ann Biol Clin (Paris)* 2012 ; 70 : 629-34. doi.org/10.1684/abc.2012.0764.
13. Nguyen VL, Fitzpatrick M. Should phosphatidylethanol be currently analysed using whole blood, dried blood spots or both? *Clin Chem Lab Med* 2019 ; 57(5) : 617-22. doi.org/10.1515/cclm-2018-0667.
14. Van Der Nagel BCH, Wassenaar S, Bahmany S, Koch BCP. Quantification of phosphatidylethanol in whole blood as a proxy for chronic alcohol consumption, using ultra performance convergence chromatography tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 2018 ; 40(2) : 268-75. doi.org/10.1097/FTD.0000000000000492.
15. Andreassen TN, Havnen H, Spigset O, Falch BMH, Skråstad RB. High throughput UPLC®-MSMS method for the analysis of phosphatidylethanol (PEth) 16:0/18:1, a

- specific biomarker for alcohol consumption, in whole blood. *J Anal Toxicol* 2018 ; 42(1) : 33-41. doi.org/10.1093/jat/bkx075.
16. Kummer N, Lambert WEE, Samyn N, Stove CP. Alternative sampling strategies for the assessment of alcohol intake of living persons. *Clin Biochem* 2016 ; 49(13-14) : 107891. doi.org/10.1016/j.clinbiochem. 2016.05.007.
 17. Bakhireva LN, Shrestha S, Gutierrez HL, Berry M, Schmitt C, Sarangam D. Stability of phosphatidylethanol in dry blood spot cards. *Alcohol Alcohol* 2016 ; 51(3) : 275-80. doi.org/10.1093/alcalc/agv120.
 18. Aradóttir S, Seidl S, Wurst FM, Jönsson BAG, Alling C. Phosphatidylethanol in human organs and blood: a study on autopsy material and influences by storage conditions. *Alcohol Clin Exp Res* 2004 ; 28(11) : 1718-23. doi.org/10.1097/01.ALC.0000145687.41646.E5.
 19. Beck O, Kenan Modén N, Seferaj S, Lenk G, Helander A. Study of measurement of the alcohol biomarker phosphatidylethanol (PEth) in dried blood spot (DBS) samples and application of a volumetric DBS device. *Clin Chim Acta* 2018 ; 479 : 38-42. doi.org/10.1016/j.cca.2018.01.008.
 20. Simon TW. Providing context for phosphatidylethanol as a biomarker of alcohol consumption with a pharmacokinetic model. *Regul Toxicol Pharmacol* 94 ; 2018 : 163-71. doi.org/10.1016/j.yrtph.2018. 01.029.
 21. Viel G, Boscolo-Berto R, Cecchetto G, Fais P, Nalesso A, Ferrara SD. Phosphatidylethanol in blood as a marker of chronic alcohol use: a systematic review and meta-analysis. *Int J Mol Sci* 2012 ; 13(11) : 14788-812. doi.org/10.3390/ijms131114788.
 22. Helander A, Hansson T. National harmonization of the alcohol biomarker PEth. *Lakartidningen* 2013 ; 110(39-40) : 1747-8.
 23. Kechagias S, Dernroth DN, Blomgren A, Hansson T, Isaksson A, Walther L, et al. Phosphatidylethanol compared with other blood tests as a biomarker of moderate alcohol consumption in healthy volunteers: a prospective randomized study. *Alcohol Alcohol* 2015 ; 50(4) : 399-406. doi.org/10.1093/alcalc/agv038.
 24. <https://www.acq-science.de/en/produkte/peth-in-whole-blood—new-product-.html> (consulté le 08/07/2019).
 25. <https://www.equalis.se/en/products-services/eqa/phosphatidylethanol/> (consulté le 08/07/2019).
 26. Spithoff S, Kahan M. Prise en charge en soins primaires des troubles liés à l'usage d'alcool et de la consommation à risque. *Can Fam Physician* 2015 ; 61(6) : e259-65.
 27. Celli R, Zhang X. Pathology of alcoholic liver disease. *J Clin Transl Hepatol* 2014 ; 2(2) : 103-9. doi.org/10.14218/JCTH.2014.00010.
 28. Nguyen VL, Haber PS, Seth D. Applications and challenges for the use of phosphatidylethanol testing in liver disease patients (mini review). *Alcohol Clin Exp Res* 2018 ; 42(2) : 238-43. doi.org/10.1111/acer.13558.
 29. Dumortier J, Dharancy S, Cannesson A, Lassailly G, Rolland B, Pruvot FR, et al. Recurrent alcoholic cirrhosis in severe alcoholic relapse after liver transplantation: a frequent and serious complication. *Am J Gastroenterol* 2015 ; 110(8) : 1160-6. doi.org/10.1038/ajg.2015.204.
 30. Fleming MF, Smith MJ, Oslakovic E, Lucey MR, Vue JX, Al-Saden P, et al. Phosphatidylethanol detects moderate-to-heavy alcohol use in liver transplant recipients. *Alcohol Clin Exp Res* 2017 ; 41(4) : 857-62. doi.org/10.1111/acer.13353.
 31. Lim J, Sundaram V. Risk factors, scoring systems, and interventions for alcohol relapse after liver transplantation for alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis (Hoboken)* 2018 ; 11(5) : 105-10. doi.org/10.1002/cld.696.
 32. Haute autorité de santé (HAS). Troubles causés par l'alcoolisation fœtale : repérage. Recommandation de bonne pratique - Mis en ligne le 11 sept. 2013, https://www.hassante.fr/jcms/c_1636956/fr/troubles-causes-par-l-alcoolisation-fœtale-reperage (consulté le 08/07/2019).

1. Bilan du point de vue du toxicologue-analyste

Le toxicologue-analyste a une obligation de moyen et de résultats vis-à-vis de la demande de ses différents clients, dichotomisés en (i) le corps médical et (ii) les instances judiciaires. Ces demandes se faisant ainsi soit (i) sous la forme d'une prescription médicale soit (ii) sous la forme d'une mission d'analyse toxicologique.

L'objet de ces demandes est de répondre à des questions de natures variables :

- La question d'une alcoolisation récente, que ce soit dans le cadre d'une admission aux urgences ou en réanimation (comas, chirurgies...), de faits délictuels ou criminels ou en recherches des causes de la mort
- La question d'un éventuel statut « d'alcoolique chronique » en toxicologie biologique (prévention, dépistage et suivi et des troubles liés à l'usage de l'alcool (TUA) principalement en addictologie, en hépatologie, en obstétrique) ou en toxicologie médico-légale (délits, crimes, recherches des causes de la mort)
- La question d'un arrêt ou d'une diminution significative de la consommation d'alcool dans le cadre du suivi de sevrage ou de la surveillance d'une abstinence en addictologie, dans le cadre des transplantations hépatiques, mais aussi d'une obligation ou contrainte des soins, par exemple pour la restitution des permis de conduire.

Finalement, afin de répondre à ces questions, quels sont les biomarqueurs d'une exposition à l'éthanol nécessaires pour un laboratoire de toxicologie ? La réponse est, dans l'idéal, tous.

Les meilleures sensibilités et spécificités diagnostiques sont toujours obtenues par la combinaison de plusieurs marqueurs et, dans le cadre de l'éthanol, la combinaison de marqueurs disposant de fenêtres de détections très différentes permettant une estimation plus fine des habitudes de consommations qu'elles soient récentes ou chroniques.

Cependant, (i) le développement d'une méthode de dosage simultanée de l'ensemble des marqueurs n'est pas réalisable du fait de la grande variabilité physico-chimique de ces analytes, (ii) la réalisation du dosage de l'ensemble de ces analytes séparément nécessiterait une grande quantité de moyens matériels et de consommables (colonnes chromatographiques, étalons internes deutérés...), un temps technique et donc un délai de rendu ainsi qu'un coût pouvant être apprécié comme déraisonnable. Ainsi, il est nécessaire de choisir les marqueurs permettant une sensibilité et une spécificité diagnostique élevée tout en prenant en compte les variables de délai de rendu, d'équipements disponibles et de coût.

2. État des lieux au laboratoire de toxicologie du CHU de Lille et stratégie analytique et applicative

En 2018, au CHU de Lille, les biomarqueurs suivants étaient disponibles en routine : éthanol (sang, urine, humeur vitrée), éthylglucuronide dans l'urine, cocaéthylène, CDT, GGT, VGM et Transaminases. Du fait de leurs faibles sensibilités et spécificités, la majorité des biomarqueurs indirects (GGT, VGM et Transaminases) sont peu pertinents en pratique clinique. La CDT, quant à elle, est spécifique et dispose d'une sensibilité adéquate dans la détection d'une consommation chronique et excessive d'alcool. Cependant, certaines caractéristiques, inhérentes à un biomarqueur indirect, comme la latence de son augmentation ou de sa normalisation (environ 2 semaines, généralement supérieure à la durée d'une hospitalisation en sevrage hospitalier) mais également l'absence de corrélation entre la valeur du résultat et la quantité d'éthanol consommée, allée à une sensibilité analytique très faible (c'est-à-dire, de faibles variations des valeurs généralement exprimées en pourcentages des formes totales de transferrine) contrarient fortement en pratique médicale son utilisation pour les suivis de sevrage et d'abstinence.

Fin 2018, les services cliniques, au premier rang desquelles les hépatologues et transplantateurs nous ont sollicités pour développer une méthode de dosage du phosphatidyléthanol ainsi que celle de l'éthylglucuronide dans les cheveux (qui était jusqu'alors sous-traitée au CHU de Limoges). J'ai ainsi entrepris de développer ces deux méthodes de dosage qui sont aujourd'hui mises en œuvre en routine, notamment, pour les services de transplantation hépatique, d'addictologie et d'obstétrique. Parallèlement, et toujours en toxicologie biologique, ce travail s'est naturellement accompagné de rédaction et de soumission de protocoles de recherche clinique en addictologie (PETHOXICO) et en obstétrique (AUTOQUEST). Mais, à la suite de demandes en toxicologie médico-légales, j'ai également mis en œuvre ces outils dans des situations médico-légales.

PARTIE 2 - TRAVAIL PERSONNEL

1. Phosphatidyléthanol et éthylglucuronide sanguin

Le développement de la méthode de dosage du PEth n'a pas été linéaire. Elle a démarré sur la base des travaux d'une équipe suisse (78) et a été modifiée, améliorée, et étendue à d'autres biomarqueurs en fonction des demandes des prescripteurs, mais également des idées induites par les résultats du dosage en routine et mon travail de veille bibliographique. En effet, le périmètre de cet outil a été modifié et étendu plusieurs fois. À l'origine, mon travail a été le développement, la validation et l'accréditation du PEth 16:0/18:1 dans les DBS. À la suite de ma participation à des consultations addictologiques de patients en attente de greffe hépatique, j'ai réalisé l'intérêt de développer la méthode de dosage d'un marqueur dont la fenêtre de détection se situait entre le PEth 16:0/18:1 et l'éthylglucuronide urinaire. Mon choix, motivé par la lecture de l'article de Lopez *et al.* (38) c'est porté sur le PEth 16:0/20:4 qui dispose d'une fenêtre de détection d'environ 14 jours (contre 28 jours pour le PEth 16:0/18:1). Après une brève phase de développement, j'ai validé et accrédité cette nouvelle méthode de dosage. Enfin, l'utilisation du PEth dans un cadre médico-légal dans lequel les matrices sont parfois indisponibles ou en quantité restreinte, m'ont amené à ajouter un dernier marqueur, l'EtG sanguin, pour pallier à l'absence d'EtG urinaire et disposer, dans un seul « run » chromatographique, d'un biomarqueur d'une consommation récente (< 48 heures) et de biomarqueurs d'une consommation chronique (<14 jours et < 28 jours). L'ajout de cet analyte, aux caractéristiques physico-chimiques très éloignées des PEth, a demandé une phase de développement plus soutenue avec le changement de la colonne chromatographique (passage d'une colonne de 50 mm à une colonne de 150 mm) ainsi que des phases mobiles. Sur un plan préanalytique, face à la diversification des prescripteurs et grâce aux essais de stabilité réalisés, les possibilités de prélèvement ont été élargies au bénéfice des laboratoires extérieurs, des cliniciens, voire des patients eux-mêmes, avec le passage de l'utilisation initiale de tubes citratés exclusivement à l'utilisation des tubes citratés, fluorés, héparinés ou EDTA ainsi que l'utilisation de VAMS tels que les Hémaxis™ ou les Neoteryx Mitra™. Cette succession de phases de développement et de validation a abouti à la méthode analytique dont les éléments principaux (de développement et de validation) sont présentés ci-après.

1.1.Équipement

L'analyse du PEth a été réalisée par CL-SM/SM (XEVO TQ-S de la société WATERS, figure 13). Il existe plusieurs sources d'ionisations disponibles sur cet appareil : dans le cadre de ce travail, l'ionisation par Electrospray en mode négatif (ESI) sera utilisée.



Figure 13 : Spectromètre de masse : CL-SM/SM XEVO TQ-S (source : www.waters.com, consulté le 20/07/2022)

1.2.Phase préanalytique

1.2.1. Méthodes de prélèvement

Tube de sang

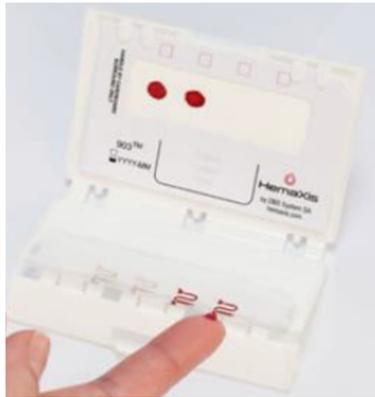
Les tubes de sang envoyés par les services sont des tubes contenant du citrate de sodium (BD Vacutainer REF 363048), utilisé ici à visée anticoagulante par chélation des ions calcium et magnésium. Mais également des tubes fluorés (BD Vacutainer REF 368920), héparinés (BD Vacutainer REF 368884), EDTA (BD Vacutainer REF 368860).

Influence de l'anticoagulant

L'utilisation de tubes citratés pour le dosage du PEth n'étant pas décrit dans la littérature, nous avons réalisé pour 12 patients un test de l'influence des principaux anticoagulants utilisés en routine sur ce dosage. Pour chaque patient, 4 tubes (1 tube citraté, 1 tube hépariné, 1 tube EDTA et 1 tube fluoré) ont été prélevés le même jour et de façon successive avant d'être analysés dans la même série. Les données sur cette étude montrent l'absence de différence significative entre les résultats des différents anticoagulants sur l'analyse du PEth (ANOVA univariée, $F = 1,842$; $p = 0,1587$; $R^2 = 0,1434$) à un temps T. Ainsi, l'utilisation de ces 4 types de tubes est possible dès lors que le prélèvement sanguin est pris en charge (déposé sur DBS) dès réception.

Dispositifs de prélèvement capillaires volumétriques

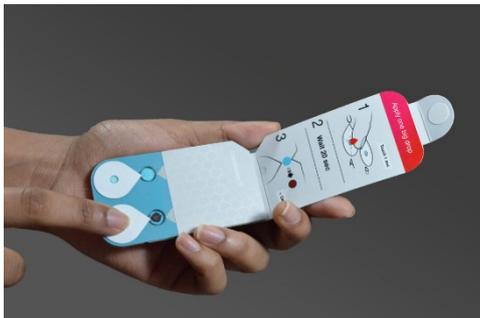
Il s'agit de systèmes de prélèvement volumétriques permettant le dépôt direct d'un volume précis de sang capillaire sur un papier buvard (VAMS, exemples en Figure 14). L'intérêt de ces dispositifs est de limiter le caractère invasif du prélèvement, de disposer de DBS facilement et avec un volume connu. Cependant, dans un cadre hospitalier et si les patients sont prélevés pour d'autres analyses, son utilisation n'est pas plébiscitée en pratique, car elle peut s'avérer chronophage pour l'équipe soignante (nécessité de réaliser un prélèvement au bout du doigt alors que le patient a déjà, généralement, eu des prélèvements sanguins au pli du coude).



Hemaxis DB10™



Neoteryx Mitra™



Capitainer®qDBS™



Tasso-M20™

Figure 14 : Exemples (non exhaustif) de dispositifs volumétriques de prélèvements capillaires (VAMS) (Source : site des fabricants respectifs, consulté le 20/07/2022)

1.2.2. Transfert sur papier buvard

Lorsque le prélèvement s'effectue au pli du coude, 10 µL de sang sont transférés sur un buvard. Afin d'éliminer l'influence de la répartition des GR dans les DBS, nous avons choisi de déposer précisément (mesure à l'aide d'une pipette automatique calibrée - pipette à déplacement d'air P20, Thermo Scientific Finnpipette F2) 10 µL de sang sur un buvard (Figure 15), et de prélever (et d'analyser) la totalité du spot obtenu (c'est-à-dire d'analyser précisément 10 µL de sang séché) avec une poinçonneuse de diamètre 8 millimètres. Afin de nous assurer de la répétabilité des pipettes de précision lors de ce « spotting », nous avons calculé la moyenne des pesées. Nous trouvons $0,0102 \pm 0,0004$ g par pipetage pour le sang total et $0,0564 \pm 0,0031$ g pour le méthanol. Cela nous a permis de valider l'utilisation de cette pipette pour notre protocole de dosage.



Whatman 913™



Perkin Elmer 226™

Figure 15 : Exemple (non exhaustif) de buvards sur lesquels sont transféré 10 µL de sang total (Source : site des fabricants respectifs, consulté le 20/07/2022)

Test de contamination de la poinçonneuse

Afin d'évaluer la contamination de la poinçonneuse, nous avons poinçonné 3 fois le point haut de notre gamme (1000 µg/L), puis 3 fois le point à 0 µg/L, puis nous les avons analysés. Les résultats d'analyses des échantillons ont révélé une contamination inférieure à la limite inférieure de quantification (LIDQ) (5 µg/L) (Échantillon 1 : 2 µg/L, échantillons 2 et 3 non détectables). Pour pallier à tout risque de contamination, la poinçonneuse est nettoyée au méthanol entre chaque spot.

Temps de séchage des taches de sang sur buvards

Plusieurs temps ont été testés en ajoutant la solution d'extraction après 20, 30 ou 60 min de séchage à température ambiante sur un échantillon positif (sang total sur tube citraté dosé précédemment à 350 µg/L).

Nous avons constaté qu'au-delà de 30 minutes de séchage, les spots sont secs et les résultats d'analyse ne varient plus.

Exemple de résultats pour un échantillon à 350 µg/L :

- Après 20 minutes de séchage : 225 µg/L
- Après 30 minutes de séchage : 361 µg/L
- Après 60 minutes de séchage : 355 µg/L

1.2.3. Extraction du PEth à partir des DBS

Choix de la solution d'extraction

Le choix de la solution d'extraction se base sur l'efficacité du solvant à extraire le PEth du DBS. Afin de déterminer la meilleure solution d'extraction, nous avons effectué des tests en utilisant tout d'abord un mélange de phases mobiles (A : 70 % acétonitrile 30 % acétate d'ammonium 2 mM et B : isopropanol) à différentes proportions (A/B (%/%) : 30/70, 40/60, 60/40 et 70/30), puis du méthanol pur (Methanol absolute Biosolve BV ULC/MS). Les résultats montrent une meilleure extraction (de l'ordre de 10 %) par les phases mobiles A2/B2, plus particulièrement pour le ratio 40 %/60 %, que par le méthanol. Cependant, le rendement d'extraction souffre d'une moins bonne répétabilité avec les phases mobiles A2/B2 qu'avec le méthanol seul. L'inconvénient du méthanol réside dans la difficulté de son prélèvement (problème de la pression de vapeur avec les pipettes à déplacement d'air, les liquides à pression de vapeur élevée tels que le méthanol forcent le coussin d'air à se dilater), ainsi que sa propension à s'évaporer. Nous avons conclu que l'utilisation du méthanol était préférable avec, cependant, l'ajout dans le protocole de précautions d'usage comme le préconditionnement du cône (par aspirations répétées) ainsi que la fermeture rapide et hermétique des vials.

Solutions mères et gammes de calibrations

Les solutions mères (fourni par LGC®) sont des solutions méthanoliques de PEth 16:0/18:1 à 73,2 mg/L, de PEth 16:0/20:4, d'EtG et d'EtG-D5 à 10 mg/L. Le tableau 7 résume la méthode de dilution des solutions mères afin de construire une gamme de calibration en 11 points.

Tableau 7 : Méthode de dilution des solutions mères et préparation des solutions méthanolique pour la gamme de calibration

Solution mère 16 :0/18 :1		73,20 mg/L
Solution fille	Solution mère	Méthanol
20 000 µg/L	3 825µL	10 175µl

Solutions mères deutérées	16 :0/18 :1 - D5 10 mg/L	EtG-D5 10 mg/L	Méthanol
100 µg/L	1 mL	1 mL	98 ml

Solutions méthanoliques préalable à la gamme de calibration						
PEth 16:0/18:1 µg/L	PEth 16:0/20:4 µg/L	EtG µg/L	16:0/18:1 µL	EtG µL	16:0/20:4 µL	Méthanol µL
20 000		/	180	/	/	20
10 000		5000	100	100	/	0
5000	5000	2500	100		100	0
2500	2500	1250		100		100
1250	1250	620		100		100
620	620	310		100		100
310	310	160		100		100
160	160	80		100		100
80	80	40		100		100
40	40	20		100		100
20	20	10		100		100
0	0	0		0		200

Gamme de calibration (dilution des solutions méthanoliques dans le sang)				
PEth 16:0/18:1 µg/L	PEth 16:0/20:4 µg/L	EtG µg/L	Solution gamme µL	Sang µL
2 000	/	/	20	180
1 000	/	500	20	180
500	500	250	20	180
250	250	125	20	180
125	125	62	20	180
62	62	31	20	180
31	31	16	20	180
16	16	8	20	180
8	8	4	20	180
4	4	2	20	180
2	2	1	20	180
0	0	0	20	180

Temps de contact

Les tests du temps de contact ont été effectués en laissant le spot en contact avec la solution d'extraction sans agitation, ni ultrasons, ni centrifugation et à température ambiante pendant une durée de 0, 5, 10, 20, 30 et 60 minutes. Les résultats montrent une absence de différence significative (CV<15 %) des concentrations dès 30 minutes.

Agitation

Les tests avec et sans agitation (Scientific Industries Vortex Genie 2) ont été effectués de la manière suivante : test sans agitation (durée d'extraction : 0, 5, 10, 20, 30, 60 min) et tests avec agitation de 10 secondes après le délai d'extraction (durée 0, 5, 10, 20, 30, 60 min). Les résultats montrent l'absence de différence significative (CV<15 %) entre l'extraction avec et sans agitation.

Ultrasons

Les tests d'extraction avec et sans ultrasons ont été effectués de la manière suivante : test avec agitation de 10 secondes (durée 0, 5, 10, 20, 30, 60 min), test avec agitation de 10 secondes et ultrasons (Bioblock Scientific 89878) (durée 1, 2, 3, 4, 5, 10 min). Les résultats montrent l'absence de différence significative (CV<15 %) entre le rendement maximal avec et sans ultrasons. Cependant, l'utilisation d'ultrasons permet d'atteindre ce rendement maximal en 2 minutes contre 30 min sans ultrasons.

Centrifugation

Les tests d'extraction avec et sans centrifugation ont été effectués de la manière suivante : test avec agitation de 10 secondes, ultrasons 2 minutes et avec ou sans centrifugation (15000g, 10 min, 4°C) (Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16R). Les résultats montrent l'absence de différence significative (CV<15 %) entre l'extraction avec ou sans centrifugation.

1.2.4. Synthèse pré analytique

L'ensemble de ces tests nous a permis de choisir le protocole préanalytique suivant : L'extraction est effectuée par une solution méthanolique (100 %) qui, malgré son rendement légèrement inférieur, permet une meilleure reproductibilité que l'utilisation de nos phases mobiles. L'utilisation du vortex et de la centrifugation est écartée. Enfin, les échantillons seront mis en contact avec la solution méthanolique sur une durée de 30 minutes minimum en l'absence d'ultrasons et de 2 minutes minimum en utilisant les ultrasons.

1.3.Phase analytique

1.3.1. Première méthode de séparation chromatographique

Choix de la colonne

La colonne (Kinetex® 2.6 µm C18 100 Å, LC Column 50 x 2.1 mm) est une colonne dite en phase inverse (apolaire), nécessitant l'utilisation de solvants polaires. Il existe un débit optimal de phase mobile pour lequel l'efficacité de la colonne est maximale (Hauteur Équivalente de Plateaux Théoriques (HEPT) minimal). En CL-SM/SM, au-dessus du débit optimal, l'efficacité de la colonne est pratiquement indépendante du débit de la phase mobile. Ceci permet de raccourcir les temps d'analyse, sans perdre trop de pouvoir de séparation (Figure 16).

Choix des phases mobiles

Le choix des phases mobiles de départ pour le développement de cette méthode est basé sur une collaboration avec une équipe Suisse (78) utilisant la même colonne :

- Phase A : 30 % d'une solution aqueuse d'acétate d'ammonium à 2 mM (Sigma-Aldrich Ammonium Acetate A7330-500G, eau milli-Q Millipore Corporation), 70 % d'acétonitrile (Acétonitrile Biosolve ULC/MS) et 0,1 % d'acide formique (Honeywell Formic acid 33015-500ML).
- Phase B: 100 % isopropanol (2-Propanol Biosolve ULC/MS).

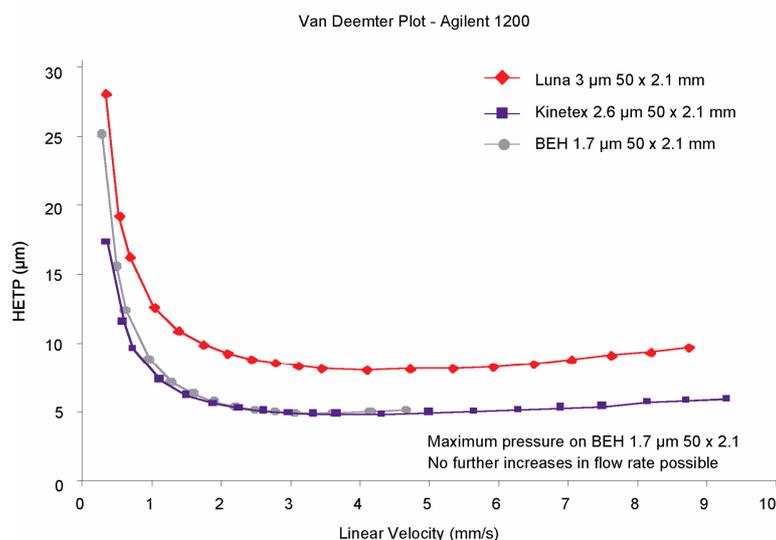


Figure 16: Courbe de Van Deemter Plot

Choix de l'étalon interne

Les homologues deutérés permettant la meilleure homologie de structure, et donc une meilleure fidélité, dans l'influence des processus préanalytique comme analytique (effet de matrice, dégradations ...), le PEth-D5 (PEth-D5 ammonium salt – 1mL -100 µg free acid/mL in chloroform 10943.39-100-CF LGC) est utilisé comme étalon interne (EI).

Premiers essais

Les premiers essais reprenant la méthode de dosage développé par J. Deglon *et al.* ont tout d'abord semblé concluants (figure 17). Cependant, le rapport entre les deux ions fils n'était

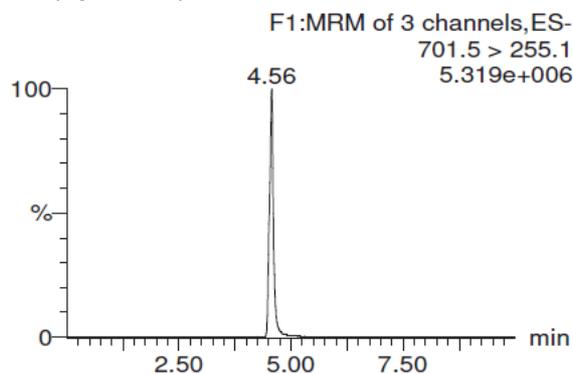


Figure 17: Premiers essais selon la méthode J.Dégлон 2018

pas celui retrouvé dans la littérature (rapport entre les ions fils = 2,0), notre rapport était plus élevé (environ 3,0) pouvant indiquer une co-élution. Ce constat a entraîné les essais suivants.

Molarité de l'acétate d'ammonium

Nous avons commencé par modifier la molarité de la phase mobile A qui est composée de 30 % acétate d'ammonium, 70 % d'acétonitrile et 0.1 % d'acide formique (v/v/v). Les tests ont été effectués en passant successivement un même échantillon avec une phase mobile A, dont l'acétate d'ammonium était à 2 mM, 5 mM ou 10 mM. Un amorçage des voies de 3 minutes à 8 mL/min a été réalisé entre chaque passage de l'échantillon.

Les tests ont été effectués à 2 mM, 5 mM (figure 18) et 10 mM (figure 19). Nous avons conclu que le 10 mM d'Acétate d'ammonium est le plus efficace (différence de temps de rétention le plus élevé) pour discriminer les pics.

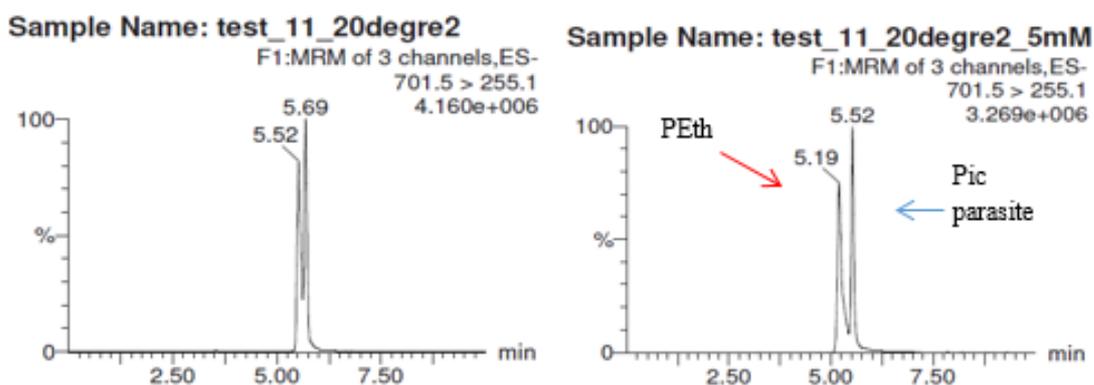


Figure 18: Chromatogramme selon la molarité d'acétate d'ammonium (2 mM à gauche et 5 mM à droite)

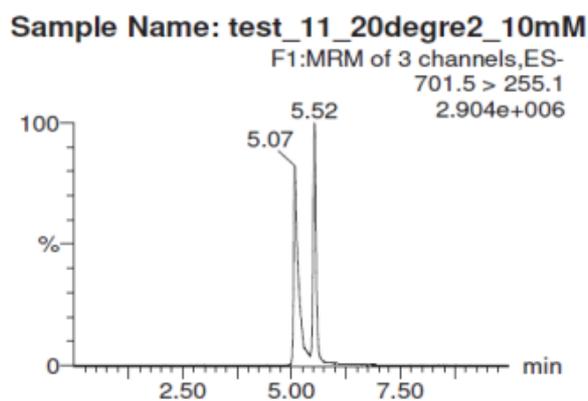


Figure 19: Chromatogramme selon la molarité d'acétate d'ammonium (10 mM)

pH

La phase mobile A contenait 0,1 % d'acide formique, donnant une solution à pH 3,7. Vu les propriétés de la molécule et de son pKa, nous avons prédit une meilleure stabilité à pH 4,7. Nous avons donc calculé qu'il fallait 0,05 % d'acide formique pour arriver à ce pH. Une vérification sur pH-mètre a été effectuée.

La modification du pH montre (figure 20) une légère amélioration de la séparation des deux pics.

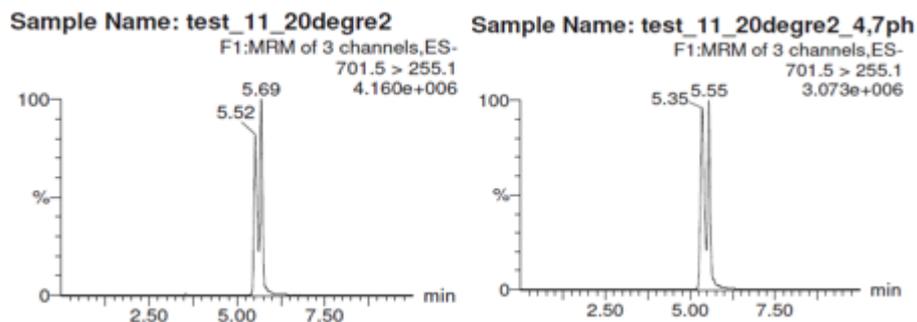


Figure 20: Chromatogramme selon le pH (3,7 à gauche et 4,7 à droite)

Débit de la phase mobile

L'augmentation du débit d'écoulement permet une meilleure résolution, cependant la modification de ce paramètre est contrainte par l'augmentation de la pression subie par la colonne. Nous avons donc testé les débits de 0,4 ; 0,45 et 0,5 mL/min en passant successivement le même échantillon à chaque débit. Une phase de stabilisation de la colonne a été effectuée entre chaque changement de débit (nous estimons que la colonne est stable lorsque le delta de pression de la colonne sur 2 minutes est < 20 PSI). Les essais de débits (figure 21) montrent que, du fait de la viscosité accrue des solvants à basse température (20 °C), notamment celle de l'isopropanol, nous ne pouvons pas appliquer un débit supérieur à 0,5 mL/min sans dépasser une pression qui serait délétère à long terme pour la colonne (>12000 PSI). Ainsi la meilleure séparation dans ces conditions est obtenue avec 0,5 mL/min.

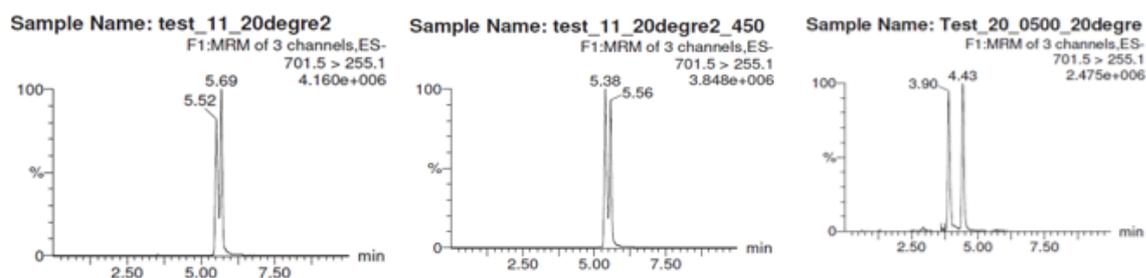


Figure 21:Chromatogramme selon le débit (de gauche à droite : 0,4 ; 0,45 et 0,5 mL/min)

Température de colonne

Plusieurs températures ont été testées durant ce développement : 60 °C, 50 °C, 40 °C, 30 °C, 25 °C et 20 °C. Nous avons passé successivement le même échantillon à chaque température de colonne sans autres modifications chromatographiques et en laissant une durée minimale de 10 minutes de stabilisation de la colonne pour chaque température. Les résultats (figures 22 et 23) montrent que plus nous chauffons la colonne plus les composés sont co-élus. La température qui nous semble idéale est 20 °C, car celle-ci améliore la séparation des deux pics. Le delta des temps de rétention entre le pic de PEth et les pics environnants passent

ainsi de 0,02 min à 0,17 min. Ce choix nous contraint cependant à un débit de 0,45 mL/min, car la pression dans la colonne atteint son seuil maximal. C'est pourquoi nous avons conclu qu'une température de 25 °C était un bon compromis entre la séparation des pics et l'obtention d'une hauteur de pic correcte.

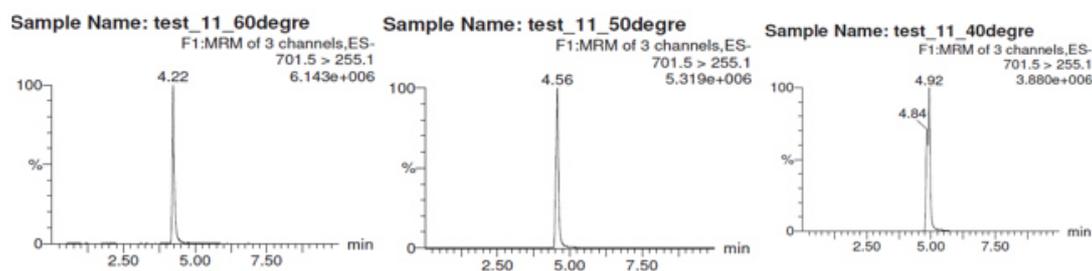


Figure 22 : Chromatogramme selon la température de colonne (de gauche à droite: 60, 50 et 40°C)

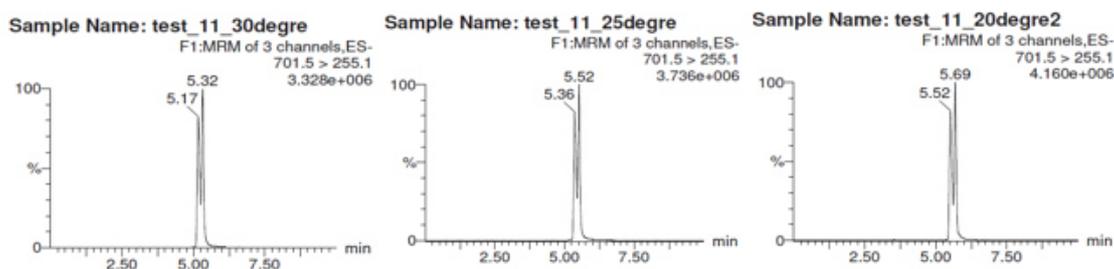


Figure 23: Chromatogramme selon la température de colonne (de gauche à droite: 30, 25 et 20°C)

Gradients de phases mobiles

Différents essais (plus de 20) de gradients ont été testés afin de déterminer les effets de la modification de plusieurs paramètres (durée de plateau, gradient de phases mobiles du plateau, pente, nettoyage de la colonne, durée de stabilisation de la colonne). La durée du plateau et le gradient de phases mobiles du plateau aboutissent à l'éluion des composés hydrophiles ainsi qu'à la concentration de notre composé dans la colonne. La pente permet d'optimiser la séparation de notre composé aux pics environnants. Le nettoyage de la colonne permet d'éviter la contamination interéchantillons. La stabilisation de la colonne permet une reproductibilité des résultats. La robustesse de cette méthode repose notamment sur le nettoyage et la stabilisation de la colonne entre chaque passage d'échantillon. Les différents gradients ont été passés successivement sur le même échantillon en ne modifiant qu'un paramètre entre chaque essai. L'augmentation de la différence de temps de rétention (TR) entre le pic de PEth et le pic parasite le plus proche indiquait une amélioration de la méthode. Ainsi, chaque paramètre a été testé afin d'obtenir le plus grand delta possible. Le tableau 8 regroupe les essais de gradients significatifs selon les paramètres suivants :

- La durée du plateau (tests 15 et 16)
- Le gradient de plateau (tests 13, 15, 11 et 12)
- La pente (tests 1 et 11)
- Le nettoyage de la colonne (tests 1 et 4)
- La stabilisation de la colonne (tests 1 et 11)

Tableau 8: Tableau regroupant les essais de gradients significatifs

1			4			11			12		
DUREE (MIN)	A2 (%)	B2 (%)	DUREE (MIN)	A2 (%)	B2 (%)	DUREE (MIN)	A2 (%)	B2 (%)	DUREE (MIN)	A2 (%)	B2 (%)
0	70	30	0	70	30	0	70	30	0	20	80
1	70	30	1	70	30	1	70	30	1	20	80
4.5	5	95	3.5	5	95	9	5	95	9	95	5
5	5	95	5	1	99	9.1	70	30	9.1	20	80
5.5	70	30	6	70	30	10	70	30	10	20	80
10	70	30	10	70	30						
TR : 3.31 ΔTR : 0.02			TR : 3.54 ΔTR : 0			TR : 5.36 ΔTR: 0.19			TR : 5.19 ΔTR: 0.20		
13			15			16			20		
DUREE (MIN)	A2 (%)	B2 (%)	DUREE (MIN)	A2 (%)	B2 (%)	DUREE (MIN)	A2 (%)	B2 (%)	DUREE (MIN)	A2 (%)	B2 (%)
0	90	10	0	70	30	0	90	10	0	100	0
2	90	10	2	70	30	3	90	10	3	100	0
5.5	5	95	5.5	5	95	8	5	95	8	5	95
6	90	10	6	70	30	8.1	90	10	8.1	100	0
10	90	10	10	70	30	10	90	10	10	100	0
TR: 4.35 ΔTR: 0.24			TR: 4.83 ΔTR: 0.18			TR: 6.69 ΔTR: 0.25			TR: 3.63 ΔTR: 0.38		

À la suite de ces modifications, le test 20 nous permet de parvenir à un delta de TR de 0,38 minute (figure 24).

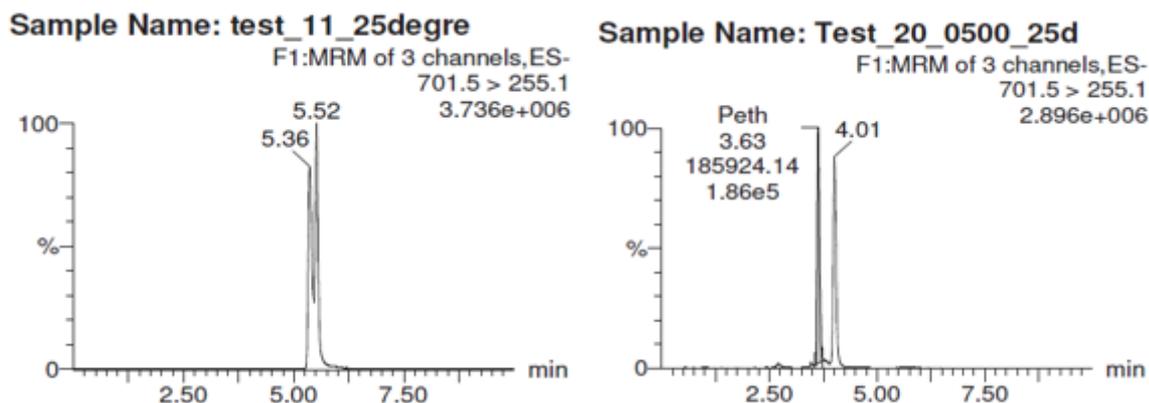


Figure 24: Comparaison des chromatogrammes d'un gradient moins efficace (test 11) et du plus efficace (test 20)

1.3.2. Méthode de séparation chromatographique actuelle

Le développement d'une nouvelle méthode de dosage incluant deux nouveaux biomarqueurs, le PEth 16:0/20:4 et l'EtG sanguin s'est révélé être un challenge. En effet, la multiplication des analytes sur un run chromatographique nécessite de trouver un compromis dans tous les paramètres de séparation chromatographique afin d'obtenir une résolution ainsi qu'une spécificité optimale pour chacun de ces analytes. La relative similarité de la nature physico-chimique du PEth 16:0/20:4 par rapport au PEth 16:0/18:1 a permis une phase de développement chromatographique assez rapide. En revanche, l'EtG, de par une caractéristique physico-chimique éloignée de celle des PEths (notamment sa polarité), a

nécessité une longue phase de développement et des compromis. Parmi les modifications instaurées au cours de ce développement, la colonne a été remplacée par une Kinetex® 2.6 µm C18 100 Å, LC column 150 x 2,1 mm (Phenomenex, Le Pecq, France). Cette modification a permis d'améliorer la séparation des analytes. Cette amélioration s'accompagne d'une augmentation de la pression inhérente à l'augmentation de la taille de la colonne. L'utilisation de l'isopropanol à 25 °C et 0,5 mL/min n'était ainsi plus viable pour disposer d'une méthode robuste. Ainsi, le méthanol, dont la viscosité à 25 °C est moindre, à remplacer l'isopropanol comme phase mobile B. Par conséquent, le gradient à lui aussi dû être modifié. Les résultats de cette seconde phase de développement chromatographique ont permis d'aboutir à la méthode actuellement utilisée en routine et dont le résumé est décrit dans le tableau 9.

Tableau 9: Résumé des paramètres chromatographique de la nouvelle méthode

Gradient		
Durée (MIN)	A (%)	B (%)
0	100	0
1	90	10
4	25	75
8,5	5	95
9	5	95
9,5	0	100
13	0	100
13,1	100	0
14	100	0
Phase mobile A	30 % Acétate d'ammonium 10mM 70 % Acétonitrile 0,05 % Acide formique	
Phase mobile B	100 % Méthanol	
Colonne	Kinetex® 2.6 µm C18 100 Å, LC column 150 x 2.1 mm	
Volume d'injection	10 µL	
Température de colonne	25 °C	
Température autosampler	10 °C	
Durée du run	14 min	
Débit	0,5 mL/min	
Etalons internes	PEth-D5 (16:0/18:1), EtG-D5	

1.3.3. Détection par spectrométrie de masse

Infusion du PEth

Afin d'optimiser la détection du PEth, nous avons optimisé les paramètres de la source (ESI) et du spectromètre de masse. Nous avons tout d'abord cherché quelle tension de cône permet une ionisation maximale (AUC maximale), puis quelle énergie de collision (fragmentation par collision d'un atome neutre (Argon)) permet d'obtenir la plus grande quantité de chaque ion fils (AUC maximale). D'autres paramètres ont été optimisés (voltage du capillaire, température de la source, température de désolvatation, flux de gaz...). Les résultats sont rapportés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Résumé des paramètres ESI et SM optimaux, * : ions quantifieurs

Analytes	TR (min)	Transitions (m/z)	E. collision (eV)	Voltage cône (V)	Voltage capillaire (kV)	Température source °C	Température désolvatation °C	Flux gaz L/h	
PEth 16:0/18:1	4,68	701.7	281.2*	38	45	3,5	320	650	1000
			255.2	32					
PEth-D5 16:0/18:1	4,68	706.7	281.2*	38					
			255.1	32					
PEth 16:0/20:4	4,08	723.6	303.2*	27					
			255.1	32					
EtG	0.59	221.2	75.1*	15	30	3,5	320	650	1000
			85	17					
EtG-D5	0.59	226.2	75.1*	15					
			85	17					

1.3.4. Essai de vérification de stabilité

Stabilité des phases mobiles

En routine, la consommation rapide des phases mobiles permet leur rotation toutes les 2 semaines, ainsi leur stabilité sur cette courte période n'est pas étudiée.

Stabilité des solutions mères méthanoliques

Les solutions mères méthanoliques de PEth et PEth-D5 sont données par le fabricant comme stables durant 2 ans à – 20 °C. Cependant en pratique, l'ampoule est cassée, diluée au dixième (dans du méthanol) et transvasée dans un autre contenant hermétique. Du fait de la variabilité des utilisations de cette solution (temps de sortie du congélateur, temps d'ouverture du bouchon...), une concentration par évaporation du méthanol n'est pas exclue. La solution sera donc remplacée au minimum tous les ans.

Stabilité post-extraction

La stabilité des extraits (dans les vials d'extraction) a été testée pendant 24 heures à 10 °C. Pour cela, 23 échantillons sont analysés le jour de la réception, puis laissés 24 heures dans l'enceinte thermorégulée à 10 °C du spectromètre de masse avant d'être analysés une seconde fois. Après extraction du DBS par une solution méthanolique, aucune différence significative n'a été détectée pour 100 % des 23 échantillons (CV<15 %). Ainsi, les extraits méthanoliques sont considérés comme stable 24 heures dans l'enceinte thermostatée à 10 °C.

1.3.5. Validation

Procédure de validation

La validation d'une méthode analytique selon la norme NF EN ISO 15 189 nécessite l'évaluation de nombreux paramètres (Tableau 11). Pour valider et accréditer auprès du Comité Français d'Accréditation (CoFrAc) en porté B notre méthode analytique, nous avons suivi les documents d'aide à la validation fournis par cet organisme : le « guide technique d'accréditation de validation (portée B) des méthodes en biologie médicale » (79) et le « guide technique d'accréditation: contrôle de qualité en biologie médicale » (80).

Tableau 11: Résumé des paramètres de validation

PARAMETRES A VERIFIER ET/OU A CONNAITRE	Bibliographie	Vérification sur site Portée de type A	Validation Portée de type B
<i>Spécificité analytique</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<i>Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>
<i>Justesse (approche de la)</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui, dès que possible</i>	<i>Oui</i>
<i>Intervalle de mesure (Limite de quantification et limites de linéarité)</i>	<i>Oui</i>	<i>A vérifier si nécessaire</i>	<i>Oui</i>
<i>Incertitudes/facteurs de variabilité et évaluation</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>
<i>Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui, pour les paramètres sensibles</i>	<i>Oui</i>
<i>Stabilité réactifs (après ouverture, embarqués)</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<i>Robustesse</i>	<i>Non</i>	<i>Non</i>	<i>si besoin</i>
<i>Interférences (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments)</i>	<i>Oui</i>	<i>à vérifier si nécessaire</i>	<i>Oui</i>
<i>Intervalle de référence « ex- valeurs normales »</i>	<i>Oui</i>	<i>à vérifier dès que possible, si justifié</i>	<i>Oui à établir</i>
<i>Comparaison avec une méthode de référence</i>	<i>Oui (si existe)</i>	<i>Non</i>	<i>Oui (si possible)</i>
<i>Comparaison avec méthode déjà utilisée au LBM ou autre méthode du LBM (appareil en miroir, EBMD)</i>	<i>Oui (si existe)</i>	<i>Oui (si possible)</i>	<i>Oui</i>
<i>Analyse des discordances</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>

Résultats

Les données de validation de méthode effectuée selon la norme ISO 15189 et accréditée CoFrac en portée B sont résumées dans le tableau 12.

Tableau 12: Résumé des résultats de validation de méthode

	PEth 16:0/18:1	PEth 16:0/20:4	EtG
Gamme de calibration	2 - 1000 µg/L	2 - 500 µg/L	2 - 500 µg/L
CV	R ² ≥ 0.99	R ² ≥ 0.99	R ² ≥ 0.99
LIDD	2 µg/L	2 µg/L	2 µg/L
LIDQ	2 µg/L	2 µg/L	2 µg/L
Justesse (6 fois chaque CQ)			
4 µg/L	-1%	4%	-1%
125 µg/L	1%	-2%	3%
250 µg/L	5%	3%	-9%
Répétabilité (6 fois chaque CQ)			
4 µg/L	4%	6%	10%
125 µg/L	3%	4%	4%
250 µg/L	2%	6%	6%
40 µg/L*	1%	na	na
300 µg/L*	6%	na	na
Fidélité intermédiaire (6 fois chaque CQ)			
4 µg/L	9%	7%	12%
125 µg/L	11%	6%	9%
250 µg/L	8%	12%	10%
40 µg/L*	10%	na	na
300 µg/L*	6%	na	na
Exactitude (CQE Equalis) (n=9)	moyenne = 5 % ; mediane = 7 % ; étendue = - 10 à 16 %		
LHDQ	1000 µg/L	500 µg/L	500 µg/L
	< 1%	< 1%	< 1%
Contamination	Les résultats inférieurs à 5 µg/L sont rendu comme < 5µg/L pour des raisons d'interprétation. Ainsi, les résultats supérieurs à 500 µg/L, pouvant entrainer un « faux positif » sur l'échantillon suivant, doivent être vérifiés		
Effet de Matrice (ME)	Les tests de ME montrent un effet de suppression des ions inférieur à 15% pour les 3 analytes		
Extraction	Le rendement maximum d'extraction a été atteint après : <ul style="list-style-type: none"> • 30 min d'incubation à température ambiante sans agitation ni centrifugation • Ou 2 min d'ultrasons à température ambiante sans agitation ni centrifugation 		
Influence de l'anticoagulant : échantillons prélevés sur tubes citratés, héparinés, fluorés et EDTA (n=4 x 12 patients)	Pas d'influence significative (CV maximum observé : 12.5%)	Pas d'influence significative (CV maximum observé : 10%)	Pas d'influence significative (CV maximum observé : 13%)

1.3.6. Étude de stabilité et néoformation

Les études de stabilité et de néoformation du PEth 16:0/18:1, du PEth 16:0/20:4 et de l'EtG sanguin ont fait l'objet d'une publication (Article 2).

Article 2:

Analytical method dedicated to routine phosphatidylethanol 16:0/18:1, 16:0/20:4 and ethylglucuronide simultaneous determination in dried blood spots: additional data related to stability and real case illustrations.

Hakim F, Wiart JF, Richeval C, Gicquel T, Sciffet D, Cottencin O, Allorge D, Gaulier JM.

Submitted to Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) on 15-06-2022

Analytical method dedicated to routine phosphatidylethanol 16:0/18:1, 16:0/20:4 and ethylglucuronide simultaneous determination using dried blood spots: additional data related to *in vitro* stability

Florian Hakim^{1,2}, PharmD, Jean-François Wiart¹, Engineer, Camille Richeval^{1,2}, PhD, Thomas Gicquel³, PharmD, PhD, Damien Sciffet⁴, MD, Olivier Cottencin⁴, MD, PhD, Delphine Allorge^{1,2}, PharmD, PhD, Jean-Michel Gaulier^{1,2*}, PharmD, PhD

¹CHU Lille, Laboratory of Toxicology, F-59037 Lille, France

²Univ. Lille, URL 4483 – IMPECS – IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine, F-59000 Lille, France

³CHU Rennes, Laboratory of Toxicology and Forensic, F-Rennes 35033, France

⁴CHU Lille, Addictology Unit, F-59037 Lille, France

*Correspondence to Jean-Michel Gaulier

Laboratory of Toxicology – CHU

Bd du Professeur Jules Leclercq

CS 70 001

59037 LILLE Cedex, France

Email: jean-michel.gaulier@chru-lille.fr

Fax : +33 320444960

Abstract

Alcohol use disorders are associated with many negative health and societal issues. Routinely used tools for ethanol abuse detection allow either a maximum detection window of up to 3 days (direct biomarkers), or do not allow a quantitative estimation of alcohol consumption and has a significant latency in its variations (indirect biomarkers). In this context, we propose a simultaneous blood detection method of two phosphatidylethanol (PEth) isoforms (16:0/18:1 and 16:0/20:4) and ethylglucuronide (EtG) in dried blood spots (DBS) that allows a drinking consumption estimation with a wide range of detection windows and a very low latency. This validated method exhibits a lower limit of quantification of 2 µg/L for the 3 analytes and upper limits of quantification of 500 µg/L (for PEth16:0/20:4 and EtG) and 1000 µg/L (for PEth16:0/18:1) with interday coefficients of variations (CVs) and bias of less than 15 %. This study also reports additional data related to *in vitro* stability and neoformation in the presence of ethanol for those 3 analytes in blood (citrate and sodium fluoride tubes) and DBS. PEth neoformation in blood in the presence of ethanol occurs as soon as 4 hours post-sampling at room temperature. Therefore, we recommend (i) blood sampling tube storage at 4°C for a maximum of 4 days before transfer on DBS, or (ii) immediate transfer on DBS after blood sampling guaranteeing PEth and/or EtG stability (6 months at room temperature). This method is illustrated by cases from a clinical study in a population of patients hospitalized for ethanol withdrawal.

Keywords: Ethanol, phosphatidylethanol, ethylglucuronide, blood, dried blood spot, stability

Introduction

Alcohol Use Disorders (AUD), which are part of psychiatric illnesses and are defined as an alcohol use that causes impairment or clinically significant distress, are associated with many negative health and societal (e.g., driving impairment, violence, crimes, ...) issues. To grasp this global problem in practice, currently used analytical tools for acute ethanol abuse detection are (i) blood, breath, urine, or vitreous humor (in *post-mortem* situations) ethanol assays and (ii) blood or urine ethylglucuronide (EtG) assays, allowing a maximum detection window (for EtG in urine) of around 3 days^[1]. To detect chronic ethanol abuse, currently used analytical tools are (with the exception of EtG determination in hair) mainly indirect ethanol biomarkers: transaminase activity, mean corpuscular volume, gamma glutamyl transferase activity, carbohydrate deficient transferrin in serum. These indirect biomarkers do not allow a quantitative estimation of alcohol consumption (dose and frequency) and their specificity and sensitivity can be challenged^[2]. Hair EtG is sensitive, specific and allows an average ethanol consumption estimation over 2 to 6 months depending on hair lengths^[3]. This biomarker can be used to assess moderate and heavy drinking (at the cut-off concentration of 5 and 30 pg/mg respectively^[4]). However, hair analysis remains time-consuming, expensive and subject to poor reliability if hair is treated.

In this situation, blood phosphatidylethanol (PEth) 16:0/18:1 assay takes place between urine EtG and hair EtG assays due to its detection window of, approximatively, 28 days^[5]. PEth also allows quantitative estimations of drinking levels over several weeks with a very low latency: peak blood concentrations are reached within 1 to 3 hours after alcohol consumption^[6], followed by an immediate decrease in blood concentrations. This biomarker thereby answers the request of many clinicians in various clinical situations (e.g., liver transplants, addictology, obstetrics, forensic medicine, public health...) requiring alcohol withdrawal monitoring and abstinence screening. Nevertheless, the implementation of a routine PEth assay presents several practical difficulties, including problems related to *in vitro* stability of PEth 16:0/18:1.

Indeed, stability of PEth 16:0/18:1 in blood at room temperature is described as less than 2 days^[7]. At 4 °C, PEth 16:0/18:1 stability in blood varies from less than 2 days to 71 days^[7-10]. At -20 °C, PEth 16:0/18:1 stability in blood varies from less than 8 days to 4 weeks^[8,11]. At -80 °C and on dried blood spots (DBS), data converge homogeneously towards a stability of several months^[12-14]. The type of anticoagulant in the blood tube also appears to impact PEth stability^[7,10]. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and heparin sodium blood tubes are the most used anticoagulants for blood PEth assays, but no stability study has been conducted in citrated or fluorinated blood samples. Other studies also suggest that authentic blood samples containing PEth seem to be more stable than spiked samples (in EDTA blood samples)^[7]. PEth neoformation within blood sample tubes containing ethanol is described in literature when stored at room temperature or -20 °C^[14-17]. The addition of phospholipase D (PLD) inhibitors in blood tubes is possible^[18] but hardly suitable routinely in a clinical unit. To overcome these stability-related pitfalls, DBS analysis is reported in literature. Nevertheless, PEth 16:0/18:1 stability on DBS also remains unclear as it is reported to range between 60 days and 13 months at room temperature^[13,19-20]. According to literature data, PEth neoformation in presence of ethanol does not occur within Whatman 903™ DBS cards.

However, this neoformation is reported in volumetric absorptive microsampling devices (VAMS) except for Capitainer®B Vanadate using a PLD inhibitor (sodium metavanadate, NaVO_3) [19,21].

In this complex situation, this manuscript aims to report the validation and routine implementation of a liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection (LC-MS/MS) method combining the determination of two PEth isoforms (16:0/18:1 and 16:0/20:4) and EtG in DBS, together with additional data about PEths (and EtG) stability (including neoformation in the presence of ethanol) in whole blood and DBS. PEth 16:0/20:4 was chosen over other PEth isoforms for his reported lower half-life [22] of about 2 days hence allowing a detection window located between PEth 16:0/18:1 and EtG.

Materials and methods

Chemicals and reagents

Ammonium Acetate was purchased from Sigma-Aldrich (A7330-500G Millipore Corporation, St. Louis, Missouri), formic acid was purchased from Honeywell (Charlotte, North Carolina, United States) and acetonitrile, methanol and 2-propanol were purchased from Biosolve (ULC/MS grade, Dieuze, France). Purified water was produced by a Millipore Milli-Q purification machine (Burlington, Massachusetts, United States).

PEth 16:0/18:1, PEth 16:0/20:4, Ethylglucuronide, PEth 16:0/18:1-D5 and Ethylglucuronide-D5, as internal standard, were obtained from Sigma-Aldrich (Millipore Corporation, St. Louis, Missouri). Two external quality control samples, named PEth S 40 $\mu\text{g/L}$ WH (whole blood/spiked with PEth 16:0/18:1) and PEth S 300 $\mu\text{g/L}$ WH (whole blood/spiked with PEth 16:0/18:1), were obtained from AcqScience (Rottenburg-Hailfingen, Germany).

Authentic whole Blood samples and QC samples

Human whole blood samples were obtained in a clinical trial protocol (PETHOXICO, Trial registration: ClinicalTrials.gov NCT04557631). In this protocol, blood was sampled in sodium citrated tubes (10% v/v) (BD Vacutainer REF 363048, Becton, Dickinson, Grenoble, France). For stability purposes (see underneath), additional blood sampling was performed using sodium citrated, EDTA, sodium heparin and sodium fluoride tubes. In addition, using sodium citrate blank whole blood, calibrator samples were obtained by spiking with a methanolic solution of PEth 16:0/18:1, PEth 16:0/20:4 and EtG and equilibrated for 1 hour at 4 °C before applying to DBS cards, to build a 10-point calibration curve ranging from 2 to 1000 $\mu\text{g/L}$ for PEth 16:0/18:1 and from 2 to 500 $\mu\text{g/L}$ for PEth 16:0/20:4 and EtG. Since no external QC are available for PEth 16:0/20:4, in addition to external QC samples (provided by ACQ Science, see above), 3 internal QC samples (low : 4 $\mu\text{g/L}$, medium : 125 $\mu\text{g/L}$ and high : 250 $\mu\text{g/L}$ levels) were constituted using sodium citrate blank whole blood spiked with methanolic solutions of PEth 16:0/18:1, PEth 16:0/20:4 and EtG and equilibrated for 1 hour at 4 °C before 10 μL spotting on DBS cards.

Pre-analytical

Ten μL of blood was transferred on DBS cards (903™ five spot blood card by Eastern Business Forms, Inc, Mauldin, South Carolina, United States) at lab reception and dried at room temperature for at least 30 minutes.

For analysis, one DBS (the whole 10 µL spot) was punched in a test tube by a 10 mm diameter puncher. All samples were then extracted by adding 100 µL of internal standard solution to the test tubes. Internal standard solution was prepared in a methanolic solution of deuterated PEth 16:0/18:1 and EtG at a 50 µg/L concentration. After a 60 min incubation, the supernatant was transferred to autosampler vials before being analyzed.

LC-MS/MS

PEths and EtG was quantified using a LC-MS/MS device (WATERS XEVO TQ-S, Waters, Guyancourt, France). Injection volume was 10 µL with the autosampler maintained at 10°C and column at 25°C. Separation was performed using a Kinetex® 2.6 µm C18 100 Å, LC column 150 x 2.1 mm (Phenomenex, Le Pecq, France) and elution gradient consisting of ammonium acetate 10 mM, acetonitrile, formic acid (30/70/0.05) (A) and Methanol (B) as follows: 0-1 min, 0-10% B; 1-4 min, 10-75 % B; 4-8.5 min, 75-95 %; 8.5-9 min, 95 % B; 9-9.5 min, 95-100 % B; 9.5-13 min, 100 % B; at 13.1 min, flow returns to initial conditions (0 % B) until 14 min. The flow rate was 0.5 mL/min, and the total run time was 14 min.

Mass spectrometry detection was performed in negative electrospray ionization mode (ESI-) using multiple reaction monitoring mode. Capillary voltage used was 3.5 kV, ion source temperature and desolvation temperature were 320 °C and 650 °C respectively, gas flow was 1000 L/h and detection parameters used are summarized in **Table 1**. Calibration curves were built using a 1/x weighted least squares linear regression and it is of note that a correction factor was applied to concentration results to consider the 10% dilution generated by sodium citrate tubes.

Validation procedure

Validation step was based on EN ISO 15189 standard criteria, followed CoFrAc (French Accreditation Committee) guidelines, and complied with both the French Society of Analytical Toxicology (SFTA) and the international recommendations for the validation of new analytical methods [23-25]. This validation included usual parameter determinations/check: linearity, limit of detection (LOD), lower and upper limits of quantification (LLOQ and ULOQ), accuracy, carry-over, precision, and matrix effects including anticoagulant influence. Six different calibration curves (10 points each), estimated using 1/x weighted linear regression, were considered acceptable if the coefficient of determination (r^2) was at least 0.99. The LOD was defined as the lowest concentration with two transitions presence and a signal-to-noise ratio of at least 3. The LLOQ was the lowest concentration with two transitions presence together with a within-assay precision and a relative bias lower than 15%. Recovery was assessed by modifying various parameters (time, agitation, ultrasonication, centrifugation). Those parameters were modified one by one until maximum yield was achieved. Inter-day assays coefficient of variation (CV) and bias were assessed using six replicates of external quality control samples at 2 concentration levels and 3 internal quality control samples (as no PEth 16:0/20:4 external QC exists) at low (4 µg/L), medium (125 µg/L) and high levels (250 µg/L). Matrix effect (ME) was assessed by comparing peak area of fortified blood after extraction and peak area of fortified water of the same amount after extraction. External quality assessment (EQA) (only PEth 16:0/18:1) in blood was achieved by participation in nine rounds (02/2020 to 02/2022) of a proficiency test offered by Equalis (Uppsala, Sweden).

It is of note that variation in hematocrit could impact results when using DBS. Several studies^[26-27] reported no significant influence of hematocrit (HCT, varying from 0.2 to 0.6) for volumetric sampling (with the hole spot punched) on precision, level of extraction efficiency or matrix effect. However Luginbühl et al.^[28] pointed to the fact that those previous studies were performed using spiked samples which would only determine the HCT-dependent extraction efficiency. Therefore, in our method, the whole 10µL DBS is punched to prevent any influence of the spot homogeneity and blood viscosity. Furthermore, additional studies regarding HCT influence on PEth results are needed, particularly in volumetric DBS methods and with authentic samples.

Stability issue

Detailed materials and methods for the stability issue study are provided as **supplementary data**. In short, in a preliminary step, extract stability in the autosampler was tested. *In vitro* stability and neoformation (in presence of ethanol) was assessed for PEth 16:0/18:1, PEth 16:0/20:4 and EtG in both citrated blood and DBS at various temperatures (room temperature, 4°C and -20°C). Neoformation was also assessed for the 3 analytes in both sodium fluoride blood tubes and DBS at room temperature and 4°C. In these experiments, stability was considered when the measured concentrations of at least 85% of samples were in the range of +/- 15% from the initial concentration (at day 0). It is of note that for each experiment, all samples were analyzed in the same batch.

Results and discussion

Method validation results are summarized in **Table 2** and **Figure 1**. Two published methods combining, within the same run, PEth(s) with EtG were found in the literature: Wang *et al.*^[19] published in 2019 a method combining blood PEths (16:0/18:1 and 18:1/18:1 isoforms) and EtG in DBS and Hofmann *et al.*^[29] recently published a method combining PEth 16:0/18:1 and EtG in whole blood (without use of DBS). Within the four recently published (2019-2021) PEth(s) validation methods using DBS (and the above-mentioned one published by Hofmann *et al.*), LLOQ ranged from 8.6 to 20 µg/L for PEth 16:0/18:1 and from 7.7 to 100 µg/L for EtG (intra- and interday precision ranged from 10.7 % to 19 % maximum). Hence, the presented method exhibits performances at least within current literature standards.

Detailed results of *in vitro* stability experiments are provided as **supplementary data** and summarized in **Table 3 and 4**. In short, extract stability was checked (n=23) for 24h in the autosampler at a regulated temperature of 10 °C.

For PEth 16:0/18:1, stability results were consistent with literature data. In citrated blood, PEth 16:0/18:1 stability was 24 hours at room temperature, 4 days at 4 °C and 14 days at -20 °C. In DBS PEth 16:0/18:1 stability was 6 months at room temperature. In sodium fluoride blood tubes, neoformation of PEth 16:0/18:1 begins as soon as 4 hours post-sampling at room temperature due to ethanol presence hence possibly impacting PEth results even in a clinical-to-laboratory transport within the same hospital. This neoformation does not take place when blood samples are either stored at 4 °C or transferred on DBS. These results illustrate the issue, at room temperature, of PEth 16:0/18:1 stability and neoformation (in presence of ethanol). For PEth 16:0/20:4, these results are the first data regarding its stability in DBS as well as in whole blood. Results are similar to those obtained for PEth 16:0/18:1 with a stability

of at least 4 days in citrated blood at 4 °C, an early neoformation of PEth 16:0/20:4 in sodium fluoride blood tubes in presence of ethanol at ambient temperature and no neoformation at 4 °C or in DBS.

For EtG, *in vitro* stability is at least 4 days in blood at 4 °C, and no neoformation in presence of ethanol at 4°C, nor in DBS, was observed. These results are coherent with the very sparse previously reported data concerning EtG stability in blood, *i.e.*, 7 days stability in blood at 4 °C [30], no neoformation in presence of ethanol even at room temperature [33-34] and reported stability of 2 weeks to 3 months in DBS [19,33-34]. Consequently, in the situation where samples are provided by clinical units, we recommended (i) blood sampling tube storage at 4 °C for a maximum of 4 days before shipment to the laboratory and analysis, or (ii) immediate shipment (under 4 hours) at room temperature to the laboratory for the transfer on DBS cards and storage before analysis. In addition, these results add new data observed in the most used sampling tubes for blood alcohol concentration (BAC) monitoring (sodium fluoride tubes).

Application to real cases

PETHOXICO is a monocentric non-interventional non-randomized cross-sectional clinical study (ClinicalTrials.gov NCT04557631) in a population of patients hospitalized for withdrawal. The main objective of PETHOXICO is to compare PEth results in these chronic and excessive ethanol consumers to the cut-offs proposed in the literature. **Table 5** summarized analytical results (obtained on admission and after 7 days hospitalization) of 4 patients from this study obtained with the present analytical method, together with BAC and urinary EtG measurements by an immunoassay method (DRI test, 10011723, Thermo Fisher, France) on admission.

Even if there is no official consensus on PEth cut-offs, several studies agree on a PEth 16:0/18:1 blood concentration of (1) 200 µg/L beyond which "excessive consumers" are located (corresponding to consumption of over 420g of ethanol per week) [26,35-37], and (2) 20 µg/L beyond which moderate consumers are located (corresponding to consumption of around 140g of ethanol per week) [35]. These patients reported ethanol per week consumption ranging from 560 to 1750g. They all provided a PEth 16:0/18:1 blood concentration above the cut-off for "excessive consumers" (200 µg/L) on admission. For the 4 patients, PEth 16:0/20:4, EtG in blood (EtGB), urinary EtG (EtGU) and BAC results also concurred on a chronic abuse of ethanol with last consumption less than 48 hours old and probably less than a few hours for patients #1, 3 and 4 owing to BAC results. After 7 days of abstinence, a decrease in PEth 16:0/18:1 and PEth 16:0/20:4 blood concentrations were observed (with a PEth 16:0/18:1 concentration still above the 210 µg/L cut-off for patient#1) with a greater decrease (and even more a non-detection as observed for patient#1) of PEth 16:0/20:4 as expected due to its reported shorter half-life and blood EtG results became undetected (as expected). Based on these preliminary results, the concept of adding PEth 16:0/20:4 to the presented analytical method appears to be attractive, but additional data are needed to establish the practical value of this shorter half-life homologue compared to PEth 16:0/18:1.

Conclusion

In conclusion, this work presents a NF EN ISO 15189-accredited (scope n° 8-3030 available on the website www.cofrac.fr) LC-MS/MS method for PEth 16:0/18:1, PEth 16:0/20:4 and

EtG simultaneous determination in blood using DBS. Stability study results of PEth 16:0/18:1 concurred with literature data: stability of 1 day at room temperature, 4 days at 4 °C and 6 months in DBS at room temperature. PEth 16:0/20:4 and EtG are stable for 4 days at 4 °C. Neof ormation study also confirms PEth 16:0/18:1 and PEth 16:0/20:4 neof ormation in blood samples in presence of ethanol as soon as 4 hours at room temperature. However, keeping blood samples at 4 °C or transferring blood on Whatman 903™ DBS cards prevent neof ormation. The application of this analytical method to patients proved the usefulness of a combined biomarkers method to better inform on alcohol consumption habits and withdrawal monitoring owing to a wider set of detection windows (< 48h for EtG, 1 to 2 weeks for PEth 16:0/20:4 to about one month for PEth 16:0/18:1).

Acknowledgements

We want to thank Dr Marc Augsburger and Dr Julien Déglon (University Center of Legal Medicine, Lausanne-Geneva, Switzerland) for the initiate support of this method development.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflict of interest concerning this article.

References

1. Helander A, Böttcher M, Fehr C, Dahmen N, Beck O. Detection times for urinary ethyl glucuronide and ethyl sulfate in heavy drinkers during alcohol detoxification. *Alcohol Alcohol* 2009;44(1):55–61. <http://dx.doi.org/10.1093/alcalc/agn084>
2. Niemelä O. Biomarker-based approaches for assessing alcohol use disorders. *Int J Environ Res Public Health* 2016;13(2):166. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph13020166>
3. Boscolo-Berto R, Favretto D, Cecchetto G, Vincenti M, Kronstrand R, Ferrara SD, et al. Sensitivity and specificity of EtG in hair as a marker of chronic excessive drinking: Pooled analysis of raw data and meta-analysis of diagnostic accuracy studies. *Ther Drug Monit* 2014;36(5):560–75. <http://dx.doi.org/10.1097/ftd.0000000000000063>
4. Society Of Hair Testing. 2019 Consensus for the use of alcohol markers in hair for supporting the assessment of abstinence and chronic alcohol consumption. Available from: https://www.soht.org/images/pdf/Revision_2019_Alcoholmarkers.pdf. (Accessed on January 22, 2022).
5. Fleming MF, Smith MJ, Oslakovic E, Lucey MR, Vue JX, Al-Saden P, et al. Phosphatidylethanol detects moderate-to-heavy alcohol use in liver transplant recipients. *Alcohol Clin Exp Res* 2017;41(4):857–62. <http://dx.doi.org/10.1111/acer.13353>
6. Gnann H, Weinmann W, Thierauf A. Formation of phosphatidylethanol and its subsequent elimination during an extensive drinking experiment over 5 days. *Alcohol Clin Exp Res* 2012;36(9):1507–11. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1530-0277.2012.01768.x>
7. Faller A, Richter B, Kluge M, Koenig P, Seitz HK, Skopp G. Stability of phosphatidylethanol species in spiked and authentic whole blood and matching dried blood spots. *Int J Legal Med* 2013;127(3):603–10. <http://dx.doi.org/10.1007/s00414-012-0799-y>
8. Casati S, Ravelli A, Angeli I, Durello R, Minoli M, Orioli M. An automated sample preparation approach for routine liquid chromatography tandem-mass spectrometry measurement of the alcohol biomarkers phosphatidylethanol 16:0/18:1, 16:0/16:0 and 18:1/18:1. *J Chromatogr A* 2019;1589:1–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2018.12.048>
9. Berg T, Eliassen E, Jørgenrud B, Kabashi S, Petukhov A, Bogstrand ST. Determination of phosphatidylethanol 16:0/18:1 in whole blood by 96-well supported liquid extraction

- and UHPLC-MS/MS. *J Clin Lab Anal* 2019;33(1):e22631. <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.22631>
10. Dumitrascu C, van de Lavoie MCA, Neels H, Covaci A, Jacobs W, D'Hondt D, et al. Stability of phosphatidylethanol 16:0/18:1 in authentic and spiked whole blood. *Drug Test Anal* 2021;13(6):1219–22. <http://dx.doi.org/10.1002/dta.2995>
 11. Nguyen VL, Paull P, Haber PS, Chitty K, Seth D. Evaluation of a novel method for the analysis of alcohol biomarkers: Ethyl glucuronide, ethyl sulfate and phosphatidylethanol. *Alcohol* 2018;67:7–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.alcohol.2017.08.009>
 12. Van der Nagel BCH, Wassenaar S, Bahmany S, Koch BCP. Quantification of phosphatidylethanol in whole blood as a proxy for chronic alcohol consumption, using ultra performance convergence chromatography tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 2018;40(2):268–75. <http://dx.doi.org/10.1097/FTD.0000000000000492>
 13. Bakhireva LN, Shrestha S, Gutierrez HL, Berry M, Schmitt C, Sarangarm D. Stability of phosphatidylethanol in dry blood spot cards. *Alcohol* 2016;51(3):275–80. <http://dx.doi.org/10.1093/alcalc/agh120>
 14. Helander A, Zheng Y. Molecular species of the alcohol biomarker phosphatidylethanol in human blood measured by LC-MS. *Clin Chem* 2009;55(7):1395–405. <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.120923>
 15. Varga A, Alling C. Formation of phosphatidylethanol in vitro in red blood cells from healthy volunteers and chronic alcoholics. *J Lab Clin Med* 2002;140(2):79–83. <http://dx.doi.org/10.1067/mlc.2002.125292>
 16. Aradóttir S, Moller K, Alling C. Phosphatidylethanol formation and degradation in human and rat blood. *Alcohol* 2004;39(1):8–13. <http://dx.doi.org/10.1093/alcalc/agh003>
 17. Aradóttir S, Seidl S, Wurst FM, Jönsson BAG, Alling C. Phosphatidylethanol in human organs and blood: a study on autopsy material and influences by storage conditions. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28(11):1718–23. <http://dx.doi.org/10.1097/01.alc.0000145687.41646.e5>
 18. Su W, Chen Q, Frohman MA. Targeting phospholipase D with small-molecule inhibitors as a potential therapeutic approach for cancer metastasis. *Future Oncol* 2009;5(9):1477–86. <http://dx.doi.org/10.2217/fon.09.110>
 19. Wang H, Zhang Y, Zhang X, Li J, Lin Z, Huang Z, et al. An LC-MS/MS method for comparing the stability of ethanol's non-oxidative metabolites in dried blood spots during 90 days. *Alcohol* 2020;83:29–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.alcohol.2019.05.007>
 20. Van Uytendange K, Ramirez Fernandez MDM, De Vos A, Wille SM, Stove CP. Quantitation of phosphatidylethanol in dried blood after volumetric absorptive microsampling. *Talanta* 2021;223(Pt 1):121694. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121694>
 21. Beck O, Mellring M, Löwbeer C, Seferaj S, Helander A. Measurement of the alcohol biomarker phosphatidylethanol (PEth) in dried blood spots and venous blood-importance of inhibition of post-sampling formation from ethanol. *Anal Bioanal Chem* 2021;413(22):5601–6. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-021-03211-z>
 22. Lopez-Cruzan M, Roache JD, Hill-Kapturczak N, Karns-Wright TE, Dougherty DM, Sanchez JJ, et al. Pharmacokinetics of phosphatidylethanol 16:0/20:4 in human blood after alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 2018;42(11):2094–9. <http://dx.doi.org/10.1111/acer.13865>
 23. Musshoff F, Madea B. New trends in hair analysis and scientific demands on validation and technical notes. *Forensic Sci Int* 2007;165(2–3):204–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.024>
 24. Wille SMR, Peters FT, Di Fazio V, Samyn N. Practical aspects concerning validation and quality control for forensic and clinical bioanalytical quantitative methods. *Accreditation Qual Assur* 2011;16(6):279–92. <http://dx.doi.org/10.1007/s00769-011-0775-0>
 25. Wille SMR, Coucke W, De Baere T, Peters FT. Update of standard practices for new method validation in Forensic Toxicology. *Curr Pharm Des* 2017;23(36):5442–54. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612823666170714154444>
 26. Kummer N, Ingels A-S, Wille SMR, Hanak C, Verbanck P, Lambert WEE, et al. Quantification of phosphatidylethanol 16:0/18:1, 18:1/18:1, and 16:0/16:0 in venous blood

- and venous and capillary dried blood spots from patients in alcohol withdrawal and control volunteers. *Anal Bioanal Chem* 2016;408(3):825–38. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-015-9169-1>
27. Aboutara N, Jungen H, Szewczyk A, Sterneck M, Müller A, Iwersen-Bergmann S. Analysis of six different homologues of phosphatidylethanol from dried blood spots using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal* 2021;13(1):140–7. <http://dx.doi.org/10.1002/dta.2910>
 28. Luginbühl M, Stöth F, Weinmann W, Gaugler S. Fully automated correction for the hematocrit bias of non-volumetric dried blood spot phosphatidylethanol analysis. *Alcohol* 2021;94:17–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.alcohol.2021.04.002>
 29. Hofmann V, Sundermann TR, Schmitt G, Bartel M. Development and validation of an analytical method for the simultaneous determination of the alcohol biomarkers ethyl glucuronide, ethyl sulfate, N-acetyltaurine, and 16:0/18:1-phosphatidylethanol in human blood. *Drug Test Anal* 2022;14(1):92–100. <http://dx.doi.org/10.1002/dta.3147>
 30. Liu Y, Zhang X, Li J, Huang Z, Lin Z, Wang J, et al. Stability of ethyl glucuronide, ethyl sulfate, phosphatidylethanol and fatty acid ethyl esters in postmortem human blood. *J Anal Toxicol* 2018;42(5):346–52. <http://dx.doi.org/10.1093/jat/bky010>
 31. Høiseth G, Karinen R, Johnsen L, Normann PT, Christophersen AS, Mørland J. Disappearance of ethyl glucuronide during heavy putrefaction. *Forensic Sci Int* 2008;176(2–3):147–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.08.002>
 32. Schloegl H, Dresen S, Spaczynski K, Stoertzel M, Wurst FM, Weinmann W. Stability of ethyl glucuronide in urine, post-mortem tissue and blood samples. *Int J Legal Med* 2006;120(2):83–8. <http://dx.doi.org/10.1007/s00414-005-0012-7>
 33. Eroshchenko NN, Barsegyan SS, Kiryushin AN, Tuaeava NO, Nosyrev AE, Salomatin VE. The development and validation of the method for the identification of ethyl glucuronide and ethyl sulfate as the markers of the consumption of ethyl alcohol during one's lifetime. *Sud Med Ekspert* 2018;61(4):42–7. <http://dx.doi.org/10.17116/sudmed201861442>
 34. Hernández Redondo A, Schroeck A, Kneubuehl B, Weinmann W. Determination of ethyl glucuronide and ethyl sulfate from dried blood spots. *Int J Legal Med* 2013;127(4):769–75. <http://dx.doi.org/10.1007/s00414-012-0815-2>
 35. Simon TW. Providing context for phosphatidylethanol as a biomarker of alcohol consumption with a pharmacokinetic model. *Regul Toxicol Pharmacol* 2018;94:163–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.01.029>
 36. Viel G, Boscolo-Berto R, Cecchetto G, Fais P, Nalesso A, Ferrara SD. Phosphatidylethanol in blood as a marker of chronic alcohol use: a systematic review and meta-analysis. *Int J Mol Sci* 2012;13(11):14788–812. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms131114788>
 37. Helander A, Hansson T. National harmonization of the alcohol biomarker PEth. *Lakartidningen* 2013;110(39–40):1747–8.

Tables and figures legends

Table 1: Retention time and mass transitions of PEth 16:0/18:1, PEth 16:0/20:4, EtG and their internal standards [*product ion used for quantification]

Table 2: Summary of PEths and EtG method validation results (*commercial samples only spiked with PEth 16:0/18:1, *na*: not applicable)

Table 3: Summarized stability evaluation of PEth 16:0/18:1 (* 2000 mg/L; **ranging from 100 to 3500 mg/L)

Table 4: Summarized stability evaluation of PEth 16:0/20:4 and EtG (* 2000 mg/L; **ranging from 100 to 3500 mg/L)

Table 5: Analytical results of four patients from a clinical study (PETHOXICO) obtained on admission (D0) and after 7 days hospitalization (D7) (*nd*: not detected)

Figure 1: Chromatogram example of a patient with PEth 16:0/18:1 (28 µg/L), PEth 16:0/20:4 (15 µg/L) and EtG (17 µg/L)

Table 1

Compound	RT (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Ion ratio	Collision energy (eV)	Cone voltage (V)
PEth 16:0/18:1	4.68	701.7	281.2*	2.5	38	45
			255.2		32	
PEth-D5 16:0/18:1	4.68	706.7	281.2*	2.5	38	
			255.1		32	
PEth 16:0/20:4	4.08	723.6	303.2*	2.3	27	
			255.1		32	
EtG	0.59	221.2	75.1*	1.0	15	30
			85		17	
EtG-D5	0.59	226.2	75.1*	1.0	15	
			85		17	

Table 2

	PEth 16:0/18:1	PEth 16:0/20:4	EtG B
Calibration range	2 - 1000 µg/L	2 - 500 µg/L	2 - 500 µg/L
CV	$R^2 \geq 0.99$	$R^2 \geq 0.99$	$R^2 \geq 0.99$
LOD	2 µg/L	2 µg/L	2 µg/L
LLOQ	2 µg/L	2 µg/L	2 µg/L
Accuracy (6 times for each QC)			
4 µg/L	-1%	4%	-1%
125 µg/L	1%	-2%	3%
250 µg/L	5%	3%	-9%
Intraday precision (6 times for each QC)			
4 µg/L	4%	6%	10%
125 µg/L	3%	4%	4%
250 µg/L	2%	6%	6%
40 µg/L*	1%	na	na
300 µg/L*	6%	na	na
Inter-day precision – accuracy (6 times for each QC)			
4 µg/L	9%	7%	12%
125 µg/L	11%	6%	9%
250 µg/L	8%	12%	10%
40 µg/L*	10%	na	na
300 µg/L*	6%	na	na
External QC (Equalis) (n=9)	mean = 5 % ; median = 7 % ; range = - 10 to 16 %		
ULOQ	1000 µg/L	500 µg/L	500 µg/L
Carry-over	< 1%	< 1%	< 1%
	As results under 5 µg/L are given as < 5µg/L for interpretation purposes, results above 500 µg/L which would give a “positive” result even in teetotalers needs to be confirmed by a second run		
Matrix effect (ME)	ME showed ion suppression below 15% for the 3 analytes		
Recovery	Highest recovery was achieved after either : <ul style="list-style-type: none"> • 60 min incubation at room temperature with 10 sec agitation and no centrifugation • 2 min ultrasonication at room temperature with 10 sec agitation and no centrifugation 		
Anticoagulant influence: sampling of sodium citrated, heparin, fluoride and EDTA tubes (n=4 x 12 patients)	no significant influence (maximum observed precision CV: 12.5%)	no significant influence (maximum observed precision CV: 10%)	no significant influence (maximum observed precision CV: 13%)

Table 3

Conditions	Extract stability (n=23)	Stability in DBS (n=28)	Stability in blood (citrate) (n=28)			Neoformation in blood (sodium fluoride) (n=63)				Neoformation in DBS (n=30)
			22°C	4°C	-20°C	No ethanol 22°C	spiked ethanol* 22°C	spiked ethanol* 4°C	Initial detectable BAC* 22°C	
Autosampler at 10°C		22°C	22°C	4°C	-20°C	No ethanol 22°C	spiked ethanol* 22°C	spiked ethanol* 4°C	Initial detectable BAC* 22°C	spiked ethanol* 22°C
Results	24h	6 months	1 day	7 days	14 days	No formation	PEth formation as soon as 4 hours	No formation	PEth formation as soon as 4 hours	No formation

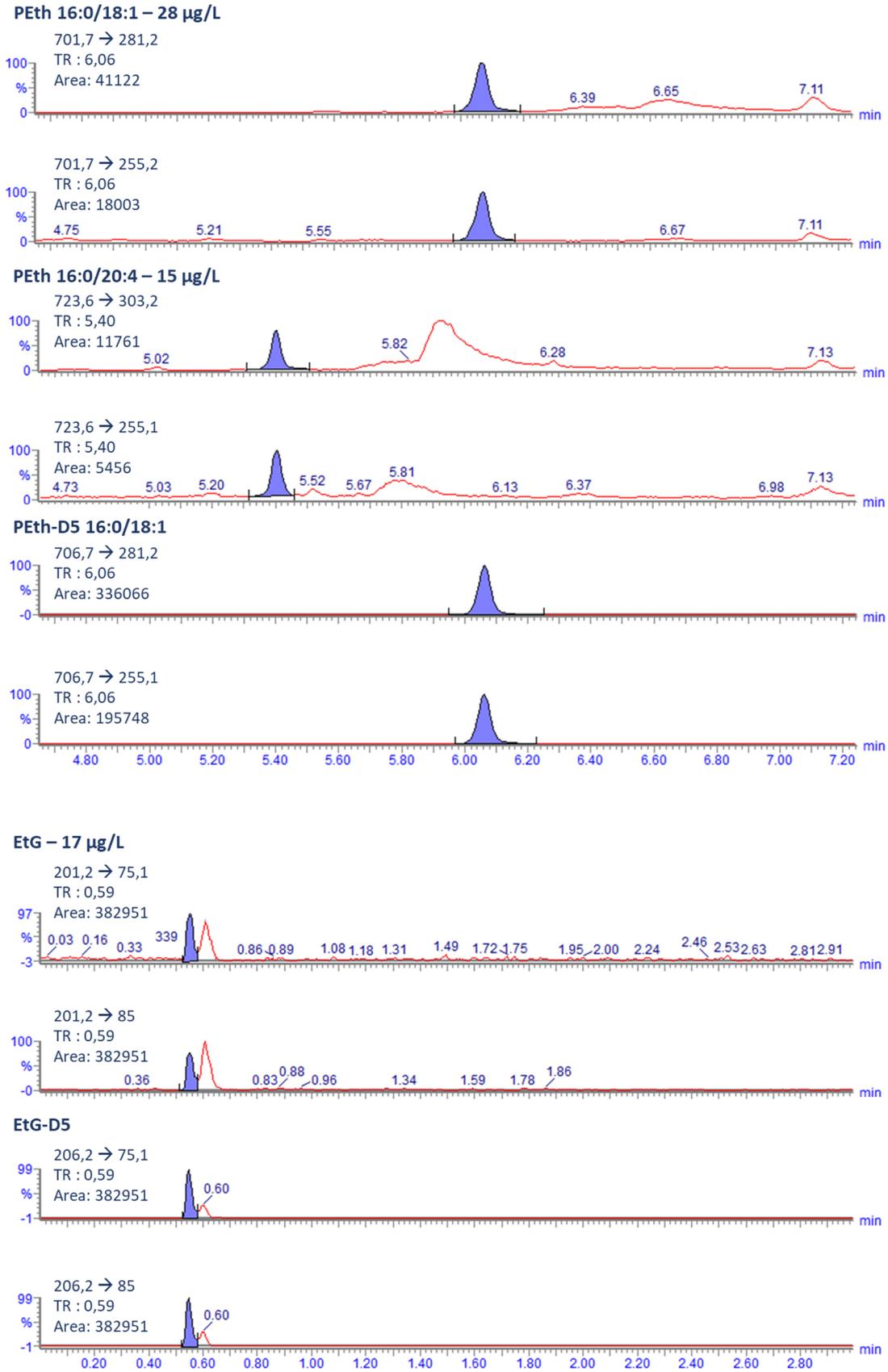
Table 4

Conditions	Stability in blood (citrate) (n=31)	Neoformation in blood (sodium fluoride) (n=31)			
		No ethanol 22°C	spiked ethanol* 22°C	spiked ethanol* 4°C	Initial detectable BAC** 22°C
4°C		No ethanol 22°C	spiked ethanol* 22°C	spiked ethanol* 4°C	Initial detectable BAC** 22°C
PEth 16:0/20:4	4 days	No formation	PEth formation as soon as 4 hours	No formation	PEth formation as soon as 4 hours
EtG	4 days	No formation	No formation	No formation	No formation

Table 5

Patient	Gender	Reported weekly ethanol consumption (g)	PEth 16:0/18:1 (µg/L)		PEth 16:0/20:4 (µg/L)		EtG B (µg/L)		EtOH (mg/L)	EtG U (mg/L)
			D0	D7	D0	D7	D0	D7		
#1	F	1400	452	310	51	nd	>500	nd	30	>10
#2	M	560	270	138	24	6	92	nd	nd	>10
#3	M	840	283	141	53	10	>500	nd	2140	>10
#4	M	1750	322	139	72	20	>500	nd	1500	>10

Figure 1



Analytical method dedicated to routine phosphatidylethanol 16:0/18:1, 16:0/20:4 and ethylglucuronide simultaneous determination using dried blood spots: additional data related to *in vitro* stability

Florian Hakim^{1,2}, Jean-François Wiart¹, Camille Richeval^{1,2}, Thomas Gicquel³, Damien Sciffet⁴, Olivier Cottencin⁴, Delphine Allorge^{1,2}, Jean-Michel Gaulier^{1,2*}

¹CHU Lille, Laboratory of Toxicology, F-59037 Lille, France

²Univ. Lille, URL 4483 – IMPECS – IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine, F-59000 Lille, France

³CHU Rennes, Laboratory of Toxicology and Forensic, F-Rennes 35033, France

⁴CHU Lille, Addictology Unit, F-59037 Lille, France

*Correspondence to Jean-Michel Gaulier

Laboratory of Toxicology – CHU

Bd du Professeur Jules Leclercq

CS 70 001

59037 LILLE Cedex

France

Email: jean-michel.gaulier@chru-lille.fr

Fax : +33 320444960

SUPPLEMENTARY DATA

Experiments and results for stability

Materials and methods

In this section we will use the following abbreviations: H (for hours), D (for days), and M (for months). In these experiments, stability was considered when the measured concentrations of at least 85 % of samples were in the range of +/- 15 % from the initial concentration (at day 0). In a preliminary step, extract stability was tested as follows: 23 samples were analyzed on the extraction day then left for 24 h in the autosampler at a regulated temperature of 10 °C and reanalyzed. All samples are transferred on DBS cards before being analyzed in the same batch.

PEth 16:0/18:1 stability in DBS

DBS samples (n=28) were analyzed on the day of receipt (D0) and left at room temperature to be reanalyzed at D14, M2, M6 and M14.

PEth 16:0/18:1 stability in Citrated blood

Authentic blood samples (n=28) were transferred on DBS cards on the day of receipt (D0) and several aliquots were left:

- at room temperature, or 4 °C, and transferred on DBS cards at D1, D2, D3, D4, D7, D14, D21, M1, M2 and M3 before being analyzed in the same batch.
- at -20 °C and transferred on DBS cards at D14, M1 and M3 before being analyzed in the same batch.

PEth 16:0/18:1 neoformation in presence of ethanol

Neoformation in sodium fluoride tubes:

- 48 samples with undetectable blood alcohol concentration (BAC, analyzed using a CPG-FID with a LLOQ of 0.0125 g/L) were aliquoted in two parts: one part analyzed as control samples, the other part spiked to obtain 2000 mg/L of ethanol and stored at room temperature. For 6 of them, one additional aliquot spiked with 2000 mg/L of ethanol was also stored at 4 °C.
- 15 samples with detectable BAC will remain unchanged and stored at room temperature. These samples were transferred on DBS cards on the day of receipt (D0), at H4, D1, D2 and D7 before being analyzed in the same batch.

Neoformation in DBS: 31 authentic blood samples (sodium fluoride tubes) with undetectable blood alcohol concentration (BAC) were spiked with 2000 mg/L of ethanol and immediately transferred on DBS cards. They were subsequently extracted 30 minutes, 4 hours and 1 day after DBS storage at room temperature and analyzed in the same batch.

PEth 16:0/20:4 and EtG stability and neoformation in presence of ethanol

Since within PEths homologues, PEth 16:0/18:1 is the most documented isoform with available threshold values and literature data, PEth 16:0/18:1 was considered as the limiting factor for stability issues (among the 3 analytes). In this way, PEth 16:0/20:4 and EtG stability study parameters (temperature, duration) were chosen according to PEth 16:0/18:1 stability outcomes. Thus, for these two analytes:

- 31 authentic blood samples (citrate blood) were transferred on DBS cards the day of reception (D0) and left at 4 °C to be transferred on DBS cards at D1, D2 and D4 before being analyzed in the same batch.
- Neoformation in sodium fluoride tubes: 13 samples with undetectable BAC were spiked with 2000 mg/L of ethanol and stored at 4 °C. These samples were transferred on DBS cards on the day of receipt (D0), at H4, D1 and D2 before being analyzed in the same batch.
- Neoformation in DBS: 31 authentic blood samples (sodium fluoride tubes) were spiked with 2000 mg/L of ethanol, immediately transferred on DBS card. They were subsequently extracted 30 minutes, 4 hours and 1 day after DBS storage at room temperature and analyzed in the same batch.

Results

In a preliminary step, extract stability was checked (n=23) for 24 h in the autosampler at a regulated temperature of 10 °C.

PEth 16:0/18:1 stability in DBS

Stability of PEth 16:0/18:1 in DBS at room temperature (**Figure 1**) can be considered as 92 % and 83 % (after 6 and 14 months, respectively) of the samples were within 15 % deviation from the initially measured concentration (at day 0). This is coherent with previously reported data by Bakhireva *et al.* (9 months) and Van Uytfaanghe *et al.* (13 months), on the contrary of Wang *et al.* (only 2 months) ^[1-3].

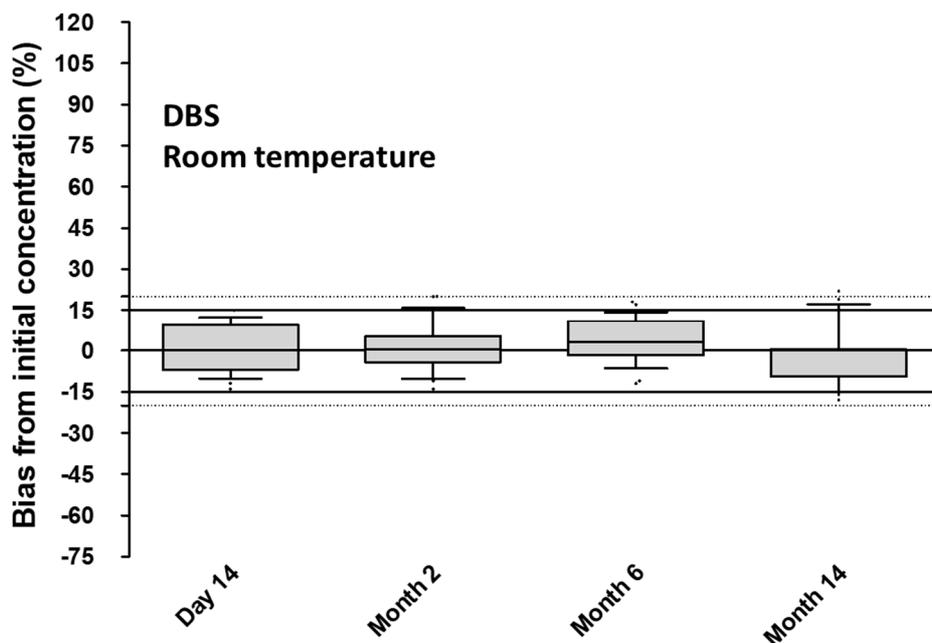


Figure 1: Stability of PEth 16:0/18:1 in DBS at room temperature (n=28, Whiskers 10-90 percentile)

PEth 16:0/18:1 stability in citrated blood

At room temperature (Figure 2), 88 % of the 24 samples exhibited PEth 16:0/18:1 concentration within 15 % deviation of the initial concentration after 24 hours, and 83 % after 48 hours. This percentage decreases to 20 % after 3 months.

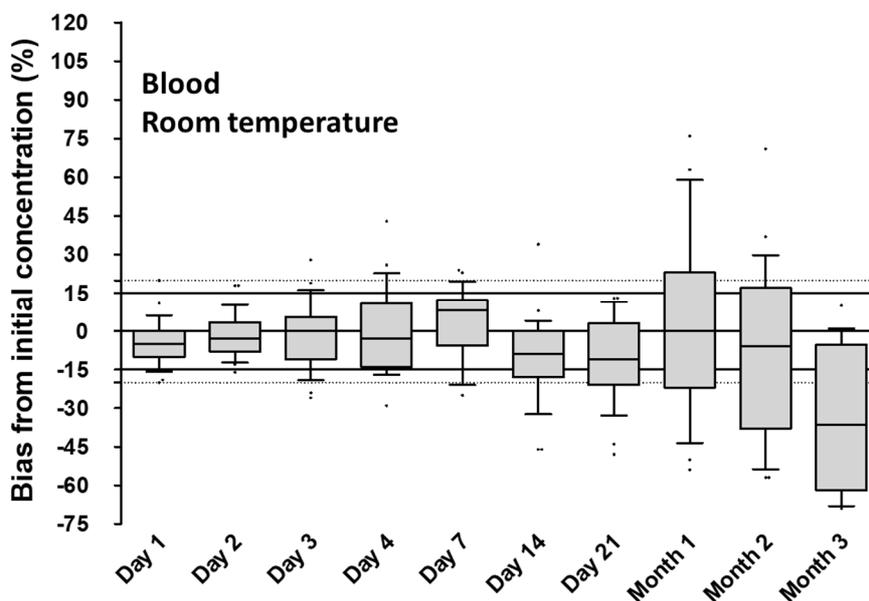


Figure 2: Stability of PEth 16:0/18:1 in citrated blood at room temperature (n=28, Whiskers 10-90 percentile, authentic citrated blood samples)

At 4 °C (Figure 3), the sample percentage exhibiting PEth 16:0/18:1 concentration within 15 % deviation of the initial concentration was 100 % up until day 3, over 86% at day 4 and above 83 % after 3 weeks.

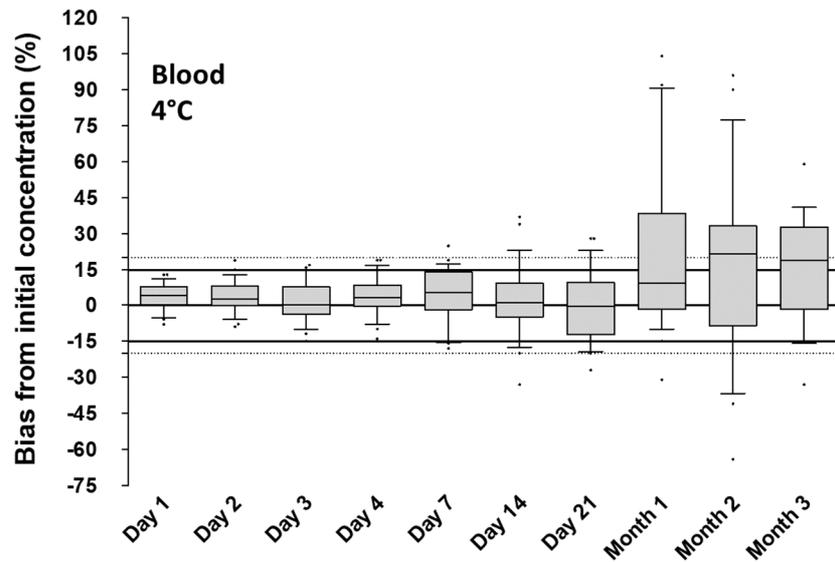


Figure 3: Stability of PEth 16:0/18:1 in citrated blood at 4°C (n=28, Whiskers 10-90 percentile, authentic citrated blood samples)

At -20 °C (**Figure 4**), 96 % of the 24 samples were still within 15 % deviation up until day 14, and then decreased under 50 % after 2 months.

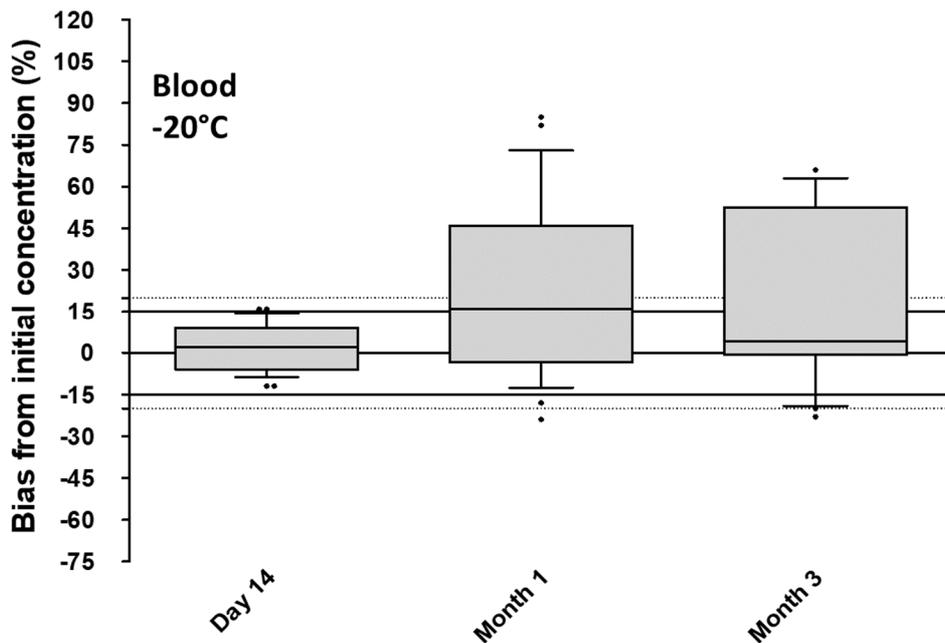


Figure 4: Stability of PEth 16:0/18:1 in citrated blood at -20°C (n=28, Whiskers 10-90 percentile, authentic citrated blood samples)

This instability of PEth 16:0/18:1 in blood when conserved at room temperature, at 4 °C or at -20 °C is already known and argues for the use of DBS as proposed in currently assay methods in the literature. However, considering a 15 % maximum variation of at least 85 % of the samples, we propose 24 hours, 4 and 14 days as maximum conservation delays for blood samples storage at room temperature, 4 °C and -20 °C, respectively before either analyzing these samples or transferring them onto DBS cards.

Neoformation in presence of ethanol of PEth 16:0/18:1

In blood sampled in sodium fluoride tubes, without detectable BAC and at room temperature, no concentration increases over 15 % (compared to day 0) was detected up until day 1. On day 2 and 7, results show a widening of boxplots consistent with the stability issues reported above (Figure 5).

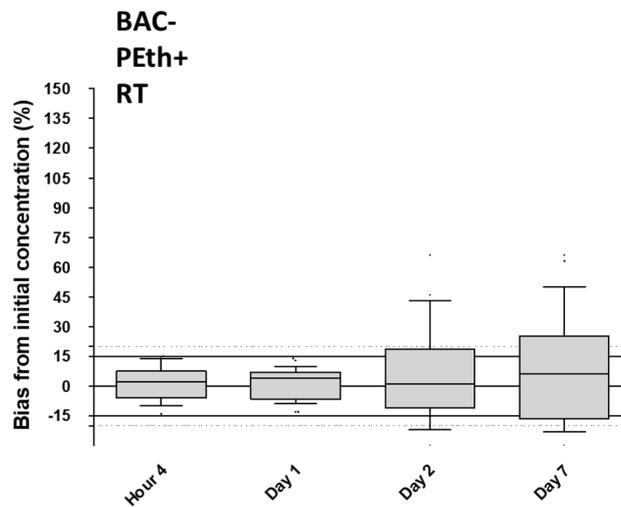


Figure 5: Neoformation of PEth 16:0/18:1 in sodium fluoride blood with detected PEth 16:0/18:1 concentration at H0, at room temperature, in the absence of ethanol (n=29, Whiskers: 10-90 percentile, authentic fluoride blood samples)

In sodium fluoride tubes spiked with ethanol (2000 mg/L) at room temperature, 35/48 (73 %) samples exhibited a concentration increase (from the initial one) over 15 % after 4 hours, and 48/48 (100 %) after 24 hours (Figure 6 and 7).

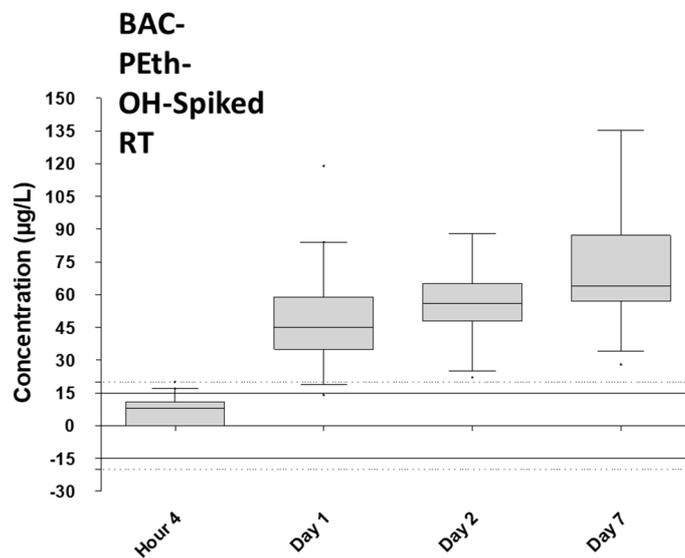


Figure 6: Neoformation of PEth 16:0/18:1 in sodium fluoride blood with undetectable BAC, without detected PEth 16:0/18:1 concentration at H0, spiked (2000 mg/L ethanol), at room temperature (n=19, Whiskers: 10-90 percentile, authentic fluoride blood samples)

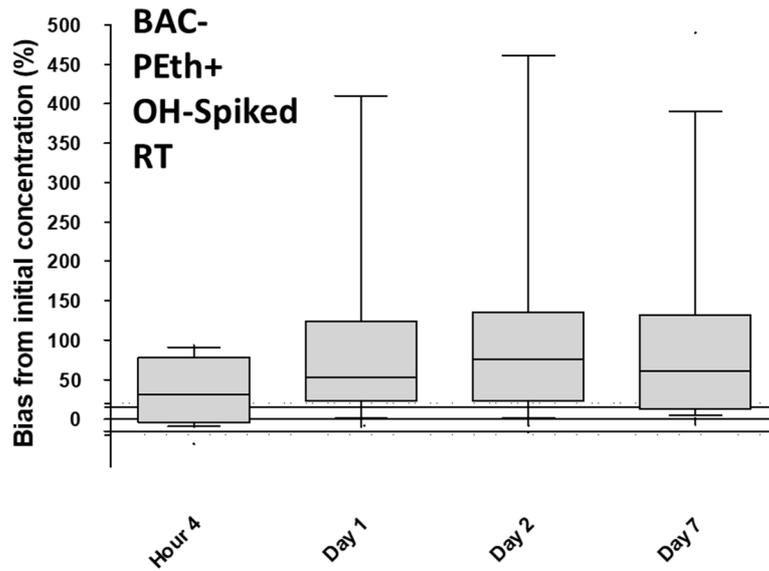


Figure 7: Neoformation of PEth 16:0/18:1 in sodium fluoride blood with undetectable BAC, with detected PEth 16:0/18:1 concentration at H0, spiked (2000 mg/L ethanol), at room temperature (n=29, Whiskers: 10-90 percentile, authentic fluoride blood samples)

At this same temperature, in sodium fluoride tubes with detectable BAC (ranging from 100 to 3500 mg/L), 8/15 (53 %) samples exhibited a concentration increase over 15 % after 4 hours, and 15/15 (100 %) after 24 hours (**Figure 8**).

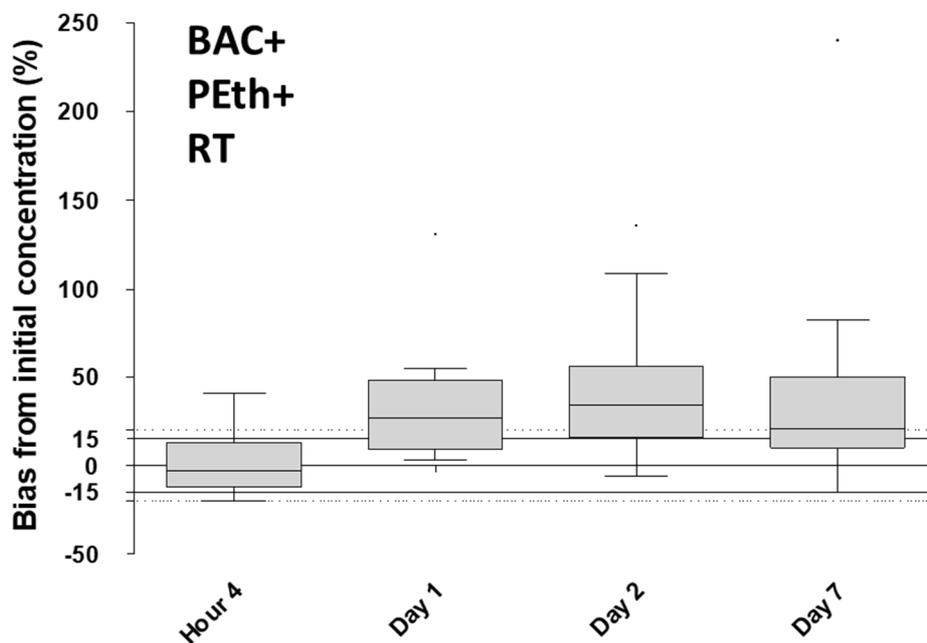


Figure 8: Neoformation of PEth 16:0/18:1 in sodium fluoride blood with detectable BAC at room temperature (n=15, Whiskers: 10-90 percentile, authentic fluoride blood samples)

When stored at 4 °C, no concentration increases over 15 % (compared to day 0) was detected up until day 7 in sodium fluoride samples (n=6) spiked with ethanol (2000 mg/L) (**Figure 9**).

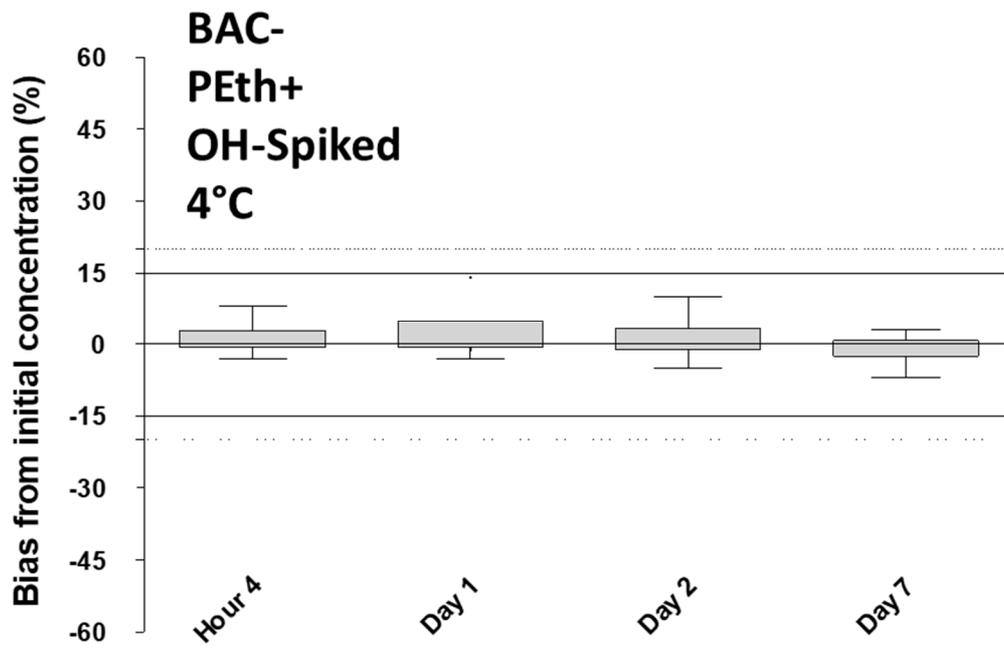


Figure 9: Neof ormation of PEth 16:0/18:1 in sodium fluoride blood with undetectable BAC, spiked (2000 mg/L ethanol) at 4 ° C (n=6, Whiskers: 10-90 percentile, authentic fluoride blood samples)

Stability of PEth 16:0/20:4 and EtG

In authentic blood samples (citrated blood), obtained results for PEth 16:0/20:4 and EtG are like those for PEth 16:0/18:1 with, at 4 °C (**Figure 10 to 12**), 94 % of the 31 samples for PEth 16:0/20:4, and 90 % of the 31 samples for EtG still under 15 % concentration variation (compared to day 0) at D4.

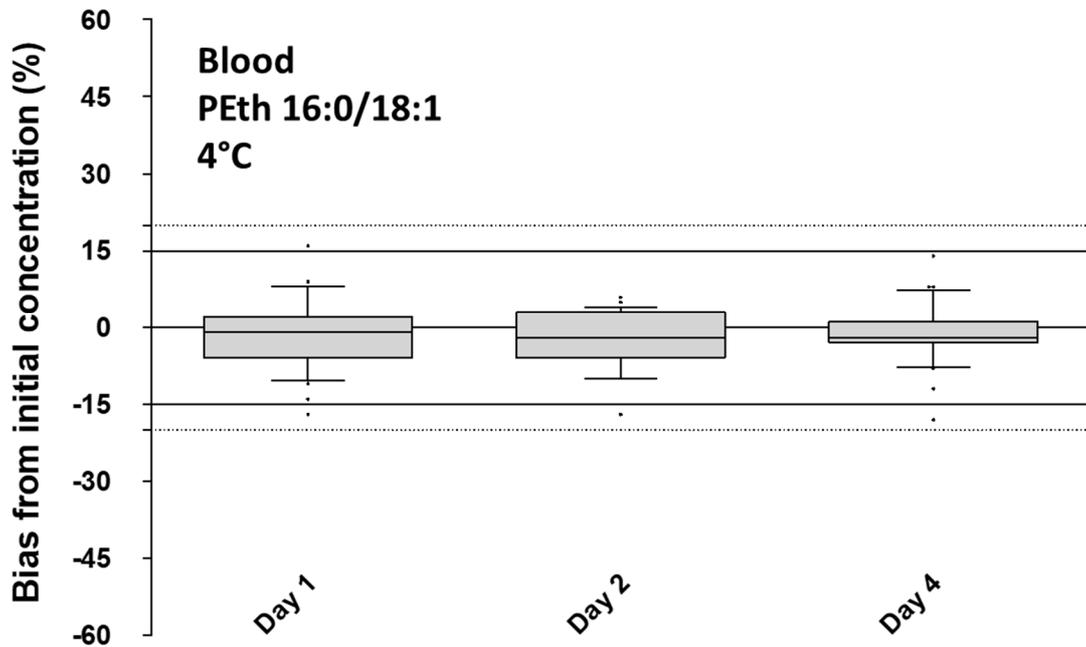


Figure 10: Stability in citrated blood at 4°C of PEth 16:0/18:1 (n=31, Whiskers: 10-90 percentile, authentic citrated blood samples)

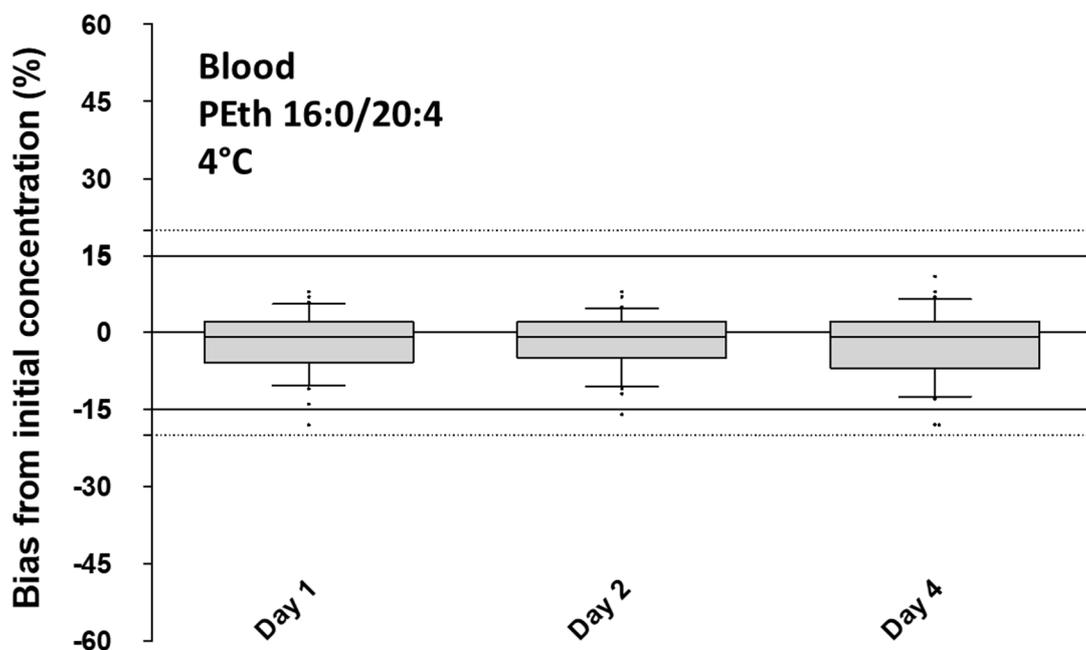


Figure 11: Stability in citrated blood at 4°C of PEth 16:0/20:4 (n=31, Whiskers: 10-90 percentile, authentic citrated blood samples)

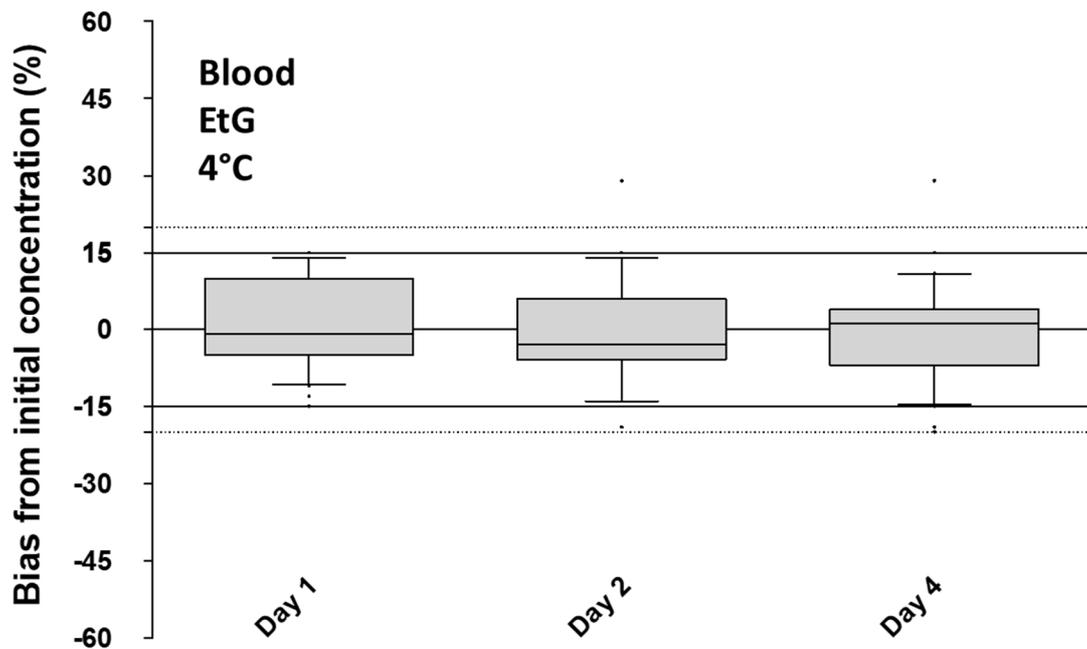


Figure 12: Stability in citrated blood at 4°C of EtG (n=31, Whiskers: 10-90 percentile, authentic citrated blood samples)

Concerning neoformation issues in presence of ethanol, in sodium fluoride tubes without detectable BAC, no PEth 16:0/20:4 concentration increases over 15 % (compared to day 0) was detected up until day 7 at room temperature (**Figure 13**).

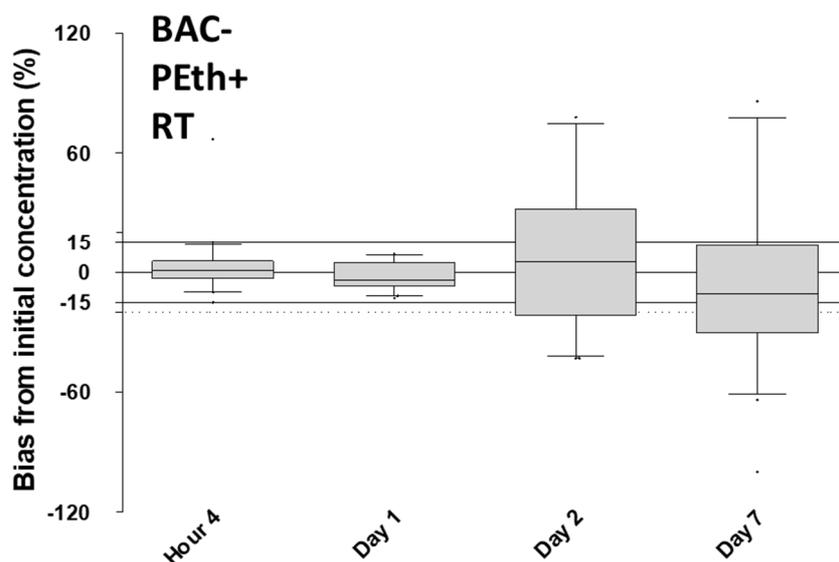


Figure 13: Neoformation of PEth 16:0/20:4 in sodium fluoride tubes without detectable BAC, at room temperature (n=31, Whiskers: 10-90 percentile, authentic fluoride blood samples)

In sodium fluoride tubes spiked with ethanol (2000 mg/L), 88 % of the 48 samples exhibited a PEth 16:0/20:4 concentration increases over 15 % (from the initial one) after 1 day at room temperature (**Figure 14 and 15**).

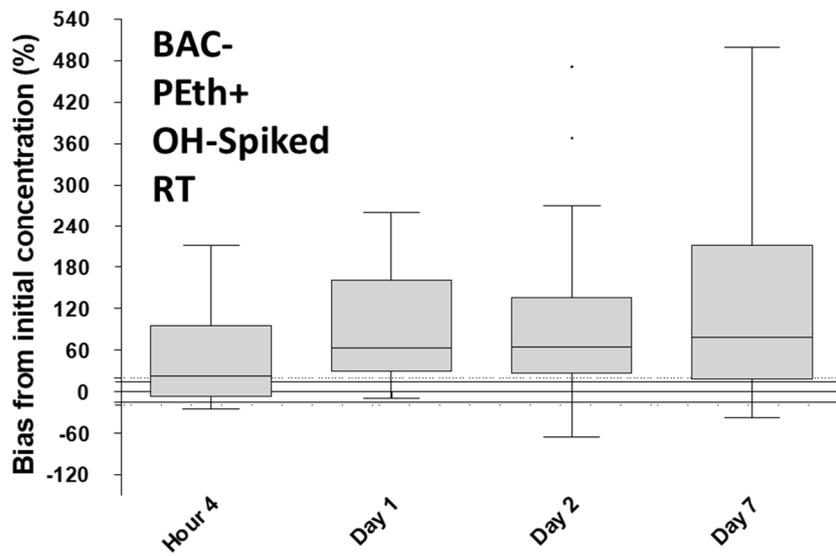


Figure 14: Neoformation of PEth 16:0/20:4 in sodium fluoride tubes without detectable BAC, at room temperature, with detected PEth 16:0/20:4 concentration at H0, spiked (2000 mg/L ethanol) (n=31, Whiskers: 10-90 percentile, authentic fluoride blood samples)

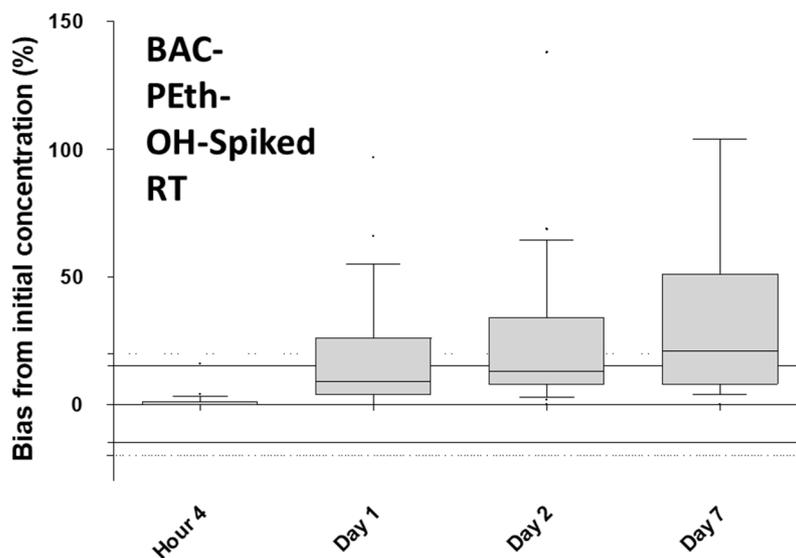


Figure 15: Neoformation of PEth 16:0/20:4 in sodium fluoride tubes without detectable BAC, at room temperature, without detected PEth 16:0/20:4 concentration at H0, spiked (2000 mg/L ethanol) (n=31, Whiskers: 10-90 percentile, authentic fluoride blood samples)

With detectable BAC (from 100 to 2500 mg/L) at room temperature, 86 % of the 7 samples exhibited a PEth 16:0/20:4 concentration increases over 15 % (from the initial one) after 1 day at room temperature (**Figure 16**).

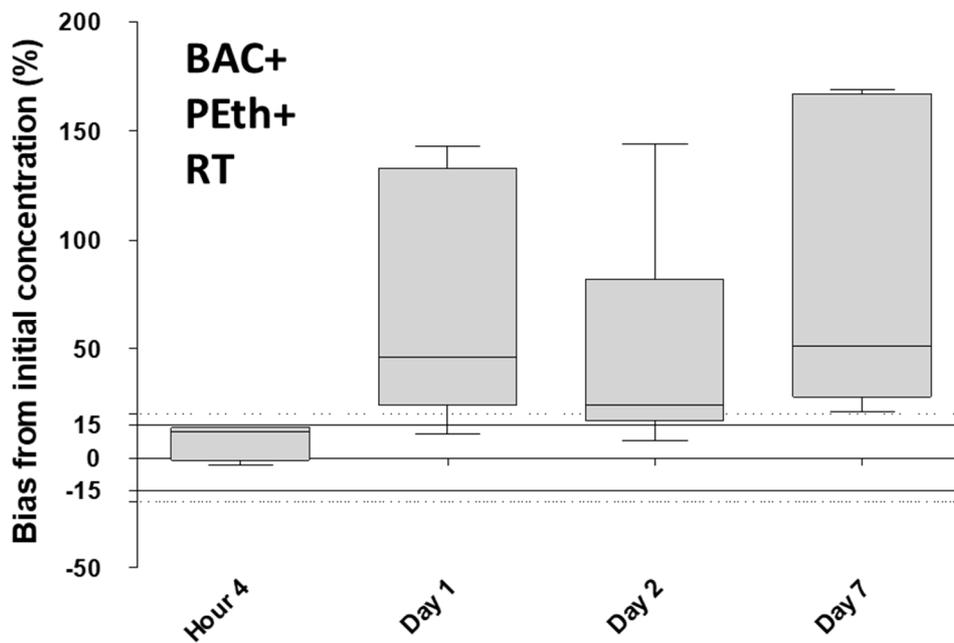


Figure 16: Neoformation of PEth 16:0/20:4 in sodium fluoride tubes with detectable BAC, at room temperature, with detected PEth 16:0/20:4 concentration at H0, spiked (2000 mg/L ethanol) (n=31, Whiskers: 10-90 percentile, authentic fluoride blood samples)

However, in sodium fluoride tubes spiked with ethanol (2000 mg/L), no PEths (16:0/18:1 and 16:0/20:4), nor EtG formation was observed up until 24 hours, when stored at 4 °C (**Figure 17 to 19**).

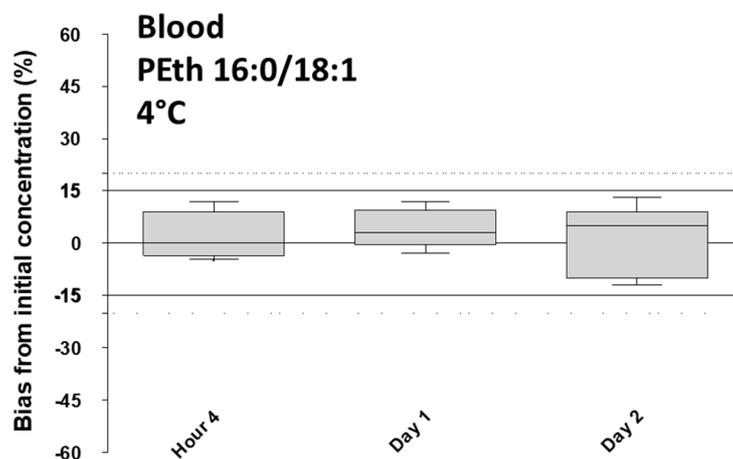


Figure 17: Neoformation in sodium fluoride blood spiked with 2000 mg/L ethanol at 4°C of PEth 16:0/18:1 (n=13, Whiskers: 10-90 percentile, authentic fluoride blood samples)

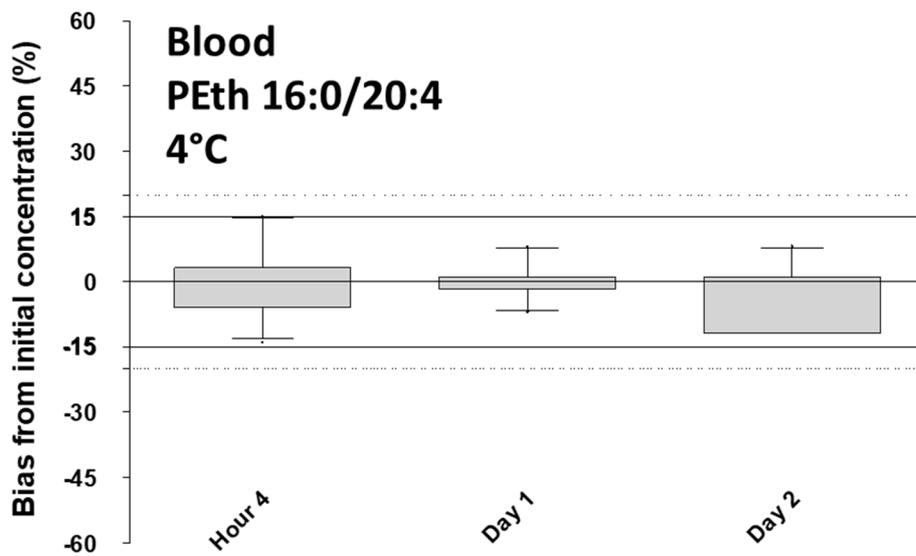


Figure 18: Neoformation in sodium fluoride blood spiked with 2000 mg/L ethanol at 4°C of PEth 16:0/20:4 (n=13, Whiskers: 10-90 percentile, authentic fluoride blood samples)

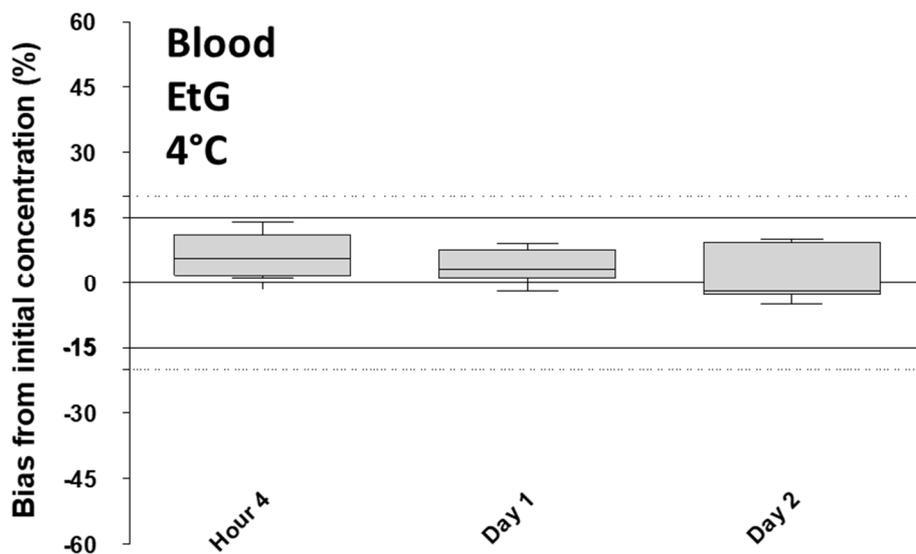


Figure 19: Neoformation in sodium fluoride blood spiked with 2000 mg/L ethanol at 4°C of EtG (n=13, Whiskers: 10-90 percentile, authentic fluoride blood samples)

No PEths (16:0/18:1 and 16:0/20:4), nor EtG formation was observed up until 24 hours in DBS spiked with ethanol (2000 mg/L) (Whatman 903) stored at room temperature (**Figure 20 to 22**).

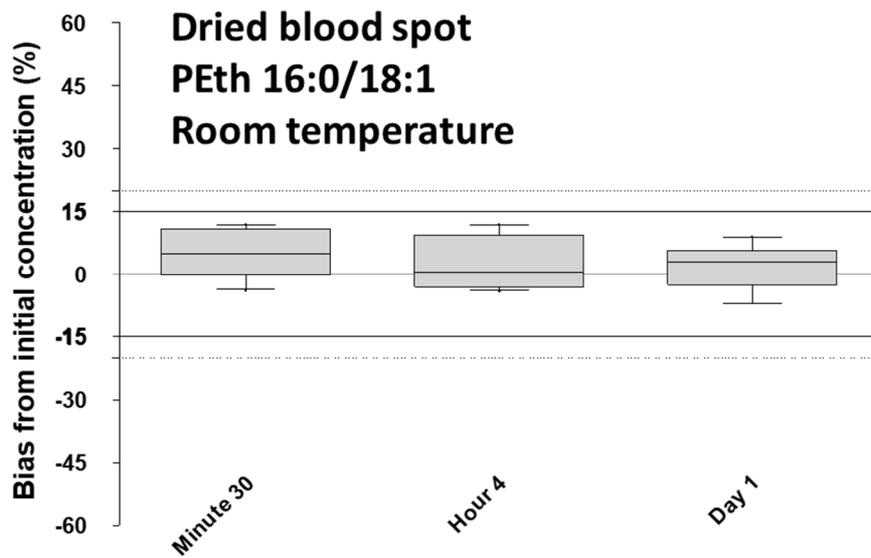


Figure 20: Neoformation in DBS (Whatman 903™) spiked with ethanol (2000 mg/L) at room temperature of PEth 16:0/18:1 (n=31, Whiskers: 10-90 percentile)

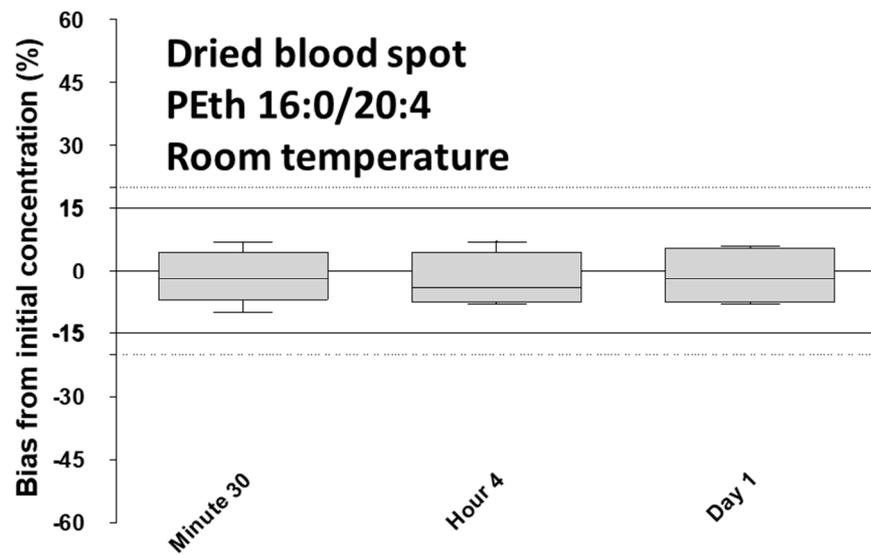


Figure 21: Neoformation in DBS (Whatman 903™) spiked with ethanol (2000 mg/L) at room temperature of PEth 16:0/20:4 (n=31, Whiskers: 10-90 percentile)

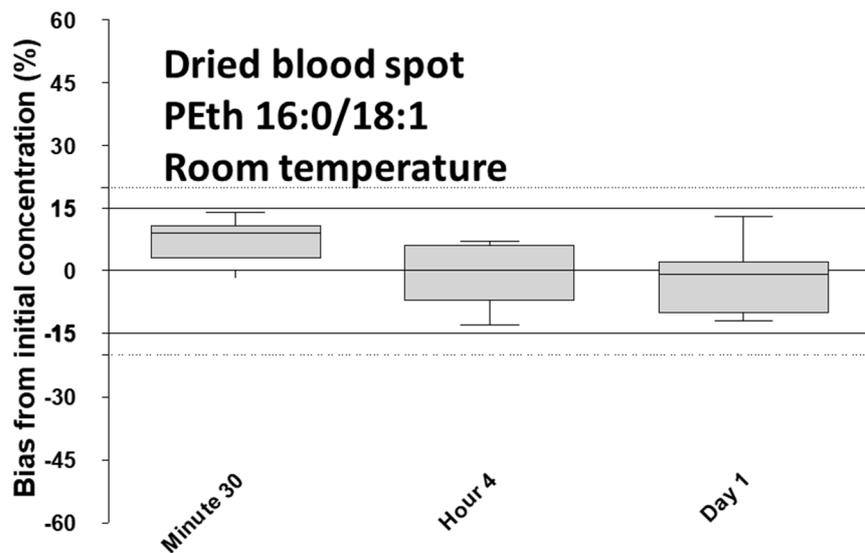


Figure 22: Neoformation in DBS (Whatman 903™) spiked with ethanol (2000 mg/L) at room temperature of EtG ($n=31$, Whiskers: 10-90 percentile)

References:

1. Bakhireva, L.N., Shrestha, S., Gutierrez H.L., Berry, M., Schmitt, C., Sarangarm, D. (2016) Stability of Phosphatidylethanol in Dry Blood Spot Cards. *Alcohol Alcohol*, 51(3), 275-280. doi:10.1093/alcalc/agv120.
2. Wang, H., Zhang, Y., Zhang, X., Li, J., Lin, Z., Huang, Z. et al. (2020) An LC-MS/MS method for comparing the stability of ethanol's non-oxidative metabolites in dried blood spots during 90 days. *Alcohol*, 83, 29-35. doi:10.1016/j.alcohol.2019.05.007.
3. Van Uytfanghe, K., Ramirez Fernandez, M.D.M., De Vos, A., Wille, S.M., Stove, C.P. (2021) Quantitation of phosphatidylethanol in dried blood after volumetric absorptive microsampling. *Talanta*, 223(Pt 1), 121694. doi:10.1016/j.talanta.2020.121694.

1.3.7. Validation et néoformation sur dispositif Neoteryx Mitra™

Validation par comparaison de méthode

Afin de valider l'utilisation du dispositif volumétrique de prélèvement capillaire (VAMS) Néotéryx Mitra™, 31 échantillons sont déposés successivement sur un buvard de type Whatman 903™ et sur un Néotéryx Mitra™. Les 62 (2x31) échantillons sont analysés dans la même série. Les résultats montrent une corrélation de ces deux dispositifs pour chacun de nos 3 analytes (PEth 16:0/18:1, PEth 16:0/20:4 et EtG) avec des CV inférieurs à 15 % (à l'exception d'un échantillon pour l'EtG). Les figures 25 à 27 illustrent ces résultats.

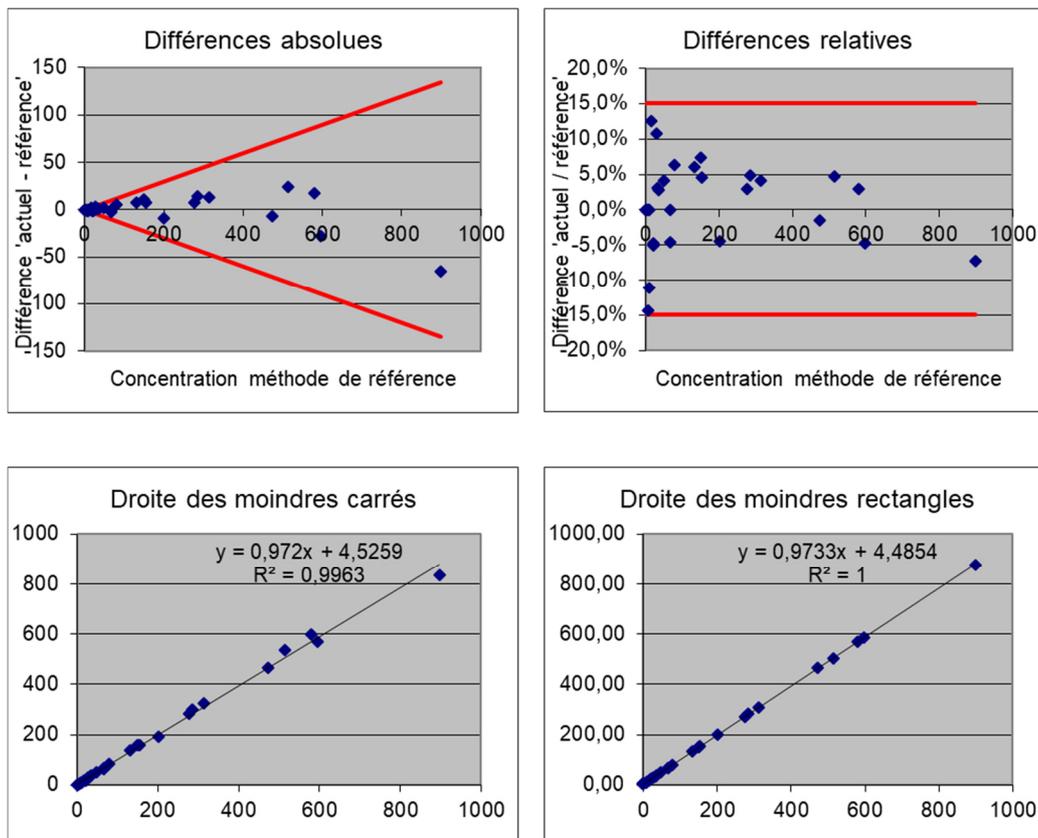


Figure 25: Résultats de l'étude de corrélation Whatman 903™ vs Neoteryx Mitra™ pour le PEth 16:0/18:1

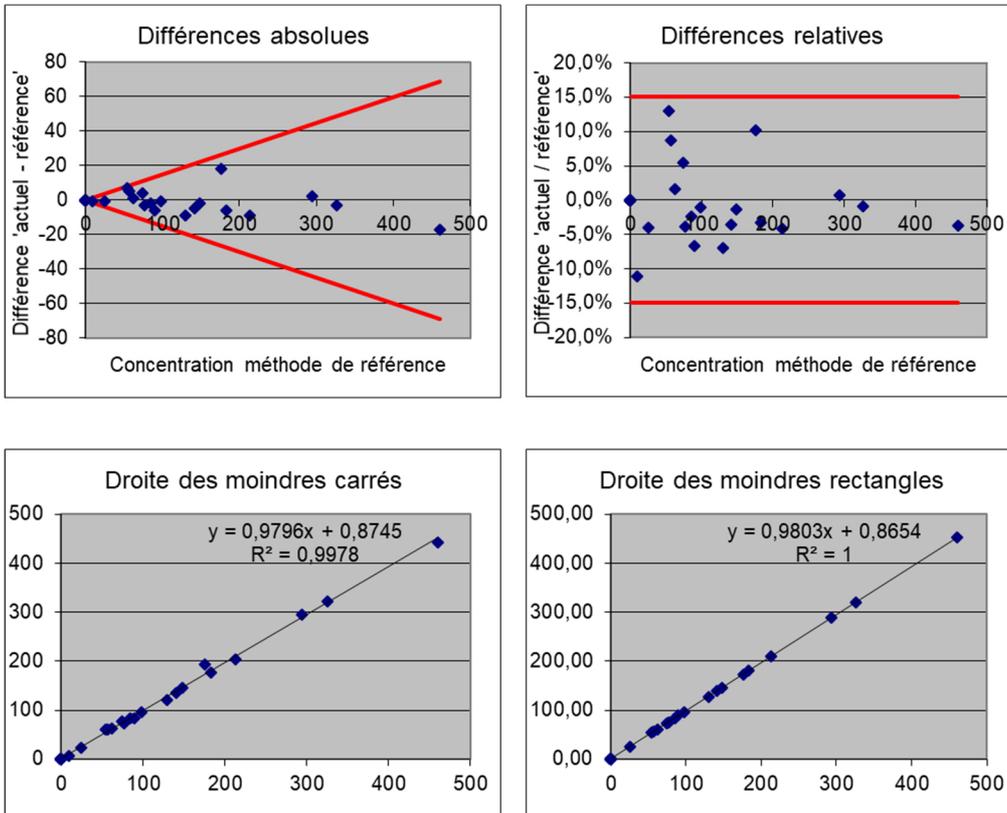


Figure 26: Résultats de l'étude de corrélation Whatman 903™ vs Neoteryx Mitra™ pour le PEth 16:0/20:4

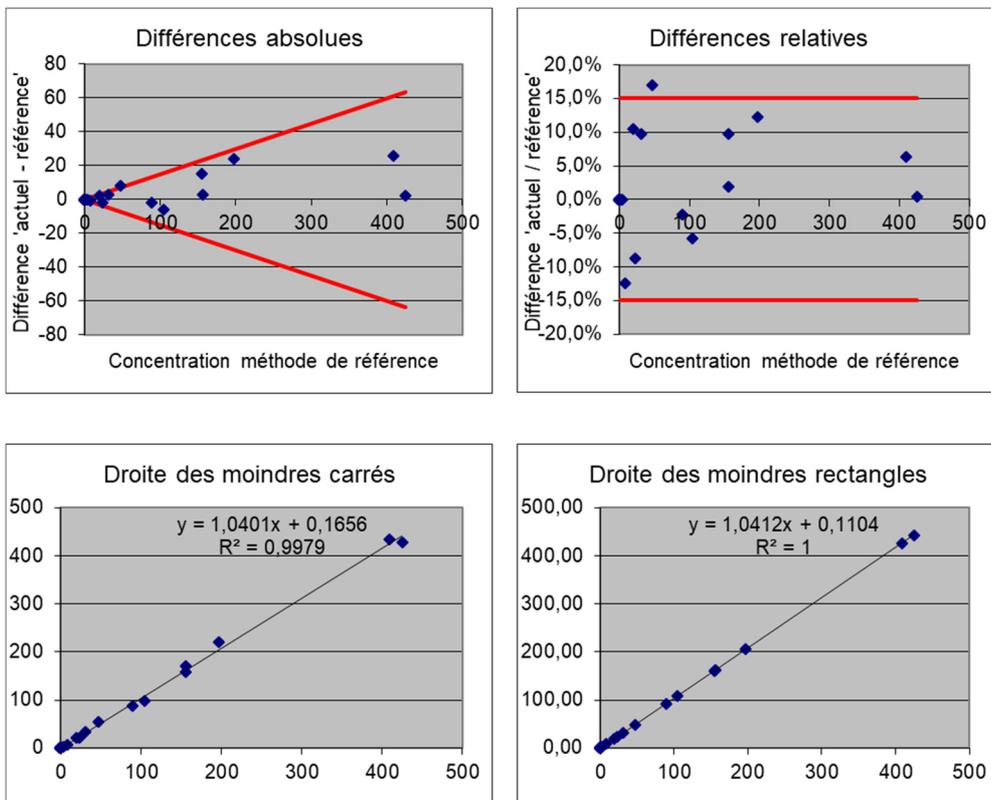


Figure 27: Résultats de l'étude de corrélation Whatman 903™ vs Neoteryx Mitra™ pour l'EtG

Néoformation dans les Néoteryx Mitra™

Afin de vérifier si une néoformation se produit après le dépôt du sang total sur le dispositif Mitra™, 30 échantillons (tubes fluorés) dont l'éthanolémie est indétectable sont sélectionnés. Un premier dépôt de sang sur le dispositif est effectué, puis un ajout d'éthanol (à 2 g/L) est réalisé sur un aliquot de chaque échantillon. Après homogénéisation, 3 dépôts de sang pour chaque échantillon sont réalisés sur le dispositif qui sera extrait après 2 heures, 4 heures et 24 heures respectivement de séchage. La totalité des 120 (4x30) échantillons est analysée dans la même série.

Les résultats montrent :

- Une absence de néoformation dans les échantillons ne contenant pas de PEth à H0 (n = 14)
- Une absence de différence significative entre H0 et H2, H4, H24 pour les échantillons contenant du PEth à H0 (figure 28) (n = 16, Anova, p = 0.2909, F = 1.286, R² = 0.07894)

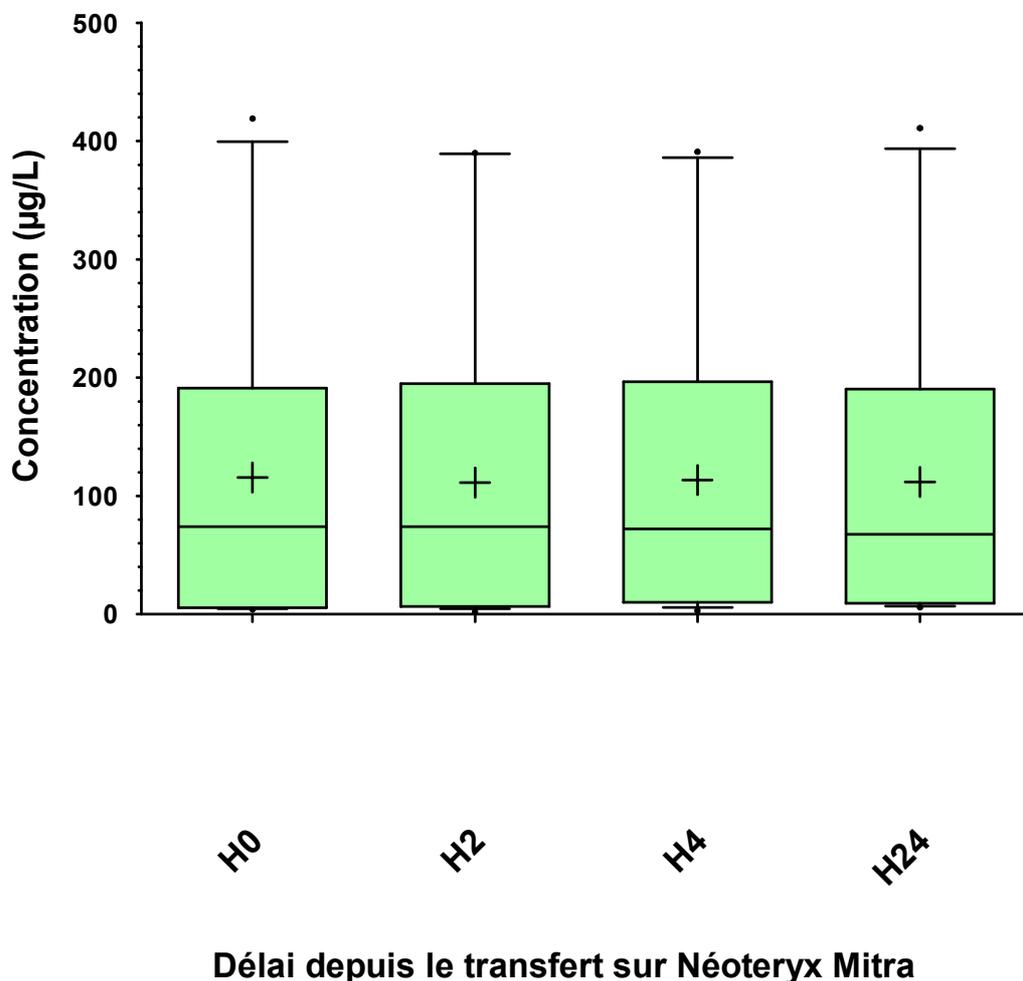


Figure 28: Néoformation dans les échantillons contenant du PEth à H0

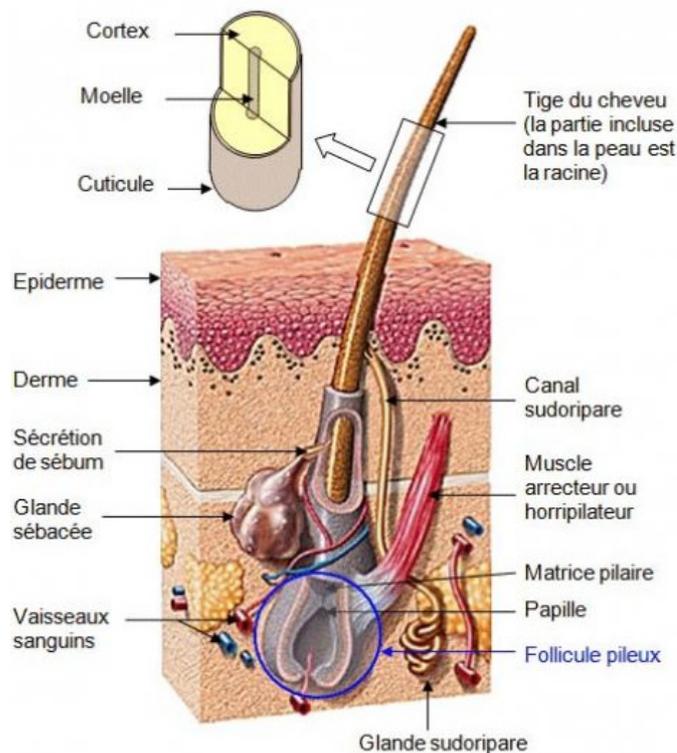
2. Éthylglucuronide dans les cheveux

2.1. Les cheveux : matrice d'incorporation de molécules endogènes comme de xénobiotiques

Une compréhension de la biologie des cheveux est nécessaire afin de mieux interpréter les résultats des tests d'analyse capillaire avec précision.

Les cheveux poussent à partir de petits organes appelés follicules, situés sous la peau. Ils comportent trois glandes dont les sécrétions baignent les cheveux et de multiples systèmes vasculaires capables de transférer des médicaments dans les cheveux. Chacun de ces follicules est constitué de cinq éléments (Figure 29) (81) :

- Le **bulbe pileux** forme une partie renflée et implantée dans le cuir chevelu. Il donne naissance en continu à des cellules épithéliales, qui progressent vers la surface cutanée.
- La **racine pileuse** est constituée de trois zones concentriques. La **medulla** est la partie centrale creuse contenant des cellules lâches. La **cuticule**, couche la plus externe, forme une enveloppe de 5 à 10 couches de cellules ressemblant à des écailles. Responsable de la grande résistance physico-chimique et de la brillance des cheveux, elle peut être endommagée ou détruite par des produits chimiques, la chaleur, la lumière ou des blessures mécaniques. En conséquence, la cuticule devient moins intacte vers l'extrémité distale de la tige et peut s'effiloche et s'effondrer. Entre ces deux couches, le **cortex** constitue la partie la plus épaisse. Il est pigmenté, riche en kératine, et ainsi responsable de la rigidité et de la coloration des cheveux.
- La **tige pileuse** est la partie visible du cheveu.
- La **glande sébacée** est constituée d'une partie sécrétoire et d'un court canal excréteur, contribuant à la formation d'un film hydrolipidique de surface : le sébum.
- Le **muscle arrecteur** ou **horripilateur** est disposé en écharpe sous la glande sébacée. Ses contractions permettent un redressement du cheveu sous l'effet du froid ou de stimuli divers.



Implantation et structure d'un cheveu

Figure 29 : Représentation schématique de la structure des cheveux
 (source : <https://www.cliniqueesthetique.com/cheveux>, consulté le 20/07/2022)

Le cheveu possède une composition chimique complexe : une majorité de protéines, de l'eau, des lipides et des minéraux. Il est caractérisé par un cycle pileux et par sa vitesse de croissance, il chute ensuite de façon individuelle et cyclique. On distingue ainsi trois phases :

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

Sur le cuir chevelu d'un être humain adulte, environ 85 % des cheveux sont en phase de croissance et incorporent des xénobiotiques, et leur vitesse de pousse est en moyenne de 1 cm par mois. Cependant, tous les cheveux ne poussent pas en même temps et le pourcentage de follicules dans une phase de croissance dépend de la localisation anatomique et de l'âge. En comparaison à d'autres matrices « traditionnelles », comme le sang et l'urine, les cheveux sont particulièrement intéressants grâce à leur facilité de collecte d'échantillons, leur transport et leur stockage. Leur longue fenêtre de détection (pouvant aller de plusieurs mois à des années) permet une étude rétrospective des consommations chroniques et passées (82). Les différents mécanismes d'incorporation des drogues dans les cheveux sont mal connus. Il existe une diffusion active et passive des xénobiotiques dans les cheveux :

- L'incorporation **active** s'effectue chez la personne ayant consommé le xénobiotique. Véhiculé par le sang et les sécrétions (sébum, sueur), il passe par diffusion vers les cellules en croissance au niveau du bulbe pileux.

- L'incorporation **passive** s'effectue chez la personne n'en ayant pas consommé. Il s'agit de substances déposées à la surface des cheveux à partir de l'environnement externe (pollution par des substances volatiles par exemple).

Cinq facteurs principaux influencent l'incorporation de xénobiotiques dans les cheveux : le contenu capillaire en mélanine, la lipophilie et la basicité de la substance, l'origine ethnique et la structure de la kératine (83).

L'analyse des cheveux peut être modifiée par des procédures esthétiques telles que la teinture, la décoloration et l'ondulation permanente qui diminuent la teneur en substance médicamenteuse ou toxique des cheveux. Par ailleurs, les cheveux de patients noirs Afro-américains plus riches en kératine et mélanine concentrent plus les drogues que les cheveux des Caucasiens (84).

2.2.L'éthylglucuronide

L'éthylglucuronide (ethyl- β -D-6-glucuronide, EtG, figure 30) est un métabolite hydrosoluble, non volatile et direct de l'alcool (éthanol), qui s'incorpore et s'accumule dans les matrices de kératine telles que les cheveux et les ongles. Il est formé par une réaction de conjugaison de l'acide glucuronique, catalysée par une UDP-glucuronosyltransférase (85). Environ 0,02 à 0,06 % de l'alcool ingéré est éliminé sous forme d'EtG (83) qui est excrété principalement dans l'urine, et une petite fraction est incorporée dans les cheveux (84). Ainsi, il peut être dosé dans les cheveux pour détecter une consommation de boissons alcoolisées. La "Society of Hair Testing" (SoHT) a émis un consensus dans ce sens et recommande un seuil de 30 pg/mg de cheveux mesuré dans le segment capillaire proximal du cuir chevelu 0-3 jusqu'à 0-6 cm pour conclure à un excès chronique d'alcool (consommation de 60 g ou plus par jour sur plusieurs mois); un seuil de 5 pg/mg dans un segment proximal de 3 à 6 cm de cheveux a été proposé pour ne pas contredire la déclaration d'abstinence du patient. Les mêmes valeurs seuils d'interprétations peuvent être utilisées pour les poils (à l'exception des poils axillaires et pubiens) et en prenant en compte les différences dans la période représentée pour ces poils (37).

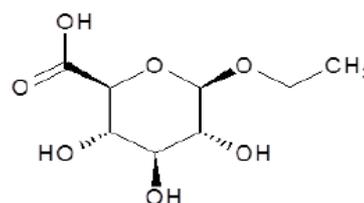


Figure 30: structure chimique de l'éthylglucuronide

2.3.Équipement

L'analyse de l'EtG dans les cheveux a été réalisée par CL-SM/SM (XEVO TQ-XS de la société WATERS). Il existe plusieurs sources d'ionisations disponibles sur cet appareil : dans le cadre de ce travail, l'ionisation par Electrospray en mode négatif (ESI) sera utilisée.

2.4.Phase préanalytique

2.4.1. Méthode de prélèvement et conservation

L'échantillon de cheveux doit, autant que possible, être prélevé (coupé au plus proche du cuir chevelu) au niveau du vertex postérieur, à l'arrière du crâne, car il s'agit de la région anatomique la moins soumise à une variation de la vitesse de croissance. La couleur, longueur, l'emplacement de prélèvement et les éventuels traitements cosmétiques visibles doivent être spécifiés. L'échantillon de cheveux doit être orienté avec le côté racine identifié et aligné. Enfin, l'échantillon doit être séché si nécessaire, conservé au sec, à température

ambiante et dans le noir. L'utilisation d'un réfrigérateur ou d'un congélateur est déconseillée de par l'humidité ambiante (86).

2.4.2. Décontamination des cheveux

Suivant la méthode proposée par Lamoureux *et al.* (87), Les cheveux sont décontaminés par 2 bains successifs d'une minute dans 10mL d'eau désionisée (MiliQ®) puis 2 bains successifs d'une minute dans 10 mL de dichlorométhane. Les cheveux sont séchés entre chaque bain sur un papier absorbant.

2.4.3. Découpe des cheveux

Malgré une littérature fournie concernant la méthode de découpe des cheveux, qui démontre la supériorité du rendement d'extraction par des techniques de pulvérisation comparé aux cheveux coupés (88-89). La Society of Haire Testing (SOHT) a, par ailleurs, émis une recommandation dans ce sens (37). Nous ne disposions pas d'équipement de pulvérisation au moment du développement de cette méthode, ainsi, la découpe des cheveux est effectuée par des ciseaux en coupant des segments inférieurs à 1 mm.

2.4.4. Prise d'essai

Afin d'obtenir une sensibilité maximale tout en permettant une analyse lorsque peu de cheveux sont disponibles, la prise d'essai est fixée à 50 mg. Cette valeur a été déterminée en prenant la plus basse valeur de pesée de 30 mèches de cheveux reçues au laboratoire.

2.4.5. Solutions mères et gammes de calibrations

L'étalon interne est l'éthylglucuronide-D5 (identique au chapitre EtG sanguin), les solutions mères (fourni par LGC®) sont des solutions méthanolique d'EtG et d'EtG-D5 à 10 mg/L (soit 10000 pg/μL). Le tableau 13 résume la dilution des solutions mères afin de construire une gamme de calibration en 6 points et d'ajouter l'étalon interne deutéré dans l'échantillon patient. Les échantillons de cheveux utilisés pour la gamme de calibration sont issus d'un volontaire abstinent.

Tableau 13 : Tableau retraçant la méthode de dilution des solutions mères et la constitution de la gamme de calibration et des échantillons patients

Solutions mères				
EtG				
1	10 000 pg/μl	Solution mère		
2	100 pg/μL	20 μL de solution 1 dans 1980 μL de méthanol		
3	10 pg/μL	20 μL de solution 2 dans 180 μL de méthanol		
EtG-D5				
4	10 000 pg/μl	Solution mère		
5	200 pg/μl	40 μL de solution 4 dans 1960 μL de méthanol		
Gamme de calibration				
Solutions	5 EtG-D5 (200 pg/μL)	3 EtG (10 pg/μL)	2 EtG (100 pg/μL)	Eau désionisée
0	100 μL			2 mL
4 pg/mg	100 μL	20 μL		2 mL
8 pg/mg	100 μL	40 μL		2 mL
20 pg/mg	100 μL		10 μL	2 mL
40 pg/mg	100 μL		20 μL	2 mL
80 pg/mg	100 μL		40 μL	2 mL
200 pg/mg	100 μL		100 μL	2 mL
Echantillons				
Patients	100 μL			2 mL

2.4.6. Extraction de l'éthylglucuronide

Solution d'extraction

La littérature montre que l'eau désionisée est la solution d'extraction permettant le meilleur rendement d'extraction de l'EtG (90). Cependant, le volume de solution nécessaire à une bonne extraction (1 à 2 mL) entraîne une forte dilution de cet analyte dont les concentrations sont déjà de l'ordre du pg/mg. Ainsi la plupart des études utilisent une étape de purification et de concentration préalable grâce à une colonne d'extraction en phase solide (SPE). Ces colonnes étant coûteuses, un premier essai consistait en l'utilisation de méthanol (2 mL) comme solution d'extraction. Un second essai a été réalisé en se basant sur la méthode de Kintz *et al.* (91) utilisant 2 mL d'eau désionisée comme solution d'extraction suivie d'une purification en phase solide.

Extraction

L'extraction consiste, pour les deux essais de solutions d'extraction, en l'utilisation d'ultrasons pendant 2 heures à température ambiante. L'extrait est ensuite centrifugé à 4000 g pendant 10 minutes à 4 °C et transféré dans un tube à essai.

Purification par extraction en phase solide

L'Oasis Max® est une colonne en phase mixte. L'utilisation d'une colonne SPE s'effectue en plusieurs étapes : le conditionnement, le dépôt de l'échantillon, le lavage et l'élution.

Ainsi, la colonne est d'abord conditionnée par 2 mL de méthanol puis 2 mL d'eau désionisée. L'échantillon est ensuite passé dans la colonne puis celle-ci est rincée par 2 mL d'eau contenant 5 % d'ammoniaque permettant l'élution des composés ionisables puis par 2 mL de méthanol permettant l'élution des composés neutres accrochés à la phase inverse. Après une étape de séchage, l'EtG est élué par 2 mL de méthanol contenant 2% d'acide formique.

Evaporation et transfert en vials

L'extrait ou l'éluat est évaporé sous un faible flux d'azote à 35 °C ou dans un évaporateur sous vide avant d'être reconstitué par 100 µL de phase mobile A et transféré dans un vial d'injection.

2.5.Phase analytique

2.5.1. Séparation chromatographique

La colonne chromatographie est une UPLC Selectra® ETG 100 x 2.1 mm x 1.8µm (UCT, Bristol, Angleterre). La phase A se compose d'eau désionisée contenant 0,1 % d'acide formique et la phase B de méthanol contenant 0,1% d'acide formique. Le débit est de 0,5 mL/min, la température de colonne est de 50 °C. Le gradient est le suivant : 0-2 min 100 % A ; 2-4 min 5 % A ; 4-6 min 100 % A. Le temps de rétention est de 1,5 min.

2.5.2. Infusion de l'EtG et l'EtG-D5

Les paramètres de la source et du spectromètre de masse sont identiques à ceux décrits précédemment dans le tableau 9 du chapitre « Infusion du PEth »

2.6.Validation

La validation de méthode n'a pas pu être terminée au moment de l'écriture de ce mémoire. Les résultats préliminaires privilégient l'extraction par l'eau désionisée avec purification par SPE. En effet, l'extraction par le méthanol ne permet pas une sensibilité suffisante pour obtenir un résultat quantitatif (en accord avec la norme ISO 15189 et le CoFrAc) à la valeur seuil d'interprétation de 5 pg/mg permettant de séparer une consommation régulière d'une abstinence.

1. Intérêt d'une méthode multi analyte

Dans le point « Bilan du point de vue du toxicologue-analyste » je réponds à la question « quels biomarqueurs sont nécessaires pour un laboratoire de toxicologie ? » en indiquant que les meilleures sensibilités et spécificités diagnostiques sont toujours obtenues par la combinaison de plusieurs marqueurs et, dans le cadre de l'éthanol, par la combinaison de marqueurs disposant de fenêtres de détections très différentes permettant une estimation plus fine des habitudes de consommations qu'elles soient récentes ou chroniques. C'est précisément l'objet de cette méthode analytique multi analytes. Elle permet de combiner dans une seule méthode analytique plusieurs biomarqueurs directs de la consommation aiguë et chronique d'alcool pour améliorer la sensibilité diagnostique de cet outil et de mieux percevoir les habitudes de consommations des patients. Outre cet aspect clinique, d'autres domaines d'applications bénéficient de l'addition de l'éthylglucuronide dans cette méthode : dans le périmètre médico-légal *post-mortem*, discriminer une formation *post-mortem* d'éthanol et une consommation *antemortem* d'alcool.

2. Mise en œuvre en routine du PEth et de l'EtG

La mise en œuvre en routine de cette méthode analytique a été entreprise en mars 2019 avec un engouement croissant (hors période COVID-19) des cliniciens (Figure 31).



Figure 31: Dosages mensuels sanguins cumulés de PEth de mars 2019 à mars 2022

La répartition des services prescripteurs a évolué au fil des communications et échanges avec les cliniciens (Figure 32). La demande initiale émanait des hépatologues et des transplantateurs ce qui explique leurs hautes prévalences en 2019 et en 2020. En 2021, le protocole clinique PETHOXICO, mené en collaboration avec le service d'addictologie, a montré l'intérêt de cette

méthode dans un contexte addictologique, ce qui explique probablement l'augmentation des prescriptions par ce service en 2021 et 2022. Enfin, l'ensemble des communications sur le PEth (cf.: Liste des travaux en lien avec la thèse) effectué principalement lors de congrès internationaux s'est traduit par l'augmentation régulière de prescriptions venant principalement de la France, mais également de Belgique (Figure 33).

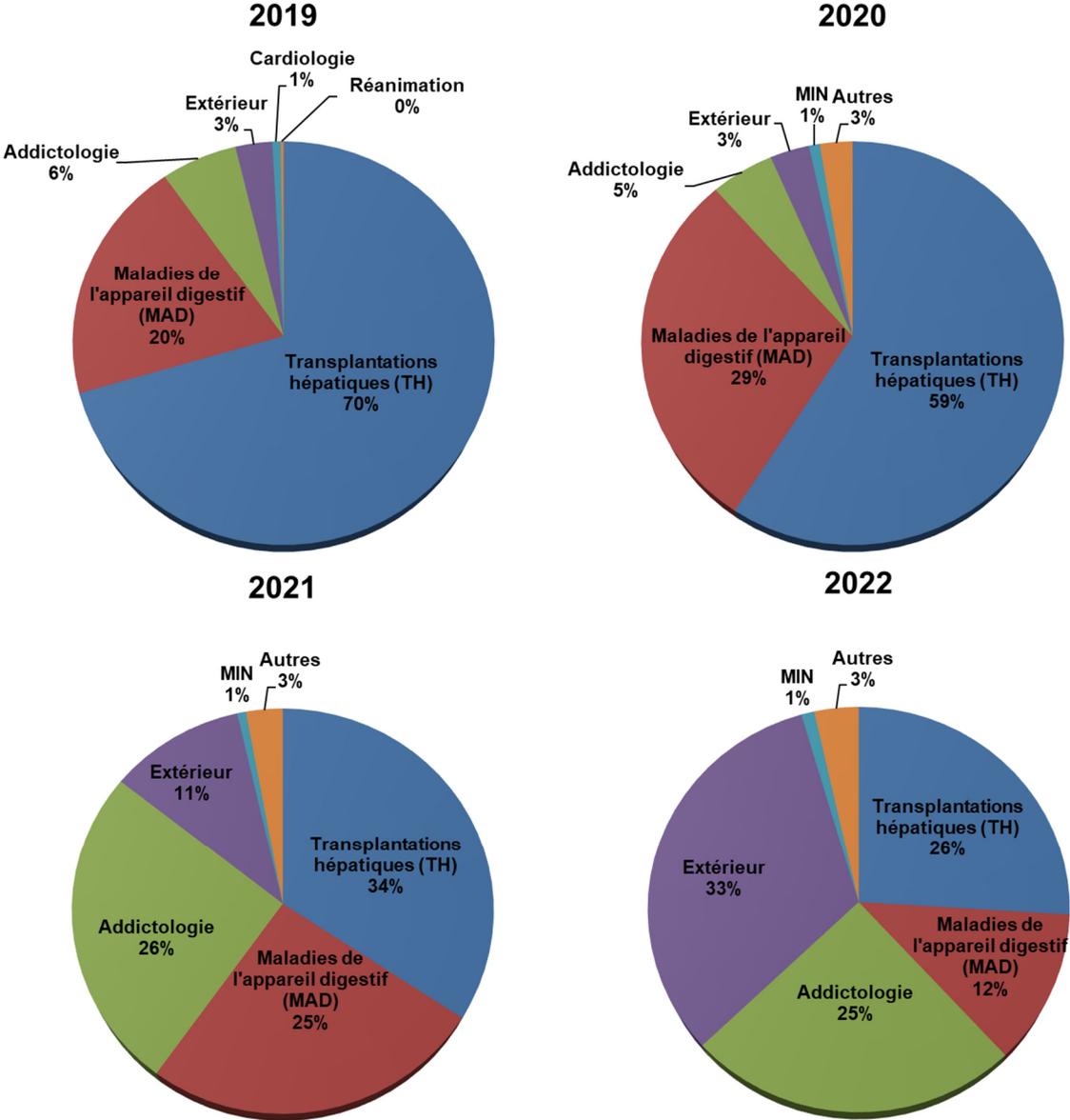


Figure 32: Evolution de la répartition des services prescripteurs de PEth. Effectifs : 554 prescriptions en 2019, 968 en 2020, 1455 en 2021 et 1727 en 2022

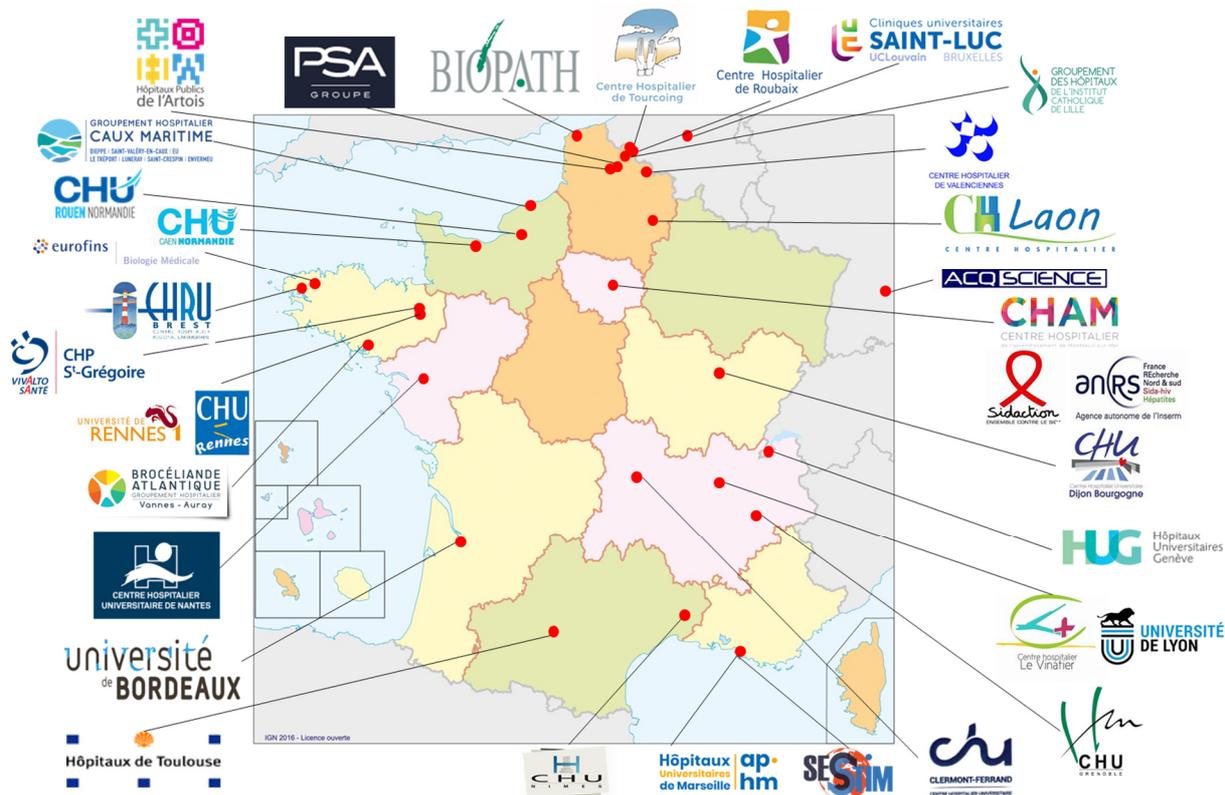


Figure 33 : Prescripteurs extérieurs envoyant leurs demandes de phosphatidyléthanol au CHU de Lille

2.1. Transplantation hépatique

Depuis la mise en place en routine de la méthode de dosage du phosphatidyléthanol, plus de 1300 dosages (au 01/04/2022) dans le cadre du suivi en pré ou post-transplantation hépatique ont été réalisés. Ces prescriptions comprennent également d'autres biomarqueurs de la consommation d'alcool : l'éthanolémie, l'éthylglucuronide urinaire ainsi que le la CDT. Une fraction de ces données a abouti à une publication dans le Journal of Hepatology (Communication 1) et une communication lors des journées de la Société Française d'Alcoologie de 2020 (Communication 2). Fort de cette expérience et afin de faire évoluer les recommandations françaises, notamment de la société européenne d'hépatologie (EASL), datant de 2018 et ne prenant pas en considération ce « nouveau » biomarqueur, probablement de par le manque de littérature disponible au moment de sa rédaction, une mini-revue retraçant les nouveaux biomarqueurs directs de la consommation d'alcool et leurs interprétations dans le cadre de la transplantation hépatique a été publiée dans le journal Hepato-Gastro & Oncologie Digestive (Article 3).

Communication 1

Usefulness of phosphatidylethanol and urinary ethyl glucuronide to monitor alcohol abstinence in patients awaiting liver transplantation

Menard O, **Hakim F**, Guenard C, Gaulier JM, Allorge D, Canva V, Lassailly G, Cotencin O, Louvet A, Mathurin P, Dharancy S

Journal of Hepatology 2020 vol. 73 | S123–S400

THU276 - Usefulness of phosphatidylethanol and urinary ethyl glucuronide to monitor alcohol abstinence in patients awaiting liver transplantation

Background and Aims: Alcohol-related liver disease (ALD) is one of the most common indications for liver transplantation (LT). A period of abstinence is widely required for being registered on the waiting list, and alcohol consumption is not allowed during the waiting time. New highly specific alcohol biomarkers such as blood phosphatidylethanol (Peth) and urine ethyl glucuronide (uEtG) have been developed recently. The aim of the present preliminary study is to assess and compare on 2 consecutive periods the rates of detection of alcohol relapse during waiting time with and without the use of the new biomarkers.

Method: Medical files for all patients registered for an LT in our institution from January 2016 to November 2019 were inspected for alcohol consumption detected either by systematic blood ethanol or patient's own declaration (period 1 from January 2016 to December 2018) or using systematic uEtG and Peth (period 2 from June to November 2019). Patients were systematically asked for alcohol consumption by the medical team.

Results: During the period 1, 365 patients have been registered on LT waiting list. ALD was the main etiology for 248 patients (67.9%). Alcohol consumption was detected in 12 patients (3.2%) by blood ethanol tests. Interestingly, 3 alcohol consumption was detected as the patients were hospitalized to undergo LT. During the period 2, 74 patients attended to the liver pre-transplantation unit, 52 (70.2%) of them suffering of ALD. All patients declared to be fully abstinent. Alcohol consumption was detected in 12 (16.2%) patients, cumulating 33 visits in the unit. All markers (Peth, uEtG and blood ethanol) were available for 31 of these visits. Peth was positive (>5 ng/ml) in 25/31 visits, uEtG (>500 ng/ml) in 16/31 and blood ethanol in 2/31 (both times at 0.06 g/l). Peth concentration ranged between 19 and 1135 ng/ ml, reflecting consumption between less than 14 g/day to more than 84 g/day. On 10 visits, Peth concentrations were above 326 ng/ml, potentially reflecting daily consumption of more than 50 g/day on the last 21 days. Interestingly, CDT was available in 17 of the 25 times Peth was positive (and 8 of the 10 times it was >326 ng/ml), and reflected alcohol consumption (rate >2.5%) in only 4 times, including 3/8 times when Peth detected heaving drinking.

Conclusion: Blood ethanol, medical examination and potentially CDT may be ineffective to detect alcohol consumption in patient waiting for LT, even in case of heavy drinking. New alcohol markers might represent an interesting tool to effectively monitor alcohol abstinence, and if need be, quickly provide addiction therapy to the patients who need it.

Communication 2

Nouveaux Biomarqueurs d'alcoolisation: une revolution en transplantation hépatique?

Menard O, **Hakim F**, Guenard C, Gaulier JM, Lassailly G, Canva V, Allorge D, Louvet A, Mathurin P, Dharancy S, Cotencin O

Les Journées de la SFA, Alcoologie, addictologie: nouvelles pratiques, nouveaux acteurs, nouveaux enjeux, 12 et 13 mars 2020

Nouveaux Biomarqueurs d'alcoolisation : une révolution en transplantation hépatique?

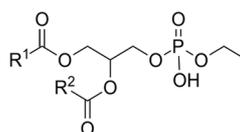
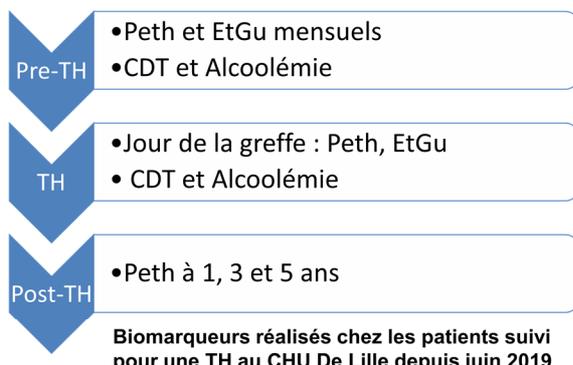
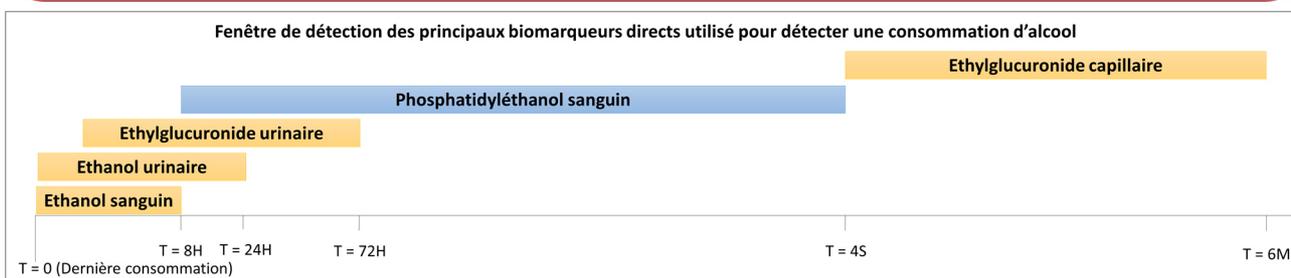
MENARD O¹, HAKIM F², GUENARD C¹, GAULIER JM², LASSAILLY G³, CANVA V³, ALLORGE D², LOUVET A³, MATHURIN P³, DHARANCY S³, COTTENCIN O¹

1. Service d'addictologie, CHRU de Lille, Lille

2. Service de toxicologie, CHRU de Lille, Lille

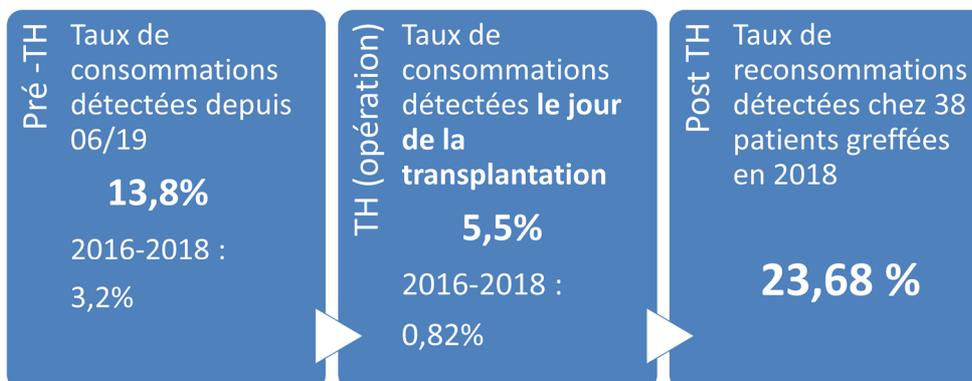
3. Service des maladies de l'appareil digestif, CHRU de Lille, Lille

La maladie alcoolique du foie est une des principales indications de transplantation hépatique en France. Une abstinence totale en alcool est requise pour être inscrit sur liste d'attente, puis en pré et post greffe. Une fois greffé, environ 20% des patients reprendraient un usage nocif en alcool, entraînant chez près d'un tiers d'entre eux une récurrence de cirrhose sur le greffon. Les dernières années ont vu le développement de nouveaux biomarqueurs d'alcoolisation, qui présentent des fenêtres de détection plus longues, permettant un meilleur repérage des consommations d'alcool. Depuis juin 2019, le CHRU de Lille a instauré de manière systématique l'utilisation du phosphatidylethanol (Peth) et de l'ethylglucuronide urinaire (EtGu) chez les patients en attente de transplantation hépatique et dans leur suivi post greffe.



Le Peth est un métabolite mineur de l'éthanol produit par la transphosphatidylation de phospholipides avec l'éthanol. Parmi plus de 40 homologues, le PETH 16:0/18:1 est le plus abondant.

Il possède une demi-vie longue (3 à 9 jours) et son dosage sanguin permet la détection d'une consommation d'éthanol au cours des 3 à 4 dernières semaines. Réputé instable in vitro dans le tube de sang, une fois le sang transféré sur un papier buvard (Dried Blood Spot ou DBS), le PETH est stable au minimum 6 mois à température ambiante.



En conclusion : Le Peth et l'EtGu sont deux nouveaux biomarqueurs d'alcoolisation offrant des fenêtres de détection plus étendues, ainsi que de meilleures sensibilités et spécificités que les marqueurs usuels. Leur utilisation dans le champ de la transplantation hépatique permet un meilleur repérage des patients présentant des consommations en alcool persistantes, et autorise ainsi une prise en charge addictologique plus précoce chez ces patients à haut risque.

Article 3

Les nouveaux biomarqueurs directs de consommation d'alcool

Dharancy S, Gaulier JM, Lemahieu V, Allorge D, **Hakim F**

Hépatogastro et Oncologie digestive **2022;28(1):54-60**. doi.org/10.1684/hpg.2022.2354

*New direct biomarkers
of alcohol
consumption*

Sébastien Dharancy¹
Jean Michel Gaulier²
Vincent Lemahieu³
Delphine Allorge²
Florian Hakim²

¹ Hôpital Huriez, CHU de Lille, Service des maladies de l'appareil digestif, Rue Michel Polonowski, 59000 Lille

² CHU de Lille, Unité fonctionnelle de toxicologie, 59000 Lille

³ Hôpital Fontan 2, CHU Lille, Service addictologie, 1 rue André Verhaeghe, 59037 Lille

@ Correspondance : S. Dharancy
sebastien.dharancy@chu-lille.fr

Les nouveaux biomarqueurs directs de consommation d'alcool

▼ Résumé

Le développement de tests objectifs pour caractériser le mode de consommation, quantifier la consommation quotidienne d'éthanol et détecter efficacement les troubles induits par l'alcool, est indispensable dans les domaines du traitement et de la recherche, mais également dans des périmètres judiciaires et médico-légaux. Les biomarqueurs indirects de consommation d'alcool sont liés à des modifications métaboliques et/ou biochimiques ; ils ne permettent pas d'estimation de l'importance de la consommation, présentent un temps de latence non négligeable et de nombreux facteurs confondants dans leur interprétation. Les marqueurs directs, en particulier, l'éthylglucuronide (EtG) et le phosphatidyléthanol (PEth) font l'objet d'un intérêt croissant en hépatologie, toxicologie et addictologie. La littérature est convaincante pour conclure que ce sont des biomarqueurs très sensibles et spécifiques de la consommation d'alcool et qu'ils offrent un panel large de fenêtres de détection. Ils doivent néanmoins être utilisés comme des catalyseurs de discussion avec le patient sur la problématique alcool.

• **Mots clés :** éthylglucuronide, phosphatidyléthanol, alcool, maladies du foie liées à l'alcool

▼ Abstract

The development of objective tests to characterize the mode of consumption, quantify the quantity of ethanol ingested daily and effectively detect disorders induced by alcohol is essential in the fields of treatment and research, but also in legal areas. Indirect biomarkers of alcohol consumption are linked to metabolic and/or biochemical modifications, do not allow assessing the extent of consumption, having a non-negligible latency time and many confounding factors in their interpretation. Direct markers, in particular, ethylglucuronide (EtG) and phosphatidylethanol (PEth) are the subject of growing interest in Hepatology, Toxicology and Addictology. The literature is convincing to conclude that they are very sensitive and specific biomarkers of alcohol consumption and that they offer a wide range of detection windows. They must nevertheless be used as catalysts for discussion with the patient on the alcohol problem.

• **Key words:** ethylglucuronide, phosphatidylethanol, alcohol, alcohol-related liver disease

Bien que le volume global d'alcool pur consommé en France soit en diminution depuis les années 1960 (11,7 litres par habitant de 15 ans et plus, en 2017) essentiellement en raison de la baisse de la consommation quotidienne de vin, la France demeure parmi les pays au monde les plus consommateurs d'alcool, se situant au sixième rang parmi les 34 pays de l'OCDE (1, 2). En termes de mortalité et de poids pour le système de santé : l'alcool, une des deux premières causes de mortalité évitable, était à l'origine de 41 000 décès et de 28 000 nouveaux cas de cancers en 2015 (3) ; il était au début des années 2010 la première cause d'hospitalisation ; son coût social a été chiffré de l'ordre de 120 milliards (4).

Le développement de tests objectifs pour caractériser le mode de consommation, mesurer la quantité quotidienne d'éthanol ingéré et détecter efficacement les troubles induits par l'alcool

est indispensable dans les domaines du traitement et de la recherche, mais également dans des périmètres judiciaires et médico-légaux. En effet, la difficulté d'évaluer les comportements de consommation d'alcool d'un point de vue objectif a conduit au cours des dernières décennies à une recherche intensive de biomarqueurs fiables de la consommation chronique et/ou excessive d'alcool. Ces marqueurs sont divisés en biomarqueurs directs et indirects.

Les biomarqueurs indirects détectent les conséquences des effets de l'alcool sur les cellules, les systèmes organiques et enzymatiques et/ou le métabolisme et comprennent des marqueurs d'effets toxiques liés à l'alcool, notamment le volume globulaire moyen (VGM), l'aspartate aminotransférase (ASAT), l'alanine amino transférase (ALAT), la gamma-glutamyltransférase (GGT) et la transferrine carboxy déficiente (CDT). Ces tests indirects souffrent d'une mauvaise sensibilité et spécificité ainsi que de très nombreuses causes d'interférence et de facteurs confondants dans leur analyse et interprétation comme le statut hépatologique (présence d'une cirrhose ou d'une autre maladie hépatique) et métabolique sous-jacent (obésité, diabète), les prises médicamenteuses et de diverses carences vitaminiques (tableau 1). En outre, ces biomarqueurs indirects liés à des modifications métaboliques et/ou biochimiques présentent un temps non négligeable de latence lorsque le statut du patient évolue : lenteur de normalisation lors d'une phase de sevrage, et lenteur d'augmentation en cas de rechute de consommation chez un patient sevré. De surcroît, ils ne permettent pas d'estimation de l'importance de la consommation.

TABLEAU 1 • Synthèse des caractéristiques des biomarqueurs indirects des consommations d'alcool.

Marqueurs indirects	Matrice	Sensibilité	Spécificité	Facteurs confondants
Gamma-glutamyltransférase (UI/L)	Sérum	42-86 %	40-84 %	Maladie hépatique, IMC, sexe, médicaments
Aspartate aminotransférase (UI/L)	Sérum	43-68 %	56-95 %	Maladies hépatiques et musculaires, IMC, médicaments
Alanine aminotransférase (UI/L)	Sérum	30-50 %	51-92 %	Maladie hépatique, IMC, médicaments
Volume globulaire moyen (fl)	Sérum	24-75 %	56-96 %	Carences en vitamine B12/acide folique, hémopathies
Transferrine carboxy déficiente (%)	Sérum	25 %-84 %	70 %-98 %	Maladie hépatique, nicotine, taux de transferrine, poids, sexe, grossesse

« Les tests indirects de consommation d'alcool souffrent d'une mauvaise sensibilité et spécificité »

Les marqueurs directs comprennent l'éthanol sanguin lui-même, ainsi que des dérivés d'alcool, tels que l'acétaldéhyde, l'acide acétique, les esters éthyliques d'acides gras, le sulfate d'éthyle, l'éthylglucuronide (EtG) et le phosphatidyléthanol (PEth). Ces deux derniers marqueurs font l'objet d'un intérêt croissant en hépatologie (suivi des maladies du foie liées à l'alcool, évaluation pré- et post-transplantation hépatique), toxicologie (procédures médico-légales) et addictologie (contrôle du sevrage) et seront développés dans cette mini-revue.

Le phosphatidyléthanol

Le PEth est un phospholipide anormal de la membrane cellulaire qui a été découvert pour la première fois chez les mammifères en 1983, détecté dans le cerveau, les reins, le foie, les muscles squelettiques et le cœur de rats exposés de manière chronique à l'éthanol. Le PEth est produit par la transphosphatidylation de phospholipides de la membrane cellulaire (principalement la phosphatidylcholine) rentrant en contact avec l'éthanol (figure 1). Cette réaction est catalysée par la phospholipase D (PLD) qui, en l'absence d'éthanol, hydrolyse la membrane des phospholipides en acide phosphatidique (PA). Contrairement aux autres cellules, les globules rouges ne possèdent pas la phosphatidylcholine phospholipase C qui catalyse la dégradation du PEth (5). En conséquence, le sang total constitue la matrice intéressante pour le dosage du PEth car celui-ci s'accumule dans les globules rouges. L'utilisation d'autres matrices, comme les cheveux, a été également envisagée. Mais aujourd'hui, ce dosage est réalisé dans le sang total ce qui présente des avantages de simplicité et disponibilité de prélèvement, de rapidité d'obtention du résultat et de coût. Par ailleurs, les méthodes d'analyse reposent sur l'utilisation de gouttes de sang séché sur papier buvard (DBS : Dried Blood Spots) qui présentent d'autres avantages (stockage à température ambiante, transport).

« Le sang total constitue la matrice la plus intéressante et pratique pour le dosage du phosphatidyléthanol »

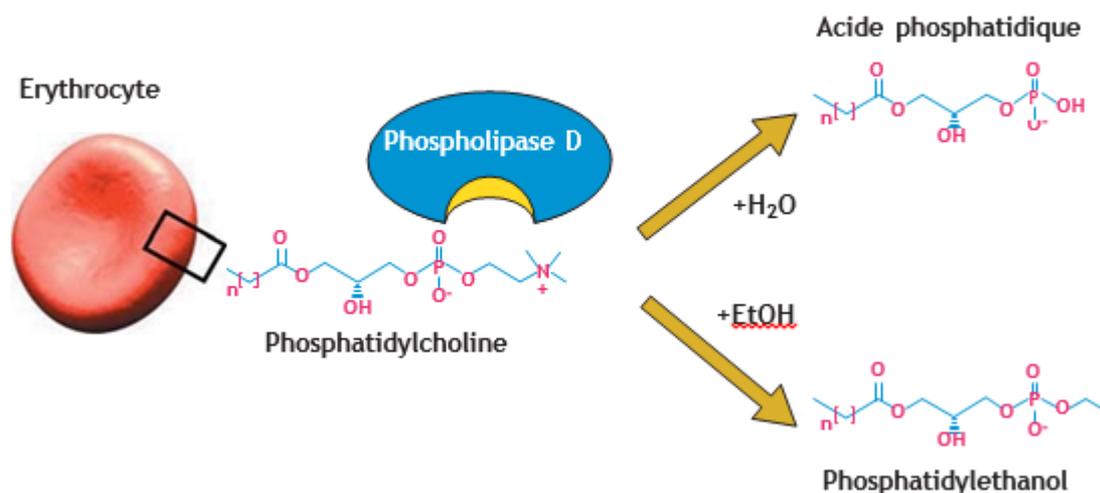


Figure 1 • Formation du phosphatidyléthanol.

Il existe au moins 50 homologues (ou isoformes) de PEth, qui diffèrent par leurs deux chaînes d'acide gras. Ceux qui sont trouvés en fortes concentrations dans le sang humain à la suite d'une exposition à l'éthanol sont les PEth 16:0/18:2, 18:1/18:1 et le 16:0/18:1 (6) qui est le plus abondant. Dans le cadre de la détection de la prise de boissons alcoolisées, en dehors de l'éthanolémie, le dosage du PEth 16:0/18:1 dans le sang est le biomarqueur le plus sensible et spécifique : une sensibilité de 86 % et une spécificité de 95-100 % sont rapportées.

« En dehors de l'éthanolémie, le dosage du plus sensible et spécifique »

Il a été observé que l'incubation in vitro de sang total humain avec de l'éthanol (EtOH) pendant 24h (concentration en EtOH variant entre 50 et 100 mM) induisait la formation de PEth, et que la concentration en EtOH et le temps d'incubation étaient directement proportionnels à la quantité de PEth produit. Un activateur de la protéine kinase C ajouté au mélange triple la quantité de PEth générée. Aucune corrélation entre les indices hématologiques (numération érythrocytaire, volume globulaire moyen, hématicrite) et le taux de formation de PEth n'avait été retrouvé (7). Après une consommation aiguë d'éthanol, le PEth16:0/18:1 est retrouvé progressivement dans le sang avec un temps d'atteinte de la concentration maximale de 90 à 120 minutes. Sa demi-vie d'élimination sanguine est longue (3 à 7 jours) et son dosage sanguin permet donc théoriquement sa détection pendant les 21 à 28 jours qui suivent la consommation d'EtOH.

« La demi vie d'élimination longue du phosphatidyléthanol permet une détection sanguine pendant 3 à 4 semaines »

Interprétation de la mesure du PEth dans le sang

Actuellement, l'analyse du PEth est principalement réalisée par les laboratoires de toxicologie à partir du sang total par technique de chromatographie liquide avec une détection par spectrométrie de masse en tandem.

En ce qui concerne l'interprétation du dosage sanguin du PEth, aucune valeur-seuil d'interprétation ne fait actuellement l'objet d'un consensus international. En revanche plusieurs études regroupées en une synthèse s'accordent sur 2 valeurs seuil discriminantes du type de consommation fixées à 20 et 200 µg/L pour interpréter les résultats (8):

- PEth < 20 µg/L : Consommation faible ou abstinence (<2 unités standards/Jour, plusieurs jours par semaine) ;
- entre 20 et 200 µg/L : consommation modérée (2 à 4 unités standards /Jour plusieurs jours par semaine) ;
- PEth > 200 µg/L : consommation excessive définie comme étant supérieure à 4 unités standards/Jour plusieurs jours par semaine.

Cependant, l'estimation d'une consommation d'alcool en fonction des concentrations sanguines en PEth doit tenir compte du fait que ce biomarqueur, au vu de sa demi-vie d'élimination sanguine longue, est cumulatif. Ainsi, la concentration sanguine va dépendre de plusieurs facteurs comme le moment de la dernière consommation, la fréquence de consommation, la quantité ingérée et la variabilité interindividuelle (métabolisme). Ces éléments expliquent fort probablement la diversité des études et des propositions de valeurs seuils dans la littérature (8). En revanche les concentrations sanguines en PEth ne semblent pas être influencées par l'âge, l'indice de masse corporelle, le sexe, une maladie rénale ou une maladie du foie ce que rend ce marqueur particulièrement intéressant pour les études exploratoires et la pratique quotidienne.

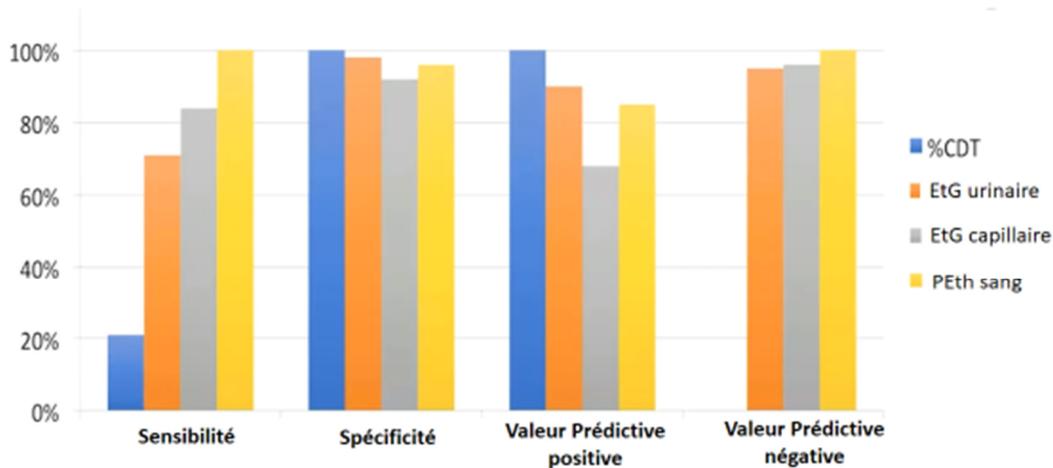


Figure 2 • Comparaison des performances des différents biomarqueurs (d'après (9)).

« Les concentrations sanguines en phosphatidyléthanol ne semblent pas être influencées par l'âge, l'indice de masse corporelle, le sexe, une maladie rénale ou une maladie du foie »

Principales études cliniques

Plusieurs études ont été publiées ces dernières années sur l'intérêt diagnostique du PEth en particulier dans un contexte pré et post-transplantation hépatique (TH). Dans l'étude de Andresen-Streichert H et al, sa valeur diagnostique a été analysée chez 51 patients pré-TH et 61 patients post-TH, comparée aux mesures de l'éthanolémie, de la méthanolémie, de la CDT et de l'EtG dans l'urine et les cheveux et comparés à des questionnaires déclaratifs sur la consommation en alcool (9). Vingt-huit (25%) patients ont été testés positifs pour au moins un biomarqueur. Le PEth seul a identifié une consommation d'alcool chez 18% des patients. En ce qui concerne la détection de la consommation d'alcool au cours de la semaine précédente, le PEth avait une sensibilité de 100 %. La spécificité de tous les marqueurs était de 92 % ou plus (figure 2). L'étude très récente de Selim R et al. a évalué les conséquences de la recherche du PEth sur le processus de TH en termes d'arrêt de l'évaluation et de sortie de liste d'attente en raison d'une poursuite de consommation d'alcool (10). Les auteurs ont comparé une période avant l'utilisation du PEth en 2017 (n= 157 candidats à al TH) à une période au cours de laquelle le PEth était recherché en 2019 (n=210 candidats). Les patients évalués au cours de la 'période PEth' étaient presque trois fois plus susceptibles de sortir de liste pour consommation d'alcool que ceux de la période pré-PEth (HR = 2,86 ; 95 % IC1,67–4,97).

L'étude de Stewart SH et al a inclus 222 patients atteints d'hépatopathie de toutes origines (11). En utilisant le seuil de 20 ng/ml, l'aire sous la courbe ROC pour déterminer toute consommation d'alcool était de 0,87 (intervalle de confiance à 95 % 0,83 à 0,91) et de 0,89 (IC à 95 % 0,85 à 0,94) pour une consommation moyenne de 4 unités standards ou plus par jour. Chez les sujets ayant un PEth quantifiable, la relation entre la concentration du PEth et la consommation d'alcool ne dépendait pas du sexe, de l'âge ou de la gravité de la maladie hépatique. Plus récemment, Hahn JA et al. ont analysé plus de 4000 observations de patients ayant un score positif au test 'Alcohol Use Disorders Identification Test—Consumption' (AUDIT-C) issues de 21 études, couvrant quatre continents pour mener la plus grande analyse

à ce jour des facteurs démographiques et biologiques qui ont un impact sur la sensibilité du PEth. Quatre-vingt-deux pour cent % des observations étaient positives à la détection du PEth. Dans les analyses globales ajustées en fonction du niveau de consommation d'alcool autodéclaré, il n'était d'associations entre le sexe, l'âge, la race/l'origine ethnique et la méthode de prélèvement sanguin avec la sensibilité du PEth. Comme prévu, la sensibilité à la PEth augmentait avec le niveau de consommation d'alcool auto-déclarée (12).

L'éthylglucuronide (EtG)

Une petite quantité (< 0,5 %) d'alcool ingérée est métabolisée dans le foie par un système minoritaire non oxydatif constitué par l'uridine diphosphoglucuronate-glucuronosyltransférase (UGT) et l'uridine diphosphoglucuronate-sulfotransférase, produisant de l'éthylglucuronide (EtG) et du sulfate d'éthyle (EtS). Les deux sont excrétés dans l'urine, mais se retrouvent également dans le sang et les cheveux. En raison d'une élimination plus lente de ces métabolites que celle de l'éthanol, l'EtG est retrouvé dans les fluides biologiques alors que l'alcool a lui-même disparu de l'organisme, ce qui en fait de bons marqueurs d'une consommation ancienne d'alcool (13). Selon le niveau de consommation d'alcool, l'EtG reste dans l'urine jusqu'à 80 heures. L'UGP est sujette à un polymorphisme génétique pouvant influencer le profil de production de l'EtG selon les individus (14). De plus, une étude a mis en évidence que la biotransformation de l'éthanol en EtG par les UGT était sous l'influence des composants nutritionnels contenant des flavonoïdes (15). Même si ce biomarqueur est considéré comme spécifique et sensible, le niveau de corrélation avec l'aspect quantitative de la consommation en alcool est moins performant que celle du PEth en raison de nombreuses causes d'interférence et de facteurs confondants dans l'interprétation des résultats (cf infra).

« L'éthylglucuronide est détectable dans les urines pendant 2 à 3 jours »

Interprétation de la mesure de l'EtG dans les urines

Comme pour le PEth, aucune valeur-seuil d'interprétation ne fait actuellement l'objet d'un consensus international pour le dosage de l'EtG urinaire. En revanche 2 valeurs seuil sont couramment retenues à 100 et 500 µg/L pour interpréter les résultats (13):

- EtG < 100 µg/L : En faveur d'une abstinence au cours des 48 dernières heures ;
- Une concentration entre 100 et 500 µg/L est difficilement interprétable car pouvant refléter une consommation d'éthanol par une consommation en alcool, par l'alimentation ou par les produits d'hygiène buccale ;
- PEth > 500 µg/L : En faveur d'une consommation d'alcool au cours des 48 dernières heures.

Précautions de l'interprétation des résultats

Plusieurs situations et paramètres sont à prendre en considération pour interpréter les résultats. L'EtG est relativement stable *in vitro* lorsque les échantillons sont stockés réfrigérés. Cependant, il peut y avoir production d'EtG au cours de la conservation de l'échantillon ou *en post-mortem*, notamment par fermentation. Ainsi, chez les diabétiques présentant une glucosurie, la fermentation du sucre du tractus urinaire en présence de *Candida*

albicans produit de l'éthanol, conduisant à la possibilité de détecter ses marqueurs dans les urines. Dans d'autres situations, à l'inverse, l'EtG est sujette à l'hydrolyse bactérienne notamment dans les urines contaminées par *E. coli* ou *Clostridium sordellii* lors d'infections urinaires, ce qui conduit à une diminution de concentration (16). Il convient donc d'interpréter les résultats d'EtG en connaissant les risques de faux positifs ou faux négatifs dus à une contamination ou à un sepsis urinaire fréquent chez les patients cirrhotiques ou à la mauvaise conservation de l'échantillon.

Un autre facteur à prendre en considération lors de l'interprétation des résultats concerne l'insuffisance rénale qui entraîne un défaut d'élimination urinaire de ces métabolites hydrophiles et par conséquent qui conduisent à des concentrations élevées laissant suspecter une consommation plus récente d'alcool ou plus importante que la réalité (17). Inversement des concentrations plus faibles ou des faux négatifs sont possibles par la dilution des urines intentionnellement ou par un traitement diurétique souvent utilisé au cours de la cirrhose décompensée.

Enfin, il existe un risque de voir apparaître des échantillons positifs ne relevant pas d'une consommation d'alcool, notamment lors de l'utilisation de bain de bouche, de médicaments contenant de l'éthanol ou de solution hydro-alcoolique pour la désinfection des mains. Ceci peut conduire à la production d'une faible teneur d'EtG susceptible d'être retrouvée dans les urines.

« Un sepsis urinaire et les diurétiques sont responsables de résultats faussement négatifs »

« Certains médicaments et produits d'hygiène sont responsables de résultats faussement positifs »

La principale étude clinique sur ce biomarqueur direct a été publiée par Stauffer K et al (18). Dans cette étude, EtG urinaire a été évalué de manière prospective comme un nouvel outil de dépistage pour la détection de l'alcool dans le cadre de la TH. Un total de 141 patient, 75% transplantés hépatique et 25% candidat à une TH ont été inclus. À chaque visite, les marqueurs indirects (CDT, VGM, GGT, ASAT, ALAT), l'éthanolémie, la méthanolémie et l'EtG urinaire ont été recherchés, puis comparés aux auto-déclarations des patients sur la consommation d'alcool. L'EtG urinaire augmentait significativement le taux de détection de la consommation d'alcool, par rapport aux autres marqueurs d'alcool ($P < 0,001$). Chez 93 % des patients et à 92,5 % des visites avec marqueurs alcool positifs, la consommation d'alcool a été détectée par l'EtG et/ou CDT. La sensibilité et la spécificité de EtG étaient de 89,3 % et 98,9 % et de CDT étaient de 25 % et 98,6 %, respectivement. L'EtG urinaire était le meilleur prédicteur indépendant de la consommation d'alcool en analyse univariée et multivariée (valeur prédictive positive : 89,3 % ; valeur prédictive négative : 98,9 % ; odds ratio : 761,1 ; $P < 0,001$). Les auteurs concluaient que l'EtG urinaire était un marqueur sensible, spécifique et fiable pour la détection de la consommation récente d'alcool avant et après TH.

Que recommandent les sociétés savantes ?

La société européenne d'Hépatologie EASL a émis des recommandations en 2018 qui étaient antérieures à de nombreuses études publiées sur l'intérêt du PEth (19). Elle recommandait simplement que l'abstinence pouvait être contrôlée avec précision par mesure de l'EtG dans l'urine ou les cheveux (garde A2). Les recommandations de la société américaine AASLD publiées en 2019 ont intégrés les données sur le PEth sanguin. Ainsi elle statuait que les biomarqueurs directs de la consommation d'alcool pouvaient être utilisés pour le diagnostic des maladies du foie liées à l'alcool et leur prise en charge. Les dosages de l'EtG dans l'urine et les cheveux, du sulfate d'éthyle urinaire et du PEth étaient à privilégier car non affectés par la présence d'une maladie du foie (20).

« Les sociétés savantes d'Hépatologie commencent à recommander l'utilisation des biomarqueurs directs au cours de la prise en charge des maladies du foie liées à l'alcool »

Conclusion

Les biomarqueurs directs de consommation d'alcool qui offrent un panel large de fenêtres de détection (figure 3) constituent une avancée majeure dans la prise en charge des patients atteints de maladies du foie liées à l'alcool ainsi que les autres maladies liées à cette consommation. La littérature est convaincante pour conclure que le PEth et l'EtG sont des biomarqueurs très sensibles et spécifiques de la consommation d'alcool. Ils doivent néanmoins être utilisés comme des catalyseurs de discussion avec le patient sur la problématique alcool, plutôt que comme des outils et stratagèmes pour « attraper » ou « punir » les patients. Ils ne doivent pas être utilisés seuls pour confirmer ou infirmer la consommation d'alcool, mais doivent être combinés et triangulés avec d'autres tests de laboratoire (y compris d'autres biomarqueurs de l'alcool), l'examen et l'entretien clinique et une évaluation addictologique.

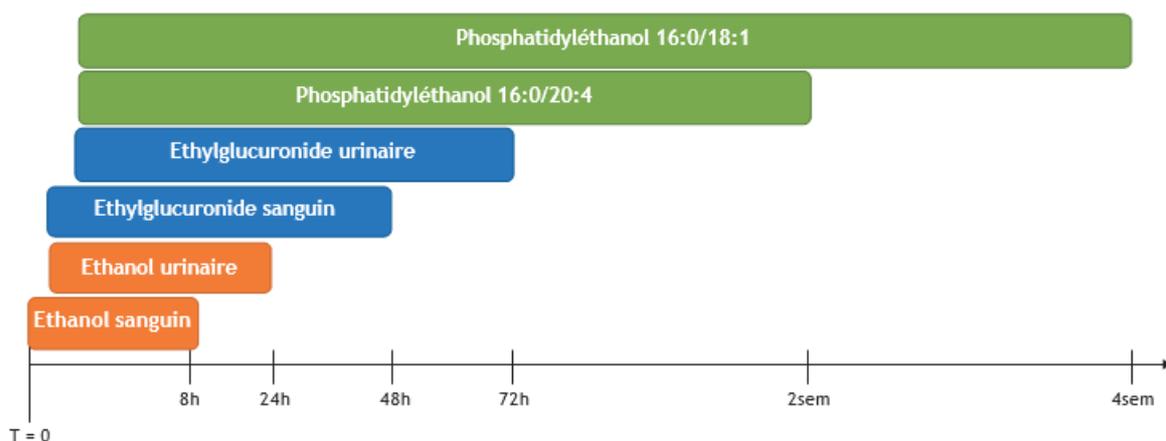


Figure 3 • Fenêtres de détection des principaux biomarqueurs directs utilisés pour détecter une consommation aiguë d'alcool.

Take Home messages

- Les biomarqueurs directs de consommation d'alcool sont des aides utiles à la détection de consommations non déclarées.
- Le phosphatidyléthanol est un marqueur direct, spécifique et proportionnel à la consommation en alcool qui détecte une consommation avec un recul de trois à quatre semaines.
- L'éthylglucuronide urinaire détecte une consommation avec un recul de deux à trois jours, mais certaines conditions génèrent des faux positifs et négatifs.
- Les nouveaux biomarqueurs directs de consommation d'alcool doivent être considérés comme des catalyseurs de discussion avec le patient autour de la problématique alcool..
- L'utilisation des biomarqueurs directs commence à être recommandée au cours des maladies du foie liées à l'alcool par les sociétés savantes d'hépatologie.

Références

1. Besson D. Boissons alcoolisées : 40 ans de baisse de consommation. Insee Première 2004 ; 966 : 1-4. <https://www.epsilon.insee.fr/jspui/bitstream/1/309/1/ip966.pdf>.
2. World Health Organization. Global status report on alcohol and health, 2018.
3. Shield KD, Marant Micalef C, Hill C, et al. New cancer cases in France in 2015 attributable to different levels of alcohol consumption. *Addiction* 2018 ; 113 : 247-56.
4. Kopp P. Le coût social des drogues en France. Saint-Denis : OFDT ; p. 75 p.
5. **Hakim F, Wiart JF, Ménard O, Allorge D, Gaulier JM. Dosage sanguin du phosphatidyléthanol. *Ann Biol Clin* 2019 ; 77 : 638-44.**
6. Viel G, Boscolo-Berto R, Cecchetto G, Fais P, Nalesso A, Ferrara SD. Phosphatidylethanol in blood as a marker of chronic alcohol use: a systematic review and meta-analysis. *Int J Mol Sci* 2012 ; 13 : 14788-812.
7. Aradottir S, Asanovska G, Gjerss S, Hansson P, Alling C. Phosphatidylethanol (PEth) concentrations in blood are correlated to reported alcohol intake in alcohol-dependent patients. *Alcohol Alcohol* 2006 ; 41 : 431-7.
8. **Ullwelling W, Smith K. The PEth blood test in the security environment what it is; why it is important; and interpretative guidelines. *J Forensic Sci* 2018 ; 63 : 1634-40.**
9. **Andresen-Streichert H, Beres Y, Weinmann W, et al. Improved detection of alcohol consumption using the novel marker phosphatidylethanol in the transplant setting: results of a prospective study. *Transpl Int* 2017 ; 30 : 611-20.**
10. Selim R, Zhou Y, Rupp LB, et al. Availability of PEth testing is associated with reduced eligibility for liver transplant among patients with alcohol-related liver disease. *Clin Transplant* 2022 ; 18 : e14595.
11. Stewart SH, Koch DG, Willner IR, Anton RF, Reuben A. Validation of blood phosphatidylethanol as an alcohol consumption biomarker in patients with chronic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2014 ; 38 : 1706-11.
12. **Hahn JA, Murnane PM, Vittinghoff E, et al. Factors associated with phosphatidylethanol (PEth) sensitivity for detecting unhealthy alcohol use: An individual patient data meta-analysis. *Alcohol Clin Exp Res* 2021 ; 45 : 1166-87.**
13. Gicquel T, Lepage S, Morel I. Éthylglucuronide et éthylsulfate, marqueurs biologiques de la consommation d'alcool. *Rev Francoph Lab* 2016 ; 2016 : 69-74.
14. 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 : 270-4.
15. Schwab N, Skopp G. Identification and preliminary characterization of UDP-glucuronosyltransferases catalyzing formation of ethyl glucuronide. *Anal Bioanal Chem* 2014 ; 406 : 2325-32.
16. Helander A, Dahl H. Urinary tract infection; a risk for false-negative urinary ethyl glucuronide but not ethyl sulfate in the detection of recent alcohol consumption. *Clin Chem* 2005;51:1728-1730.
17. Høiseth G, Nordal K, Pettersen E, Mørland J. Prolonged urinary detection times of EtG and EtS in patients with decreased renal function. *Alcohol Clin Exp Res* 2012;36:1148-51.
18. **Stauffer K, Andresen H, Vettorazzi E, Tobias N, Nashan B, Sterneck M. Urinary ethyl glucuronide as a novel screening tool in patients pre- and post-liver transplantation improves detection of alcohol consumption. *Hepatology* 2011 ; 54 : 1640-9.**

19. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of alcohol-related liver disease. *J Hepatol* 2018;69:154-81.
20. Crabb DW, Im GY, Szabo G, et al. Diagnosis and treatment of alcohol-associated liver diseases: 2019 practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2019 ; 71 : 306-33.

2.2. Addictologie

Depuis la mise en place en routine de la méthode de dosage du phosphatidyléthanol, plus de 500 dosages (au 01/04/2022) dans le cadre du suivi de sevrage et du dépistage des rechutes de consommation d'alcool ont été réalisés (Communication 3 et 4). L'utilisation de cette méthode de dosage pour le suivi de sevrage hospitalier a fait l'objet d'une étude clinique (PETHOXICO) qui sera détaillée ultérieurement dans ce manuscrit.

Communication 3

Dosage sanguin du phosphatidyléthanol 16:0/18:1, un outil d'évaluation de la consommation de boissons alcoolisées : intérêts et retour d'expérience de sa mise en œuvre en pratique

Hakim F, Ménard O, Wiart JF, Van Der Henst L, Richeval C, Allorge D, Gaulier JM

Toxicologie Analytique & Clinique 2021;33(1):37-38. doi : **10.1016/j.toxac.2020.10.079**

Dosage sanguin du phosphatidyléthanol 16:0/18:1, un outil d'évaluation de la consommation de boissons alcoolisées : mise en œuvre, retour d'expérience et intérêt clinique

F. Hakim^{1,2*}, O. Ménard³, J.-F. Wiart¹, L. Van Der Henst¹, C. Richeval^{1,2}, D. Allorge^{1,2}, J.-M. Gaulier^{1,2}

¹Unité Fonctionnelle de Toxicologie, CHU Lille, Lille, France

²EA 4483 – IMPECS, Univ. Lille, Lille, France

³Unité d'addictologie de liaison, CHU Lille, Lille, France

*Auteur correspondant

Email: florian.hakim@chru-lille.fr

Objectif : Présenter l'intérêt du dosage sanguin du phosphatidyléthanol 16:0/18:1 (PEth) et illustrer sa mise en œuvre en toxicologie biologique de routine.

Méthodes : Une revue bibliographique exhaustive concernant les aspects techniques et cliniques du PEth a été réalisée. A son issue, nous avons développé et validé une méthode de dosage du PEth qui repose sur un prélèvement sanguin sur tube citraté, le dépôt de 10 µL de sang total sur un papier buvard, une étape d'extraction avec utilisation d'un étalon interne deutéré (PEth-D5) et une analyse par chromatographie liquide avec détection par spectrométrie de masse en tandem. Cette méthode est accréditée par le CoFrAc selon la norme NF EN ISO 15189 en portée B et permet l'identification et la quantification du PEth entre 5 µg/L et 1000 µg/L.

Résultats : Entre 1975 et le 28/01/2020, 697 publications mentionnant le PEth dans le titre ou l'abstract sont recensées dans PubMed. Le PEth est un métabolite mineur de l'éthanol produit par la transphosphatidyléation de phospholipides (principalement la phosphatidylcholine) avec l'éthanol. Il existe plus de 40 homologues du phosphatidylethanol, qui diffèrent par leurs deux chaînes d'acide gras. Le plus abondant dans le sang humain, à la suite d'une consommation de boissons alcoolisées, est le PEth qui représente environ 40 % de l'ensemble des formes de phosphatidyléthanol. Le PEth possède une demi-vie longue (3 à 9 jours) et son dosage sanguin permet la détection d'une consommation d'éthanol au cours des 3 à 4 dernières semaines. Réputé instable *in vitro* dans le tube de sang, une fois le sang transféré sur un papier buvard (Dried Blood Spot ou DBS), le PEth est stable au minimum 6 mois à température ambiante. Concernant l'interprétation, aucune valeur de concentration seuil ne fait actuellement l'objet d'un consensus international. Mais plusieurs études s'accordent sur une concentration sanguine de PEth de (1) 210 µg/L au-delà de laquelle se situent les « consommateurs excessifs », et de (2) 20 µg/L au-delà de laquelle se situent les consommateurs modérés : ces seuils sont ceux actuellement utilisés au CHU de Lille. Effectivement ce dosage est mis en œuvre en routine depuis mars 2019 avec comme principaux prescripteurs les services d'addictologie, d'hépatologie et de transplantation hépatique (561 demandes au total en 2019).

Discussion : En addictologie, cette prescription intervient dans le cadre d'une prise en charge de troubles liés à l'usage de l'alcool : le PEth est aujourd'hui intégré dans les soins courants du suivi de sevrage et au dépistage de rechute. En transplantation hépatique, le dosage du PEth associé à l'éthylglucuronide urinaire constitue un élément essentiel pour l'inscription (et le maintien) sur les listes de receveurs, mais également pour le suivi en post-greffe [1].

Conclusion : Le PEth est un biomarqueur sensible et spécifique qui s'insère aujourd'hui parmi les biomarqueurs d'alcoolisation en répondant à la question d'une consommation au cours des derniers jours ou semaines (prélèvements sanguins à distance des faits, respect d'une abstinence, ...). Mais du fait de son aspect cumulatif, c'est également un biomarqueur quantitatif d'alcoolisation chronique, utile pour le dépistage des rechutes après sevrage, et surtout dans le suivi et la surveillance du sevrage en raison de sa cinétique de décroissance immédiate [2].

Références :

[1] Andresen-Streichert H et al. Alcohol Biomarkers in Clinical and Forensic Contexts. *Dtsch Arztebl Int.* 2018, (115) : 309–315.

[2] Hakim F et al.. Phosphatidylethanol blood analysis. Dosage sanguin du phosphatidyléthanol. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2019, (77) : 638–644.

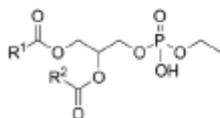
Conflit d'intérêts : aucun

DOSAGE SANGUIN DU PHOSPHATIDYLÉTHANOL 16:0/18:1 UN OUTIL D'ÉVALUATION DE LA CONSOMMATION DE BOISSONS ALCOOLISÉES MISE EN ŒUVRE, RETOUR D'EXPÉRIENCE ET INTÉRÊT CLINIQUE

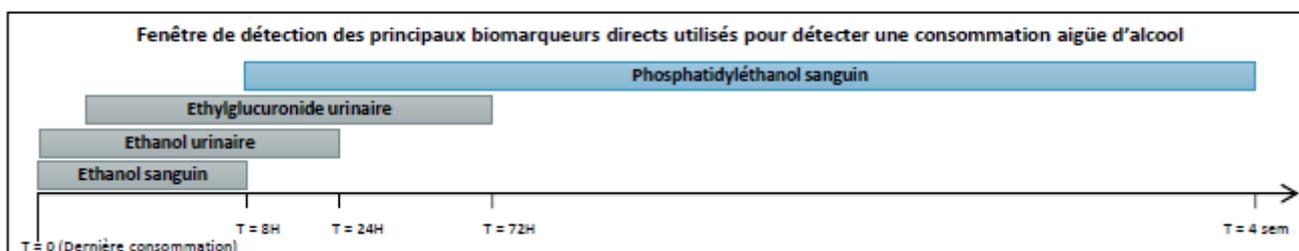
F. Hakim^{1,2}, O. Ménard³, J.-F. Wiart¹, L. Van Der Henst¹, C. Richeval^{1,2}, D. Allorge^{1,2}, J.-M. Gaulier^{1,2}

1. CHU Lille, Unité Fonctionnelle de Toxicologie, F-59000 Lille, France; 2. Univ. Lille, ULR 4483 - IMPECS - IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine, F-59000 Lille, France; 3. Unité d'addictologie de l'Alson, CHU Lille, Lille, France

LE PHOSPHATIDYLÉTHANOL (PETh)

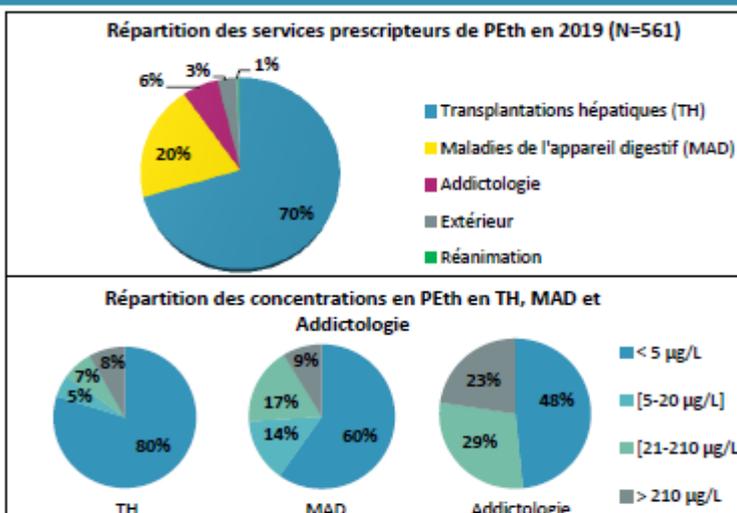
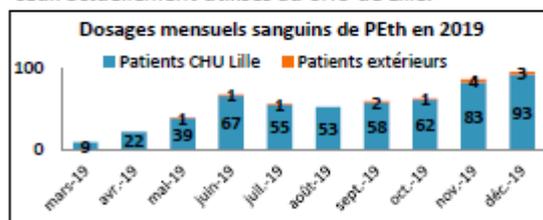


Le PEth est un métabolite mineur de l'éthanol produit par transphosphatidylation de phospholipides avec l'éthanol. Parmi plus de 40 homologues, le PEth 16:0/18:1 est le plus abondant. Il possède une demi-vie longue (3 à 9 jours) et son dosage sanguin permet la détection d'une consommation d'éthanol au cours des 3 à 4 dernières semaines. Réputé instable *in vitro* dans le tube de sang, une fois le sang transféré sur un papier buvard (Dried Blood Spot ou DBS), le PEth est stable au minimum 6 mois à température ambiante.



MISE EN ŒUVRE – RETOUR D'EXPÉRIENCE

Ce dosage est mis en œuvre en routine depuis mars 2019 avec une méthode accréditée selon la norme NF EN ISO 15189 en portée B. Elle permet l'identification et la quantification du PEth entre 5 et 1000 µg/L. Plusieurs études s'accordent sur une concentration sanguine de PEth de (1) 210 µg/L au-delà de laquelle se situent les « consommateurs excessifs », et de (2) 20 µg/L au-delà de laquelle se situent les consommateurs modérés : ces seuils sont ceux actuellement utilisés au CHU de Lille.



INTERET CLINIQUE

- **Addictologie** : le dosage du PEth est aujourd'hui intégré dans les soins courants du suivi de sevrage et au dépistage de rechute.
- **Transplantation hépatique (TH)**: avec une sensibilité et une spécificité supérieure à la CDT, le dosage du PEth, associé à l'EtGu, a permis une nette augmentation des taux de consommations détectées depuis sa mise en place (de 3,2% à 13,8% en suivie pré-TH et de 0,82% à 5,5% le jour de la TH) [1]. Il constitue un élément essentiel pour l'inscription (et le maintien) sur les listes de receveurs, mais également pour le suivi en post-greffe [2].

En conclusion, le PEth est un biomarqueur sensible et spécifique qui s'insère aujourd'hui parmi les biomarqueurs d'alcoolisation en répondant à la question d'une consommation au cours des derniers jours ou semaines (prélèvements sanguins à distance des faits, respect d'une abstinence...). Mais du fait de son aspect cumulatif, c'est également un biomarqueur quantitatif d'alcoolisation chronique, utile pour le dépistage des rechutes après sevrage, et surtout dans le suivi et la surveillance du sevrage en raison de sa cinétique de décroissance immédiate [3].

Bibliographie:
 [1] Ménard O et al. (2020, mars). Nouveaux Biomarqueurs d'alcoolisation : une révolution en transplantation hépatique?. Poster présenté à «Les journées de la SFA, conférence », Paris, France
 [2] Andresen-Streichert H et al. Alcohol Biomarkers in Clinical and Forensic Contexts. Dtsch Arztebl Int. 2018, (115) : 309-315.
 [3] Hakim F et al. Phosphatidylethanol blood analysis. Dosage sanguin du phosphatidylethanol. Ann Biol Clin (Paris). 2019, (77) : 638-644.



Communication 4

Aspects techniques, pratiques et diagnostiques de la mise en œuvre en routine d'une méthode de dosage sanguin du phosphatidyléthanol 16:0/18:1

Hakim F, Wiart JF, Van Der Henst L, Tartar O, Bordat R, Richeval C, Ménard O, Allorge D, Gaulier JM

Toxicologie Analytique & Clinique 2020;32(4):s22. Doi : 10.1016/j.toxac.2020.09.049

Aspects techniques, pratiques et diagnostiques de la mise en œuvre en routine d'une méthode de dosage sanguin du phosphatidyléthanol 16:0/18:1

F. Hakim^{1,2*}, J.-F. Wiart¹, L. Van Der Henst¹, O. Tartar¹, R. Bordat¹, C. Richeval^{1,2}, O Ménard³, D. Allorge^{1,2}, J.-M. Gaulier^{1,2}

¹CHU Lille, Unité Fonctionnelle de Toxicologie, Lille, France

²Univ. Lille, EA 4483 – IMPECS, Lille, France

³CHU Lille, Unité d'addictologie de liaison, Lille, France

*Corresponding author

Adresse email : florian.hakim@chru-lille.fr

Objectif : Présenter les aspects techniques et pratiques d'une méthode de dosage sanguin du phosphatidyléthanol 16:0/18:1 (PEth) par CL-SM/SM et illustrer sa mise en œuvre en toxicologie biologique de routine.

Méthodes : Les prélèvements sanguins consistent en des tubes citratés* ou des Dried Blood Spots (DBS) obtenus par un dispositif volumétrique de prélèvement capillaire tel que l'Hémaxis. *Dans ce cas, 10 µL de sang total sont « spotés » sur buvard à réception au laboratoire. Après séchage et poinçonnage, l'intégralité du spot est extraite 60 min à température ambiante par une solution méthanolique de PEth-D5. La séparation (Tr: 3,81 min, run: 13 min) est réalisée dans une colonne C18 (KinetexTM, 2,6 µm, 50 x 2,1 mm, Phénomenex, France) et la détection (TQS, Waters, France), après ionisation par électrospray en mode négatif, est réalisée en mode MRM sur les transitions suivantes (m/z quantification) : PEth 701,5 → 281,2 et 701,5 → 255,2 ; PEth-D5 706,5 → 281,2 et 706,5 → 255,2. Des contrôles de qualité internes commerciaux (à 40, 85 et 300 µg/L, AcQ Science, Allemagne) sont disponibles et, dans le cadre de la validation de cette méthode, des échanges interlaboratoires et des contrôles de qualité externes internationaux (Equalis, Suède) ont été utilisés. Les seuils d'interprétation ont été prédéfinis sur une base bibliographique et confortés par les résultats d'une préétude chez des patients d'addictologie.

Résultats : La stabilité in vitro du PEth a été vérifiée dans les tubes citratés (n=28 ; 15 j à +4°C) et sur DBS (n=20 ; 6 mois à T° ambiante). Cette méthode de dosage permet ainsi l'identification et la quantification du PEth avec une limite de quantification et de détection de 5 µg/L et une limite de linéarité haute de 1000 µg/L. Les CV interséries sont inférieurs à 12 % sur l'ensemble du domaine de mesure et les tests de contamination interéchantillons sont inférieurs à 0,6 %. Cette méthode est accréditée selon la norme NF EN ISO 15189 en portée B. Concernant l'interprétation, aucune valeur seuil d'interprétation ne fait actuellement l'objet d'un consensus international, mais plusieurs études s'accordent sur une concentration sanguine de PEth de (1) 210 µg/L au-delà de laquelle se situent les « consommateurs excessifs », et de (2) 20 µg/L au-delà de laquelle se situent les consommateurs modérés [1] : ces seuils sont ceux actuellement utilisés dans notre laboratoire.

Conclusion : Ce dosage est mis en œuvre en routine au CHU de Lille depuis mars 2019 avec comme principaux prescripteurs les services d'addictologie, d'hépatologie et de transplantation hépatique (503 demandes en 2019). En addictologie, cette prescription intervient dans le cadre d'une prise en charge de troubles liés à l'usage de l'alcool : ainsi, le PEth est aujourd'hui intégré au contrat thérapeutique du suivi de sevrage et au dépistage de rechute. En transplantation hépatique, le dosage du PEth associé à celui de l'éthylglucuronide urinaire constitue un élément essentiel pour l'inscription (et le maintien) sur les listes de receveurs, mais également pour le suivi en post-greffe [2]. Le PEth est un biomarqueur sensible et spécifique qui s'insère aujourd'hui parmi les biomarqueurs d'alcoolisation en répondant à la question d'une consommation au cours des derniers jours ou semaines (prélèvements sanguins à distance des faits, respect d'une abstinence ...). De plus, du fait de son aspect cumulatif, c'est également un biomarqueur quantitatif d'alcoolisation chronique, utile pour le dépistage des rechutes après sevrage et surtout dans le suivi et la surveillance du sevrage en raison de sa cinétique de décroissance immédiate [3].

Absence de conflit d'intérêt

Références

[1] Simon TW et al. Regul Toxicol Pharmacol 2018;94:163-171

[2] Andresen-Streichert H et al. Transpl Int. 2017;30(6):611-620.

[3] Hakim F et al. Ann Biol Clin (Paris) 2019;77(6):638-644.

2.3.Obstétrique

Dans le suivi et la prévention de la consommation d'alcool chez la femme enceinte, le phosphatidyléthanol n'est pas mis en place de façon systématique au CHU de Lille (comme en France). Nous avons tout de même reçu quelques cas, tels que celui qui a fait l'objet d'une communication (Communication 5). Une étude clinique multicentrique de plus de 2400 femmes enceintes a cependant été acceptée (AUTOQUEST) et sera abordé plus en détail dans un point ultérieur.

Communication 5

Intérêt du dosage simultané de biomarqueurs sanguins directs de l'éthanol chez la femme enceinte : exemple d'un cas de syndrome d'alcoolisation fœtal.

Hakim F, Lorio E, Gish A, Richeval C, Wiat JF, Grenier C, Allorge D, Gaulier JM.

Colloque « Printemps des jeunes scientifiques de la SFTA », Paris France, mai 2022

Intérêt du dosage simultané de biomarqueurs sanguins directs de l'éthanol chez la femme enceinte : exemple d'un cas de syndrome d'alcoolisation fœtal

F. Hakim^{1,3*}, E. Lorio², A. Gish¹, C. Richeval^{1,3}, J.-F. Wiart¹, C. Grenier¹, D. Allorge^{1,3}, J.-M. Gaulier^{1,3}

¹CHU Lille, Unité Fonctionnelle de Toxicologie, F-59000 Lille, France

²C.H.Valenciennes, Service de gynécologie obstétrique, F-59300 Valenciennes, France

³Univ. Lille, ULR 4483 – IMPECS, F-59000 Lille, France

*Auteur correspondant

Adresse e-mail: florian.hakim@chu-lille.fr

Objectif Dans le cadre d'une grossesse, la consommation d'alcool demeure un sujet difficile à aborder et dont les outils de prévention et de diagnostic reposent essentiellement sur l'entretien médical et l'utilisation d'auto-questionnaire intégrant le T-ACE (questionnaire à 4 items qui aborde de manière indirecte la consommation d'alcool). L'objectif est d'illustrer l'intérêt d'une méthode de dosages simultanés de 4 biomarqueurs directs de l'éthanol [les phosphatidyléthanol 16:0/18:1 (PEth18:1) et 16:0/20:4 (PEth20:4) ainsi que d'éthylglucuronide (EtG) et d'éthylsulfate (EtS)] utilisant des buvards dans le diagnostic et la prévention de l'ensemble des troubles causés par l'alcoolisation fœtale (ETCAF, incluant le syndrome d'alcoolisation fœtal (SAF))

Histoire du cas Une femme de 33 ans, éthylique chronique, découvre sa grossesse tardivement (19 SA). Un arrêt des consommations est rapporté à 25 SA avec un traitement par acamprosate. Une échographie fœtale met en évidence des anomalies cérébrales et du *philtrum* conduisant au diagnostic de SAF. Une interruption de grossesse est réalisée à la demande de la patiente à 35 SA, au cours de laquelle des prélèvements de sang maternel et de liquide amniotique (LA) sont réalisés.

Méthode Après dosage d'éthanol par GC-FID, 10 µL de sang ou de LA sont déposés sur des buvards qui sont analysés par une méthode chromatographique couplée à la spectrométrie de masse en tandem utilisée en routine au CHU de Lille.

Résultats L'éthanol est retrouvé dans les échantillons de sang et de LA à des concentrations respectives de 0,97 et 0,51 g/L. L'EtG et l'EtS sont également tous deux détectés dans les échantillons à des concentrations respectives de 1491 et 421 µg/L dans le sang, et 5699 et 859 µg/L dans le LA. Les PEth18:1 et PEth20:4 ne sont logiquement décelés que dans le sang, à des concentrations respectives de 1999 et 796 µg/L avec un ratio PEth20:4/PEth18:1 de 0,40.

Discussion Lors d'une consommation d'éthanol, l'éthanolémie chez la mère et le fœtus sont très proches. Lors de la seconde moitié de la grossesse, le LA, principalement issu des excréctions urinaires et pulmonaires du fœtus, est en partie ingurgité par le fœtus. Ainsi, la majorité des xénobiotiques présents dans le LA sont la résultante de l'absorption et de l'élimination de ces xénobiotiques par le fœtus. Les capacités de métabolisation limitées du fœtus peuvent ainsi entraîner une élimination retardée, voire une accumulation. L'éthanol fait partie des xénobiotiques dont l'élimination est retardée dans le LA avec des concentrations de l'ordre de la moitié du pic d'éthanolémie. Ici, le rapport des concentrations d'éthanol dans le LA et le sang (0,52) oriente vers une exposition très récente de la patiente, et donc du fœtus [1]. Les capacités de métabolisation oxydatives de l'éthanol par le fœtus étant limitées, il est probable que la voie non-oxydative prenne une plus grande importance dans son élimination [2]. La présence d'UDP-glucuronosyl-transférases dès la 20^{ème} semaine de grossesse [3] et de sulfotransférases [4] ainsi que l'élimination de l'EtG et l'EtS principalement par voie rénale, peut alors expliquer l'accumulation de ces métabolites mineurs dans le LA. L'absence de PEth dans le LA était attendue, les globules rouges n'étant pas présents en quantité suffisante dans cette matrice. Les résultats sanguins montrent des consommations répétées et excessives d'éthanol par la patiente,

- au cours des 4 semaines précédant l'interruption de grossesse (PEth18:1 > 210 µg/L), incluant,
- les 2 dernières semaines (PEth20:4 élevé),
- les 24 à 48 dernières heures (EtG et EtS élevés),
- et les toutes dernières heures (éthanolémie).

Ces résultats ne supportent pas l'hypothèse d'une abstinence depuis 25 SA (sois 10 semaines avant l'interruption de grossesse), telle que déclarée par la patiente.

Déclaration de liens d'intérêt Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

[1] Burd L, *et al.* Prenatal alcohol exposure, blood alcohol concentrations and alcohol elimination rates for the mother, fetus and newborn. *J Perinatol.* 2012;32:652-9.

[2] Zelner I, *et al.* Pharmacokinetics of ethanol in the maternal-fetal unit *J Popul Ther Clin Pharmacol.* 2013;20(3):e259-65.

[3] Krekels EHJ, *et al.* Ontogeny of hepatic glucuronidation; methods and results. *Curr Drug Metab.* 2012;13(6):728-43.

[4] Stanley EL, *et al.* Expression profiling of human fetal cytosolic sulfotransferases involved in steroid and thyroid hormone metabolism and in detoxification. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;240(1-2):32-42.

2.4.Néonatalogie

Outre le dépistage des ETCAF, le phosphatidyléthanol peut également aider dans le diagnostic différentiel des Morts Inattendues du Nourrisson (MIN). Un dosage systématique du PEth dans les cas des MIN a été mis en place et a fait l'objet d'une communication (Communication 6).

Communication 6

Place et perspectives du dosage sanguin du phosphatidyléthanol 16:0/18:1 chez le nouveau-né

Gaulier JM, **Hakim F**, Van Der Henst L, Tartar O, Bordat R, Wiart JF, Richeval C, Allorge D
Toxicologie Analytique & Clinique 2020;32(4):s29. Doi : **10.1016/j.toxac.2020.09.060**

Place et perspectives du dosage sanguin du phosphatidyléthanol 16:0/18:1 chez le nouveau-né

Objectifs

Dresser le panorama, actuel et futur, d'utilisation du dosage sanguin du phosphatidyléthanol 16:0/18:1 (PEth), biomarqueur direct d'exposition à l'éthanol, chez le nouveau-né, de par son intérêt dans l'évaluation de l'exposition prénatale à l'éthanol et dans les investigations toxicologiques en cas de mort inattendue du nourrisson (MIN).

Méthode

Un état des lieux est dressé sur la base de notre expérience d'utilisation en routine d'une méthode de dosage par CL-SM/SM, notre participation à des projets de recherche clinique, de résultats expérimentaux préliminaires (stabilité, sang *post-mortem*,...), venant compléter les données issues d'une recherche bibliographique exhaustive axée sur l'objectif ci-dessus.

Résultats

Dans le domaine de l'ensemble des troubles causés par l'alcoolisation fœtale, le PEth fait aujourd'hui partie des moyens d'évaluation et de dépistage (et donc de prévention) des expositions prénatales. De nombreuses études rapportent son utilisation pour le dépistage préventif chez la future mère (lors des consultations obstétricales, et régulièrement en association à un autoquestionnaire). Dans le département du Nord, ce dépistage repose actuellement sur l'utilisation d'un autoquestionnaire intégrant le T-ACE (questionnaire à 4 items abordant indirectement la consommation d'alcool). L'évaluation de la sensibilité de cet autoquestionnaire est l'objet d'un protocole de recherche en cours de finalisation dans lequel le PEth est utilisé comme « gold-standard » au cut-off de 20 µg/L [1]. Le dosage du PEth est également utilisé chez le nouveau-né pour le repérage du SAF à la naissance avec des cut-off souvent bas (≤ 20 µg/L) pour favoriser la sensibilité du dépistage d'exposition in utero. L'ensemble des études disponibles concorde à une sensibilité et spécificité diagnostique du PEth chez le nouveau-né supérieures à l'ensemble des autres biomarqueurs d'exposition pouvant être réalisés chez la mère ou l'enfant à la naissance. Les recommandations professionnelles concernant les analyses toxicologiques en cas de MIN [2] sont mal définies. Au-delà du fait qu'il est légitime de compléter ces analyses pour tendre vers celles d'une « expertise de référence », la question d'une exposition à l'éthanol est compliquée du fait de prélèvements post-mortem pas toujours disponibles (urine) ou en faible quantité, et de la production post-mortem d'éthanol facilitée par l'alimentation lactée (contenu gastrique). Les études préliminaires de faisabilité et de stabilité du PEth dans des échantillons post-mortem réalisées dans notre laboratoire étant probantes, le dosage sanguin post-mortem du PEth est intégré dans les protocoles d'analyses toxicologiques en cas de MIN depuis début 2020 au CHU de Lille.

Conclusion

Le dosage sanguin du Peth est aujourd'hui abordable en routine et son utilisation en pratique clinique est adoptée, en particulier par les addictologues et les transplantateurs hépatiques, avec des valeurs de cut-off adaptées à la vérification d'une abstinence au cours des 3 à 4 dernières semaines (< 5 µg/L) et le dépistage de l'abus chronique d'alcool (> 210 µg/L) [3]. Cependant, la variabilité interindividuelle combinée aux éléments inhérents (doses ingérées, « binge

drinking », moment de la dernière consommation) à sa nature de biomarqueur cumulatif et de longue fenêtre de détection, complique l'interprétation des résultats dans d'autres situations, telles que l'évaluation de la consommation d'éthanol chez la femme enceinte. En conclusion, le dosage du PEth offre des perspectives indéniables chez le nouveau-né, et constitue un outil en recherche clinique dans ce domaine. Cependant, le PEth doit faire lui-même l'objet de protocoles de recherche afin de déterminer, plus généralement, selon la question posée et la population de patients concernée, la valeur adaptée du cut-off, ainsi que la sensibilité et la spécificité diagnostiques précisément associées.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Forster J. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Médecine, Lille ; 2019
- [2] HAS. Prise en charge en cas de mort inattendue du nourrisson (moins de 2 ans) ; 2007
- [3] Hakim F, et al. Ann Biol Clin (Paris), 77 (6) (2019), pp. 638-644

2.5.Médico-légal

Depuis la mise en place de la méthode de dosage du PEth, quelques dosages ont été réalisés dans un contexte médico-légal avec toute la prudence nécessaire dans l'interprétation des résultats d'un biomarqueur disposant d'une littérature peu fournie dans cette application (Communication 7). J'ai par ailleurs publié des commentaires en ce sens sur une revue de la littérature concernant les biomarqueurs de l'éthanol en *post-mortem* (Article 4).

Communication 7

Added value evidences of a simultaneous determination of two phosphatidylethanol isoforms and ethylglucuronide in dried blood spots in forensic contexts

F. Hakim, C Ghoul, J.-F. Wiart, C. Richeval, Y. Delannoy, V. Hédouin, D. Allorge, J.-M. Gaulier.

Toxicologie Analytique & Clinique 2022;34(3):s36.

<https://doi.org/10.1016/j.toxac.2022.06.033>

Added value evidences of a simultaneous determination of two phosphatidylethanol isoforms and ethylglucuronide in dried blood spots in forensic contexts

F. Hakim^{1,2*}, C Ghouli³, J.-F. Wiart¹, C. Richeval^{1,2}, Y. Delannoy³, V. Hédouin³, D. Allorge^{1,2}, J.-M. Gaulier^{1,2}

¹ CHU Lille, Unité Fonctionnelle de Toxicologie, Lille, France

² Univ. Lille, ULR 4483 - IMPECS - IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine, Lille, France

³ CHU Lille, Institut Médico-Légal, France, Lille, France

*Auteur correspondant

Email: florian.hakim@chu-lille.fr

Aims

In clinical or *post-mortem* forensic medicine, acute or chronic alcohol abuse are of main concern and direct/indirect biomarkers are widely used in order to assess recent or retrospective alcohol abuse. We aim to illustrate that a simultaneous determination of 3 direct ethanol biomarkers [two phosphatidylethanol isoforms, 16:0/18:1 (PEth18:1) and 16:0/20:4 (PEth20:4), and ethylglucuronide (EtGB)] using dried blood spot (DBS) can be a useful additional tool in many situations.

(Case#1) Sexual assault of a 17-year-old girl with negative urine and blood ethanol concentration (BAC) (but urine EtG concentration was 10 mg/L) sampled 19 hours after the facts.

(Case#2) Only blood sampling (negative BAC) was performed 14 hours after a 36-year-old man (with heavy psychiatric disorders) tried to kill 3 persons. He was reported drunk at the time of the attack by witnesses.

(Case#3) A 27-year-old man was implicated in a car-related fatality that occurred 11 days before sampling. Blood and hair sampling were performed in order to investigate his alcoholic status: hair EtG concentration was <5 pg/mg.

(Case#4) The alcoholic status of a 43-year-old woman killed in a car accident had to be established. BAC was 140 mg/L in the *post-mortem* peripheral blood (only available biological sample; sampled less than one hour after death and kept refrigerated until time of analysis (2 days later).

(Case#5) A low BAC (70 mg/L) was found in *post-mortem* cardiac blood (only sample available) sampled on the corpse of a 42-year-old man found submerged in the sea.

(Case#6) Peripheral blood sampling (for BAC determination) and direct DBS sampling (Neoteryx™) were performed at the time of discovery of the 36-year-old man corpse, allegedly heavy drinker according to the testimonies (BAC was 2810 mg/L).

Methods

Blood samples can alternatively consist in 10 µL from usual blood sampling tubes (e.g. fluoride preserved) transferred on DBS card, or direct DBS sampling using Volumetric Absorptive MicroSampling devices (VAMS; Hemaxis™, Neoteryx™). These DBS are analyzed using a LC-MS/MS (routinely used in clinical toxicology) method (LLOQ: 2 µg/L for the 3 analytes).

Results

Results (µg/L; PEth18:1, PEth20:4 and EtGB, respectively) were:

(Case#1) 22, 2 and 300, in coherence with both a recent alcohol intake hypothesis [EtGB above the 45 µg/L threshold supported an alcohol consumption (> 2 standard

units (SU)) in the last 24 to 48 hours] and that this girl was not an excessive drinker [owing to the low PEths concentrations].

(Case#2) 98, 103 and 71, consistent with an alcohol intake hypothesis around the time of the attack by this man who had a significant consumption of alcohol in the last 10 days as PEth 20:4 concentration was similar to the PEth18:1 one.

(Case#3) 9, <2 and <2, and did not contradict the negative EtG hair result as these low values were, at most, compatible with an "occasional" or "social drinker" status (< 14 SU per week).

(Case#4) 817, 44 and 130. EtGB positive result supported a recent alcohol consumption and the very high PEth18:1 value strongly suggested chronic excessive alcohol consumption.

(Case#5) negative (<2 µg/L) for the 3 analytes in *post-mortem* cardiac blood, in agreement with both the hypothesis of a light *post-mortem* ethanol production, and a probable "abstinent" or "occasional consumer" status of the victim.

(Case#6) 3470, 1030 and 13400, supporting the massive alcohol intoxication hypothesis close to the death of a heavy drinker.

Conclusion

This analytical tool is of high interest when only blood samples are available, although *post-mortem* use (due to PEths neoformation issues) should be limited to cases with negative BAC, or when blood sampling is performed close to death using a VAMS or a refrigerated preserved (< 4 days) tube.

Conflict of interest: none

Article 4

Comments on “Evaluation and review of ways to differentiate sources of ethanol in post-mortem blood”

Hakim F, Gicquel T, Allorge D, Gaulier JM

Int J Legal Med 2021;135(4):1477-1479. doi.org/10.1007/s00414-021-02529-8

Comments on “Evaluation and review of ways to differentiate sources of ethanol in post-mortem blood”

To the Editor:

We read with interest the article by Lin et al. [1] that reviews ways to distinguish ante-mortem ingestion of ethanol from post-mortem production and discusses the practical utility of biomarkers of ethanol consumption that are available to tackle this major issue for forensic toxicologists. Nevertheless, we regret that the authors have forgotten to mention an emerging biomarker of ethanol exposure in their comprehensive list. Indeed, we feel that it is necessary to complete this review with some information about the potential interest of phosphatidylethanol in post-mortem blood even if published data in this area are currently still scarce.

Phosphatidylethanol (PEth) are minor metabolites of ethanol produced by non-oxidative pathways in cell membranes via the action of the phospholipase D enzyme in the presence of ethanol (and phosphatidylcholine as substrate). More than 40 various PEth analogs have been characterized in humans: the most abundant in human blood is PEth 16:0/18:1, representing about 40% of total PEths. In 2020, the current practical approach for PEth 16:0/18:1 analysis relies on (i) a pre-analytical step based on dried blood spot (DBS) collection that ensures in vitro stability of PEths and (ii) a sensitive and specific analytical step based on liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method [2]. Today, blood PEth 16:0/18:1 routine assay takes place advantageously between urine ethyl glucuronide (EtG) and hair EtG analyses due to its detection window period of 21– 28 days, and allows quantitative results over several weeks with a very low latency [3, 4].

Although PEths are beginning to be used in forensic contexts [4–6], literature in post-mortem situations remains limited. More than a decade ago, Hansson et al. [7] and Bendroth et al. [8] published the first studies of PEths in post-mortem blood. However, in these former studies, PEth blood concentration assays were performed using an evaporative light-scattering detector resulting in a limit of quantification (LOQ) of total PEths above 150 µg/L. Nevertheless, even with elevated LOQs, both studies suggested that PEths were able to provide important information about alcohol drinking habits of the victim. In 2012, Ringmets et al. [9, 10] have studied several alcohol biomarkers (including PEths using detection with mass spectrometry with a LOQ of 70 µg/L for total PEths) in a population of 245 Estonian men who died at ages ranging from 25 to 54 years. Authors' conclusion included an association of elevated PEth blood concentrations with the number of potential alcohol-related pathologies observed at autopsy, as well as a high specificity of this ethanol biomarker. Nevertheless, the authors noticed the need of clarification of the risk of artefactual PEth-level increase during the post-mortem period. In 2016, Thompson et al. [11] has reported PEth 16:0/18:1 and PEth 16:0/18:2 *post-mortem* brain concentrations (determined using LC-MS/MS) in populations of individuals known to have had an alcohol use disorder. They found a significant correlation between PEth 16:0/18:1 level in cerebellum and ethanol concentration in blood at the time of death. As noticed by Weinmann et al. [12], this study [11] adds to the increasing body of evidence for the advantages of PEth 16:0/18:1 as a relevant biomarker of ethanol intake, but the impact of several variables (daily amount of alcohol consumed, gender, nutrition, together with storage conditions, pre-analytical stability, and the diffusion rates, i.e. post-mortem diffusion and redistribution, of these highly lipophilic compounds) should be evaluated and taken into account. Lastly, Liu et al. [13] have reported the possibility of obtaining a false negative or

positive result using PEth measurements in post-mortem human blood and concluded that PEths are not appropriate metabolites to characterize the source of ethanol in post-mortem blood. From our point of view, this conclusion remains questionable owing to (i) the very low size of each studied group (n = 6) and (ii) the poor quality of the analytical method used [14], i.e. PEth concentrations expressed as the total concentration of two isoforms of PEths, the absence of deuterated internal standard for PEths and mainly the absence of DBS collection to ensure blood PEth stability. In this way, the same authors have recently published a similar study (using both ante-mortem and post-mortem blood samples) but with major changes in their methodology that consisted in DBS use for blood collection and LC-MS/MS analysis for PEths (PEth 16:0/18:1 and 18:1/ 18:1) [15]; unsurprisingly, they reported an improvement in PEth stability. Therefore, we do not really understand why PEth, as a relevant biomarker of ethanol consumption, was excluded by these authors from their review [1].

It is obvious that there is (i) a lack of scientific literature about PEth 16:0/18:1 relevance in post-mortem situations using updated analytical methods and (ii) a need of clarification about PEth 16:0/18:1 stability issues, i.e. in cadaver and/or in vitro production and/or degradation. Indeed, there is some evidence that phospholipase is still active in the post-mortem period for about 48 h at least and, in a recent experimental study, Luginbühl et al. have shown that in vitro PEth formation rates vary between tissues and animal species [16]. Sample conservation issue also remains unclear. A study on post-mortem samples without preparing DBS and using an analytical method with a high LOQ (PEth 16:0/18:1 LOQ was 490 µg/L of whole blood) revealed that freezing of post-mortem fluids or organs at -20°C should be avoided (storage at +4°C or -80°C appears more relevant) in order to improve pre-analytical stability of PEths [17]. There is thus a serious need of additional data (for example, from comparison of blood PEth 16:0/18:1 concentrations in samples collected at at-the-scene examination and at the autopsy) in order to characterize more accurately in vitro and in cadaver (i.e. during the post-mortem period) blood PEth stability by studying degradation and neoformation of PEth, especially if ethanol is still present in blood at the time of death.

Notwithstanding, we consider that phosphatidylethanol should be cited in a comprehensive overview about blood biomarkers of ethanol consumption in post-mortem situations in 2020.

Declarations

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals that would have been performed by the authors.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Lin Z, Wang H, Jones AW, Wang F, Zhang Y, Rao Y (2020) Evaluation and review of ways to differentiate sources of ethanol in postmortem blood. *Int J Legal Med* 134(6):2081–2093. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02415-9>
2. Luginbühl M, Stöth F, Schröck A, Gaugler S, Weinmann W (2020) Quantitative determination of phosphatidylethanol in dried blood spots for monitoring alcohol abstinence. *Nat Protoc* 16:283–308. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00416-x>
3. Gnann H, Weinmann W, Thierauf A (2012) Formation of phosphatidylethanol and its subsequent elimination during an extensive drinking experiment over 5 days. *Alcohol Clin Exp Res* 36:1507–1511. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2012.01768.x>
4. Ulwelling W, Smith K (2018) The PEth blood test in the security environment: what it is; why it is important; and interpretative guidelines. *J Forensic Sci* 63(6):1634–1640. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13874>
5. Kummer N, Wille SM, Poll A, Lambert WE, Samyn N, Stove CP (2016) Quantification of EtG in hair, EtG and EtS in urine and PEth species in capillary dried blood spots to assess the alcohol consumption in driver's license regranting cases. *Drug Alcohol Depend* 165:191–197. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2016.06.012>
6. Andresen-Streichert H, Müller A, Glahn A, Skopp G, Sterneck M (2018) Alcohol biomarkers in clinical and forensic contexts. *Dtsch Arztebl Int* 115(18):309–315. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0309>
7. Hansson P, Varoga A, Krantz P, Alling C (2001) Phosphatidylethanol in post-mortem blood as a marker of previous heavy drinking. *Int J Legal Med* 115(3):158–161. <https://doi.org/10.1007/s004140100206>
8. Bendroth P, Kronstrand R, Helander A, Greby J, Stephanson N, Krantz P (2008) Comparison of ethyl glucuronide in hair with phosphatidylethanol in whole blood as post-mortem markers of alcohol abuse. *Forensic Sci Int* 176(1):76–81. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.09.012>
9. Ringmets I, Tuusov J, Lang K, Väli M, Pärna K, Tõnisson M, Helander A, McKee M, Leon DA (2012) Alcohol and premature death in Estonian men: a study of forensic autopsies using novel biomarkers and proxy informants. *BMC Public Health* 12:146. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-146>
10. Tuusov J, Lang K, Väli M, Pärna K, Tõnisson M, Ringmets I, McKee M, Helander A, Leon DA (2014) Prevalence of alcohol-related pathologies at autopsy: Estonian forensic study of alcohol and premature death. *Addiction* 109(12):2018–2026. <https://doi.org/10.1111/add.12695>
11. Thompson PM, Hill-Kapturczak N, Lopez-Cruzan M, Alvarado LA, Dwivedi AK, Javors MA (2016) Phosphatidylethanol in post-mortem brain and serum ethanol at time of death. *Alcohol Clin Exp Res* 40(12):2557–2562. <https://doi.org/10.1111/acer.13254>
12. Weinmann W, Schröck A, Wurst FM (2017) Commentary on the Paper of Thompson P. et al.: Phosphatidylethanol in postmortem brain and serum ethanol at time of death. *Alcohol Clin Exp Res* 41(3):501–503. <https://doi.org/10.1111/acer.13319>
13. Liu Y, Zhang X, Li J, Huang Z, Lin Z, Wang J, Zhang C, Rao Y (2018) Stability of ethyl glucuronide, ethyl sulfate, phosphatidylethanol and fatty acid ethyl esters in postmortem human blood. *J Anal Toxicol* 42(5):346–352. <https://doi.org/10.1093/jat/bky010>
14. Zhang X, Zheng F, Lin Z, Johansen SS, Yu T, Liu Y, Huang Z, Li J, Yan J, Rao Y (2017) Simultaneous determination of ethanol's four types of non-oxidative metabolites in human whole blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 963: 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.040>
15. Wang H, Zhang Y, Zhang X, Li J, Lin Z, Huang Z, Chang J, Zhang Y, Wang J, Zhang C, Rao Y (2020) An LC-MS/MS method for comparing the stability of ethanol's non-oxidative metabolites in dried blood spots during 90 days. *Alcohol* 83:29–35. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2019.05.007>
16. Luginbühl M, Willem S, Schürch S, Weinmann W (2018) Formation of phosphatidylethanol from endogenous phosphatidylcholines in animal tissues from pig, calf, and goat. *Forensic Sci Int* 283:211–218. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.12.030>
17. Aradóttir S, Seidl S, Wurst FM, Jönsson BA, Alling C (2004) Phosphatidylethanol in human organs and blood: a study on autopsy material and influences by storage conditions. *Alcohol Clin Exp Res* 28(11):1718–1723. <https://doi.org/10.1097/01.alc.0000145687.41646.e5>

3. Etudes cliniques

3.1.PETHOXICO

Le protocole complet est disponible en Annexe 1

3.1.1. Mise en œuvre

Le protocole PETHOXICO avait pour objectif de confronter les résultats de patients consommateurs chroniques et excessifs d'éthanol au cut-off proposé dans la littérature. Pour cela, dans un premier temps, nous avons pour objectif de déterminer le pourcentage de patients pour lesquels la concentration de PEth est supérieure à 200 µg/L au sein d'une population de consommateurs excessifs d'alcool. Effectivement, une concentration sanguine de PEth à ce seuil est dite correspondre à une consommation supérieure à 6 doses standard par jour chez le patient (60). Il était attendu, conformément aux données disponibles de sensibilité de ce paramètre dans des populations similaires, qu'au moins 86 % des patients aient une concentration dépassant ce seuil de 200 µg/L. Dans un second temps, nous voulions définir le cut-off pour lequel l'ensemble de notre population est positive et donc qui permettrait une détection des patients consommateurs chroniques excessifs d'éthanol avec une sensibilité de 100 %.

L'étude a été proposée à tous les patients majeurs consommateurs d'éthanol, présentant un TLUA. Ils ont été recrutés au sein du service d'addictologie de Fontan 2 au CHU de Lille, lors de leur consultation de préparation en vue d'une hospitalisation pour un sevrage. Le recueil du consentement était réalisé lors de l'admission. Le patient était interrogé sur ses consommations concernant le mois précédant l'admission et une prise de sang était effectuée (tube citraté de 5 mL). Les prélèvements étaient transportés réfrigérés sous 24 h au laboratoire de toxicologie. À leur arrivée 10 µL de sang total était déposé sur papier buvard pour doser les deux isoformes de PEth (16:0/18:1 et 16:0/20:4) et l'EtG.

3.1.2. Résultats préliminaires

Nous avons inclus, de novembre 2020 à mars 2021, 37 patients (10 femmes et 27 hommes) d'âge moyen de 47,5 ans (\pm 9,8 ans).

Les concentrations moyennes en PEth 16:0/18:1, PEth 16:0/20:4 et EtG sont respectivement de 1180 (médiane : 1013 µg/L ; étendue : de 53 à 3889 µg/L) et 568 µg/L (médiane : 365 µg/L ; étendue : de 9 à 2353 µg/L) et 269 µg/L (médiane : 268 µg/L ; étendue : de 12 à 495 µg/L) avec un ratio moyen (PEth 16:0/20:4 / PEth 16:0/18:1) de 0,5 (étendue : 0,11 à 1,12) pour les prélèvements d'admissions. Seuls deux participants ont un PEth à l'admission inférieur à 200 µg/L avec des concentrations respectives de 53 et 172 µg/L. 100 % des participants ont un PEth à l'admission supérieur à 20 µg/L ce qui correspond aux recommandations actuelles de Santé Publique France d'une consommation à risque (> 2 US par jour et 10 US par semaine). L'objectif d'atteindre les 86 % de patients > 200 µg/L est ainsi atteint (94 %), confortant les données de la littérature (figure 34). Afin d'obtenir une sensibilité de 100 % dans cette étude, la valeur seuil d'interprétation doit être fixée à 52 µg/L. L'interrogatoire des consommations sur le mois précédant l'admission de ces 2 patients < 200 µg/L pourrait apporter des éléments pour expliquer ces concentrations très éloignées de la médiane de la population (1013 µg/L).

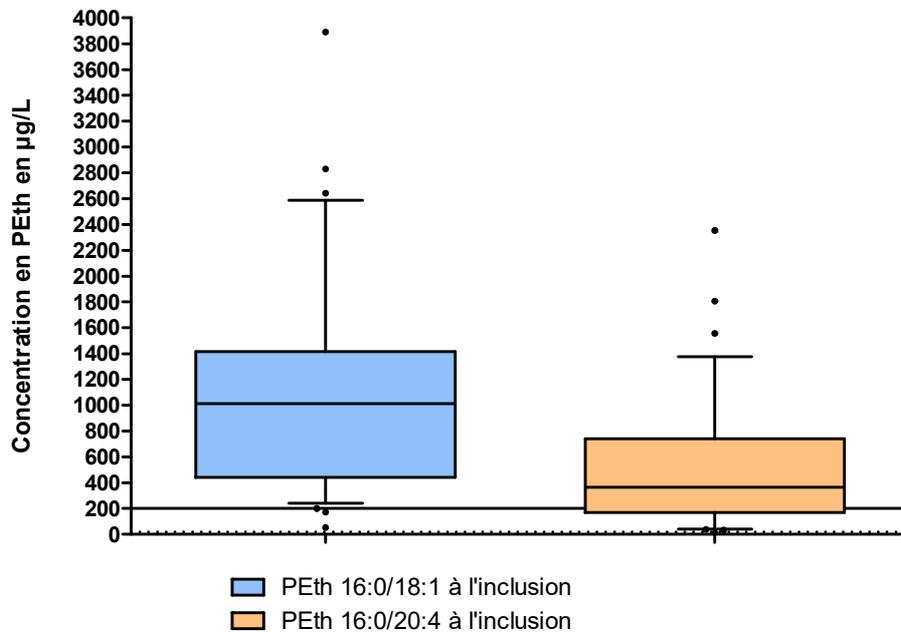


Figure 34: Répartition des concentrations en PEth lors de l'inclusion, la ligne en pointillé correspond à une concentration de 20 µg/L et celle en trait plein à une concentration de 200 µg/L (n=37, Whiskers 10-90 percentile)

Pour le second prélèvement dont le délai moyen après l'inclusion est de 6,7 jours (étendue : 6 à 8 jours), 100 % des EtG sont logiquement non détectés et les concentrations moyennes de PEth 16:0/18:1 et 16:0/20:4 sont respectivement de 527 µg/L (médiane : 443 µg/L ; étendue : de 16 à 1655 µg/L) et 157 µg/L (médiane : 99 µg/L ; étendue : de non détectée à 923 µg/L) avec un ratio moyen (PEth 16:0/20:4 / PEth 16:0/18:1) de 0,3. Cette différence de ratio s'explique par une demi-vie d'élimination moindre du PEth 16:0/20:4 par rapport au PEth 16:0/18:1. A J7 de leur hospitalisation, 78 % des participants sont toujours au-dessus de la valeur seuil de 200 µg/L de PEth et 97% sont toujours au-dessus de 20 µg/L (figures 35).

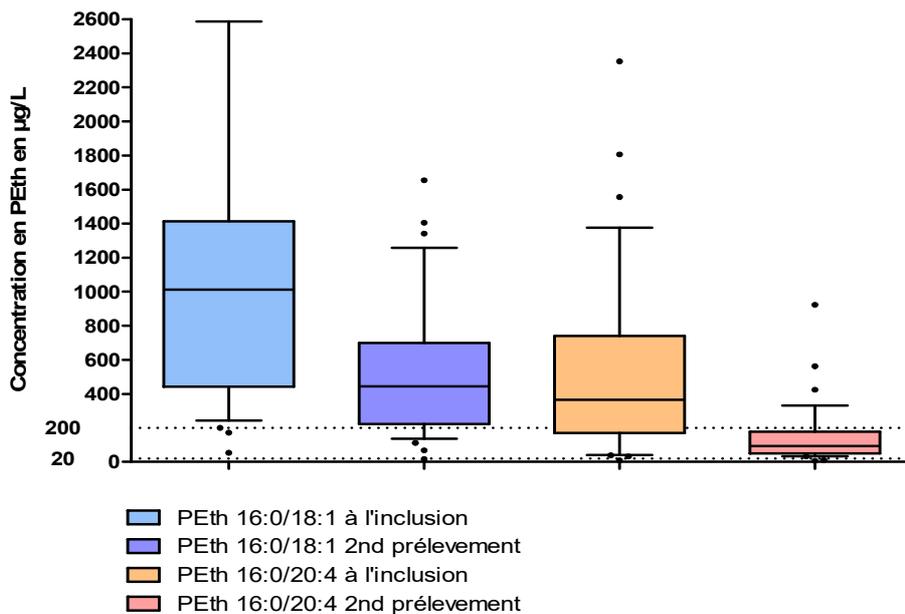


Figure 35: Concentrations sanguines en PEth 16:0/18:1 et 16:0/20:4 dans une population de patients hospitalisés pour sevrage alcoolique à l'admission et à la sortie (n=37, Whiskers 10-90 percentile)

La demi-vie moyenne du PEth 16:0/18:1 dans cette étude, calculée en supposant un modèle mono-compartmental, est de 6,9 jours (médiane : 6 jours ; étendue : 2,2 à 30,9 jours) et celle du PEth 16:0/20:4 de 4,1 jours (médiane : 4 jours ; étendue : 1,3 à 60,6 jours). La demi-vie moyenne du PEth 16:0/18:1 dans cette étude est en accord avec la littérature. Celle du PEth 16:0/20:4 est, comme la littérature l'indique, inférieure à celle du PEth 16:0/18:1. Néanmoins, cette demi-vie est supérieure aux données disponibles dans la littérature qui l'estimait à environ 2 jours (38) (figure 36).

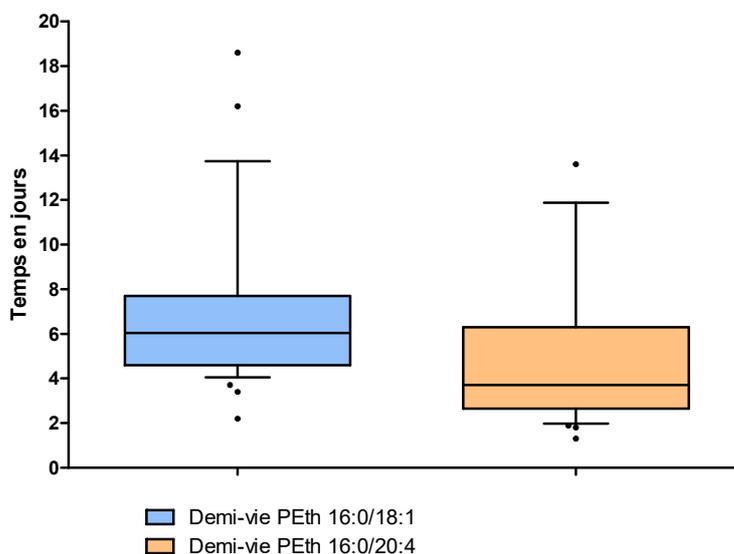


Figure 36: Demi-vie des PEth 16:0/18:1 et 16:0/20:4 dans une population de patients hospitalisés pour sevrage alcoolique (n=37, Whiskers 10-90 percentile)

Sur 5 patients dont l'hospitalisation a été de plus de 10 jours, 3 prélèvements ont été effectués avec un délai moyen entre le 2e et le 3e prélèvement de 5 jours. Chez un de ces participants, la demi-vie du PEth 16:0/18:1 passe de 3,7 jours entre le prélèvement 1 et 2 à 16,5 jours entre le prélèvement 2 et 3 : ce résultat pourrait éventuellement être expliqué si le patient a bénéficié d'une permission durant son séjour, et a reconsommé de l'alcool durant cette permission. Les données de cette étude ne montrent pas de différence significative (T-Test non apparié pour le PEth 16:0/18:1 et le PEth 16:0/20:4, $p = 0,2945$ et $p = 0,4134$ respectivement, $\alpha = 0,05$) pour les demi-vies d'élimination du PEth selon le sexe des individus (figure 37 et 38).

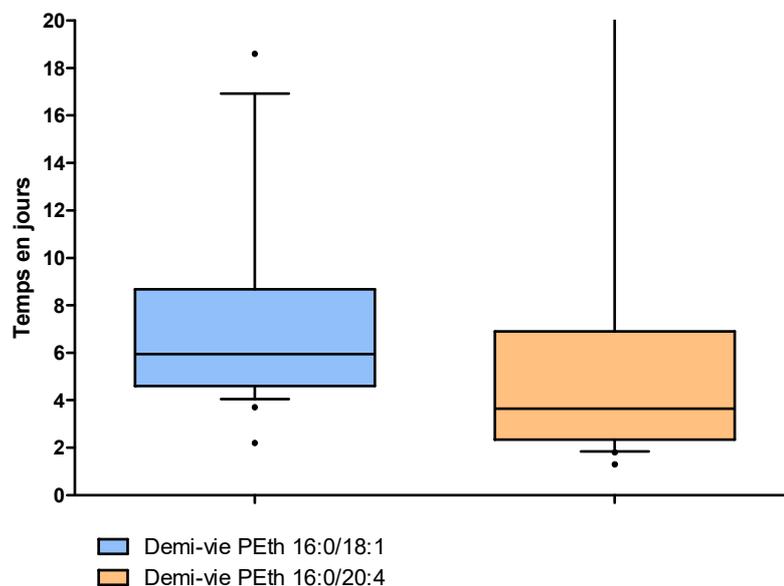


Figure 37: Demi-vie des PEth 16:0/18:1 et 16:0/20:4 dans une population de patients hospitalisés pour sevrage alcoolique. Population de sexe masculin (n=27, Whiskers 10-90 percentile)

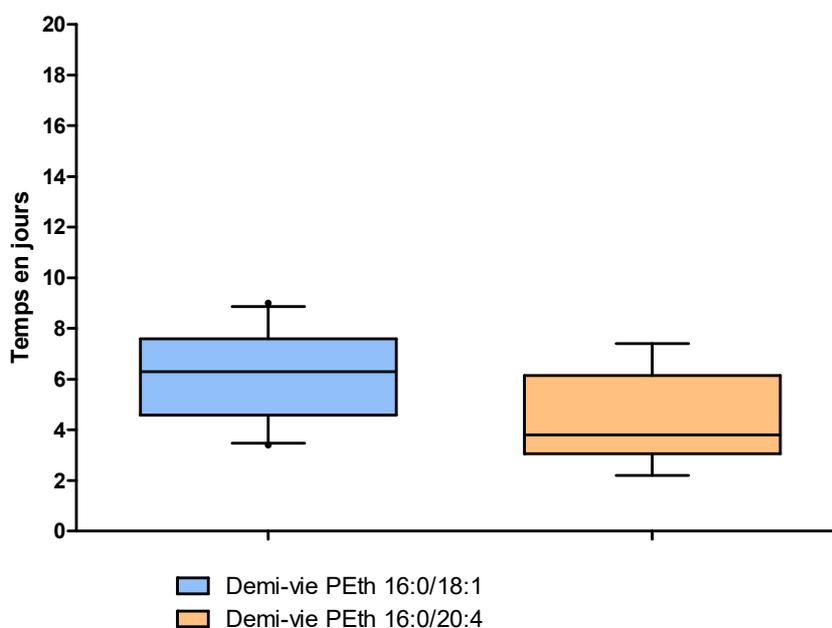


Figure 38: Demi-vie des PEth 16:0/18:1 et 16:0/20:4 dans une population de patients hospitalisés pour sevrage alcoolique. Population de sexe féminin (n=10, Whiskers 10-90 percentile)

3.1.3. Conclusion

Les résultats du protocole de recherche clinique PETHOXICO (Tableau 14) confortent globalement les données retrouvées dans la littérature, que ce soit pour la valeur seuil d'interprétation de 200 µg/L, mais aussi pour la demi-vie d'élimination du PEth 16:0/18:1. Ces résultats confirment également la demi-vie inférieure du PEth 16:0/20:4 dans une moindre mesure que ce qui était annoncé dans la littérature (4,1 jours contre 2 jours). Contrairement aux données sur la formation du PEth, l'élimination de ce biomarqueur ne semble pas modifiée par le sexe des individus. Une comparaison des données recueillies lors de l'interrogatoire d'admission des patients sur leurs consommations dans le mois précédent avec les

concentrations de PEth pourrait permettre de déterminer une concentration moyenne de PEth par gramme d'éthanol ingéré et ainsi étoffer les données d'interprétation de ce biomarqueur. Ces résultats ont fait l'objet d'une communication lors du congrès d'harmonisation du PEth à Basel en 2022 (Communication 7).

Tableau 14 : Résumé des résultats préliminaires de l'étude PETHOXICO (n=37)

	PEth 16 :0/18 :1 (µg/L)		PEth 16 :0/20 :4 (µg/L)		EtG B (µg/L)	EtOH (g/L)	EtG U (mg/L)
	D0	D7	D0	D7	D0	D0	D0
Moyenne	1180	527	568	157	269	1,09	> 10
Médiane	1013	443	365	99	268	0,96	>10
Etendue	[53-3889]	[16-1655]	[9-2353]	[nd-923]	[12-495]	[nd-3,54]	[nd->10]
Sensibilité (consommation chronique excessive)	94 %	78 %	100 %	95 %	83 %	46 %	78 %
	(> 200 µg/L)		(> 2 µg/L)		(> 45 µg/L)	(> 0,1 g/L)	(> 0,5 mg/L)
Demi-vie moyenne	6,9 jours		4,1 jours		NA	NA	NA

Communication 7

Preliminary results of blood PEth16:0/18:1, PEth16:0/20:4 and ethylglucuronide (EtG) simultaneous determinations in a clinical study in a population of patients hospitalized for withdrawal

Hakim F, Wiart JF, Gicquel T, Sciffet D, Cottencin O, Allorge D, Gaulier JM

Annual Congress of the The Society of PEth research (PEth-NET) "PEth in mind", Bâle, Suisse, Mai 2022 (communication orale)



Table of Contents

Organization and Imprint.....	4
Welcome Message.....	5
About PEth-NET.....	6
Program Overview	8
Scientific Session	9
Keynote 1	10
Scientific Abstracts.....	11
PEth-NET Awards	20
Laboratory Session.....	21
Harmonization Session.....	28
Keynote 2	29
Dinner Information	30
Sponsoring	31

#3: Preliminary results of blood PEth 16:0/18:1, PEth 16:0/20:4 and ethyl glucuronide simultaneous determinations in a clinical study of patients hospitalized for withdrawal

Hakim F.^{1,2}, Wiart J. F.¹, Gicquel T.³, Sciffet D.⁴, Cottencin O.⁴, Allorge D.^{1,2}, Gaulier J. M.^{1,2}

¹CHU Lille - Laboratory of Toxicology

²University of Lille - ULR 4483 IMPECS

³CHU Rennes - Laboratory of Toxicology and Forensic

⁴CHU Lille - Addictology Unit

florian.hakim@chu-lille.fr

Introduction and Aim

This paper aims to report preliminary results of PETHOXICO, a monocentric non-interventional non-randomized cross-sectional clinical study (ClinicalTrials.gov NCT04557631) in a population of patients hospitalized for withdrawal.

Methods

Blood and urine were sampled on the day of admission (D0) and 7 days later (D7). Blood PEth 16:0/18:1, PEth 16:0/20:4 and ethyl glucuronide (EtG) were analyzed simultaneously in dried blood spots using a LC-MS/MS method (LLOQ 2 µg/L). In addition, urinary EtG and blood alcohol concentration (BAC) were determined using immunoassay and GC-FID, respectively.

Results and Discussion

A total of 37 chronic and excessive ethanol consumers (ethanol per week consumptions ranging from 560 to 1750 g) were included in PETHOXICO (sex ratio 11/26 (F/M); 30 to 67 YO with a median at 46 YO).

At D0, the mean concentration of PEth 16:0/18:1 was 1180 µg/L (range: 53-3889 µg/L) with 95 % of participants above the 210 µg/L threshold. PEth 16:0/20:4-to-PEth 16:0/18:1 mean ratio was 0.46 with PEth 16:0/20:4 concentrations ranging from 9 to 2353 µg/L. The mean BAC was 1060 mg/L (range: undetected-3540 mg/L) and for 78 % of participants, urinary EtG was above the 500 µg/L threshold.

At D7, no BAC nor EtG (urine and blood) were found as expected. The mean concentration of PEth 16:0/18:1 dropped to 527 µg/L (range: 16-1655 µg/L) with still 78 % of participants above the 210 µg/L threshold.

PEth 16:0/20:4 concentrations dropped more significantly (range: undetected-923 µg/L) with a mean PEth 16:0/20:4-to-PEth 16:0/18:1 ratio of 0.26. This decreased ratio [0.46 at D0 and 0.26 at D7] is coherent with the expectation of a shortened detection window for PEth 16:0/20:4. Blood elimination half-life of PETHs were calculated with the assumption of a single elimination phase: mean half-life were 6.9 days (range: 2.2-18.6 days) and 4.6 days (range: 1.3-9.3 days) for PEth 16:0/18:1 and PEth 16:0/20:4, respectively. PEth 16:0/18:1 observed half-lives are consistent with literature data (around 7 days with a significant interindividual variability). Observed PEth 16:0/20:4 half-lives are higher than the very scarce data from literature (2 days).

Conclusion

In this study, the use of an analytical method combining 3 direct metabolites of ethanol allows, in one run, to discriminate a very recent consumption (< 48 h) from a recent consumption (< 2 weeks) and an older consumption (2-4 weeks). PEth 16:0/18:1 sensitivity to detect chronic and excessive alcohol consumers was 95 % with a 210 µg/L threshold. However, these preliminary results needs yet to be confronted to detailed clinical data.

Keywords: DBS, Phosphatidylethanol, Ethyl glucuronide, Withdrawal

3.2.AUTOQUEST

Le protocole complet est disponible en Annexe 2.

L'écriture de ce projet et toutes les étapes jusqu'à sa soumission au Comité de Protection des Personnes (CPP) ont fait l'objet de la thèse d'exercice en médecine soutenue le 18 septembre 2019 par Mme le Dr Julia Forster. Le titre de cette thèse est le suivant :

Evaluation de la valeur diagnostique de l'autoquestionnaire T-ACE pour dépister les consommations d'alcool à risque pendant la grossesse : comparaison à un biomarqueur sanguin utilisé comme « gold standard »

En France, 27,6% des femmes enceintes consomment de l'éthanol avant de se savoir enceinte et 21,2% une fois la grossesse connue (Etude Elfe, 2011). Ces chiffres sont très probablement sous-estimés du fait (1) de l'insuffisante sensibilité et spécificité des biomarqueurs indirects utilisés actuellement et (2) d'une possible sous-déclaration dans les autoquestionnaires standardisés, recommandés par sociétés savantes (92), dont la valeur diagnostique n'est pas objectivement déterminée. Le T-ACE fait partie de ces autoquestionnaires recommandés, il a été développé par Sokol *et al.* en 1989 (93). Le T-ACE est intégré dans les maternités du Nord de la France et systématiquement remis aux femmes enceintes. Ainsi, afin d'évaluer objectivement sa valeur diagnostique, cette étude (AUTOQUEST) comparera sa valeur au résultat du dosage de PEth, utilisé comme « gold standard ». Le protocole a été accepté par le CPP en 2021. Cependant son caractère multicentrique et les difficultés liées à la crise sanitaire actuelle (COVID-19) ont retardé sa mise en place pour l'inclusion des 2400 femmes enceintes. Le début des inclusions est prévu pour fin 2022, voire début 2023.

CHAPITRE III - PERSPECTIVES

1. Toxicologie biologique

Les perspectives en toxicologie biologique sont multiples. L'activité de routine a généré plus de 3000 résultats de PEth comprenant, pour la plupart, les autres biomarqueurs d'intérêt de la consommation d'alcool réalisés au laboratoire (Figure 39), mais aussi des marqueurs biologiques pertinents pour l'étude du PEth comme l'hématocrite. Ces données accumulées nécessitent d'être analysées pour améliorer la compréhension et maîtrise de ce biomarqueur.

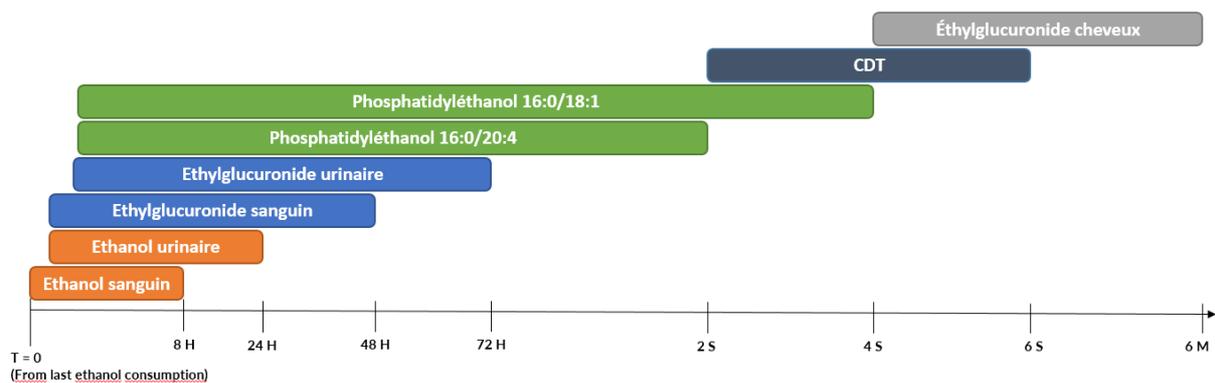


Figure 39: Biomarqueurs d'intérêts disponibles au CHU de Lille

1.1. Transplantation

Dans le cadre des transplantations hépatiques et plus largement dans les maladies du foie liées à l'alcool, les cliniciens portent un intérêt grandissant envers le PEth. Ce biomarqueur apporte de nombreux avantages, décrit précédemment dans ce manuscrit. Cependant, de nombreuses études restent nécessaires pour approfondir nos connaissances sur ce biomarqueur dans ce contexte. Pour cela, nous participons au protocole HEPARG, qui est une étude de la production *in vitro* de PEth dans les cellules de lignées hépatiques (HepaRG) ainsi qu'une étude des voies métaboliques du PEth comprenant leurs inhibitions et inductions, en collaboration le laboratoire de toxicologie du CHU de Rennes. Ce protocole prélude des études nécessaires pour connaître l'impact d'un état hépatique altéré sur les concentrations de PEth. Dans ce domaine, et plus précisément dans l'éligibilité des patients sur les listes de transplantation, une homogénéité des pratiques sur l'utilisation de ce biomarqueur est nécessaire. En effet, l'utilisation du PEth qui dispose d'une sensibilité supérieure au gold standard actuel, pose des questions éthiques de par sa disponibilité inhomogène selon les laboratoires et aux éventuelles pertes de chances d'éligibilité sur les listes de transplantation qui découlent de son utilisation. Il sera nécessaire de discuter d'une évolution des gold standards dans ce contexte et d'y intégrer le PEth en définissant soigneusement les valeurs seuils d'interprétation permettant une amélioration de la détection des rechutes de consommations sans perte de chance pour le patient.

1.2. Addictologie

En addictologie, le PEth en tant que biomarqueur permettant d'estimer les habitudes de consommation ainsi que détecter leurs variations (réduction, augmentation...), s'intègre de façon croissante dans le suivi de sevrage dont les objectifs ne sont plus uniquement

l'abstinence mais également une gestion contrôlée des consommations d'alcool. Dans ce cadre, nécessitant un biomarqueur quantitatif, le PEth semble prometteur comme l'atteste les résultats de PETHOXICO. Ici encore, la valeur seuil d'interprétation ciblant cette gestion contrôlée ainsi que le nombre de dosage successifs restent à définir avec l'apparition de nouveaux outils d'interprétation tels que la modélisation mathématique. Outre le suivi de sevrage, le PEth peut être utilisé dans des sujets de recherches plus vaste, notamment dans la recherche de thérapeutiques en lien avec la consommation d'alcool ou dans l'impact de la consommation d'alcool sur des maladies non liées spécifiquement à des TLUA. C'est l'objet de deux projets de recherche auxquels nous participons :

- CARMEL, qui est un protocole multicentrique de catégorie 1 ayant pour objectif principal l'évaluation de la réduction de la consommation de boissons alcoolisées en lien avec la prise de cannabidiol chez des patients présentant des TLUA. Ce protocole, en lien avec le Centre Hospitalier Le Vinatier à Lyon est en cours de mise en oeuvre.
- ELICSIR, est un projet de recherche ANRS hors recherche fondamentale dont l'objectif est de comparer les patients d'HEPAVIH CO13 (Cohorte de l'ANRS concernant des patients co-infectés VIH-VHC) ayant un marqueur d'insulinorésistance (HOMA-IR) normal avec les patients d'HEPAVIH ayant un HOMA-IR élevé dans les 36 mois précédant la guérison du VHC en utilisant, notamment, des biomarqueurs de consommation de toxiques, incluant l'alcool.

1.3. Obstétrique et Néonatalogie

Dans un précédent chapitre, nous avons vu que la détection des ETCAF était difficile chez la mère avec l'utilisation d'autoquestionnaires pour lesquels la maîtrise de nombreux aspects (définition d'une consommation d'alcool, biais de désirabilité sociale, tabous ...) est complexe. Chez le nouveau-né d'autres difficultés s'ajoutent avec la nécessité d'un biomarqueur très sensible pour détecter une exposition relativement ancienne, la nécessité d'un prélèvement de faible volume et peu invasif. Tant chez la mère que chez le nouveau-né, l'utilisation du PEth dans la détection des ETCAF fait l'objet de quelques études dont les résultats semblent indiquer une sensibilité supérieure de ce biomarqueur par rapport aux autres biomarqueurs et aux autoquestionnaires, avec l'utilisation des DBS ou des VAMS pour résoudre les spécificités du prélèvement chez le nouveau né.

Afin d'intégrer le dosage du PEth dans la détection et le suivi (i) des consommations d'alcool chez la femme enceinte et (ii) des ETCAF chez le nouveau né, il est nécessaire d'étudier l'impact de la grossesse sur ce biomarqueur, de préciser la ou les valeur(s) seuil(s) d'interprétation(s) appropriée(s) dans ce contexte et de comparer sa sensibilité aux autoquestionnaires et aux autres biomarqueurs. C'est l'objet du protocole AUTOQUEST, dont les inclusions doivent démarrer en début d'année 2023 et dont les résultats pourraient améliorer la prévention voire le dépistage des ETCAF.

2. Toxicologie médico-légale

2.1. Chez le vivant

Il existe, dans différents pays, un intérêt croissant vis-à-vis des applications du PEth dans un cadre médico-légal chez le vivant, en particulier dans la restitution des permis de conduire à la suite d'une conduite de véhicules sous l'influence de l'alcool. En France, la nature des examens biologiques prescrits dans le cadre du dossier de restitution du permis de conduire n'est pas fixée nationalement. Effectivement, chaque commission préfectorale en charge de ces dossiers décide des biomarqueurs qu'elle considère comme pertinents dans leurs instructions. La CDT est probablement le biomarqueur le plus prescrit dans ce cadre. A l'international plusieurs institutions ont basculé vers l'utilisation du PEth, notamment en Belgique et en Suisse (21-22). Ce changement vient probablement du fait que le PEth détecte plus précocement un changement d'habitude de consommation. En effet, contrairement aux biomarqueurs indirects dont fait partie la CDT et à l'éthylglucuronide dans les cheveux dont la latence est due à la vitesse de pousse de sa matrice (1 cm/mois), le PEth décroît de façon *quasi* immédiate. Le PEth est utilisé dans d'autres dossiers et périmètres médico-légaux comme dans les affaires familiales (66), les cas soumissions chimiques, etc.

2.2. En *post-mortem*

L'utilisation du PEth en *post-mortem* est très peu documentée. Les articles retrouvés sont, d'un point de vue analytique, obsolète de par les outils analytiques utilisés ne permettant pas la dissociation des PEths et leurs limites de quantification s'approchant de la valeur seuil d'interprétation de 200 µg/L (94). C'est de ce constat que nous avons initié, en collaboration avec l'institut médico-légal de Lille, le protocole *in cadaver*. Dans ce protocole, deux prélèvements sanguins sont effectués, un lors de la levée de corps à l'aide de VAMS de type Mitra™, et un second au cours de l'autopsie. Le but de ces prélèvements est de (i) constituer des données sur le phosphatidyléthanol en *post-mortem* en le comparant aux autres biomarqueurs analysés et (ii) étudier l'impact du délai entre la levée de corps et l'autopsie sur ces résultats. Outre *in cadaver*, le PEth est utilisé ponctuellement dans des cas de recherche de causes des morts pour lesquels les habitudes de consommations de la victime ou de l'accusé est d'importance, ou lorsque l'évaluation de la consommation d'alcool est rendue difficile par l'indisponibilité de certaines matrices (e.g. l'humeur vitrée et l'urine), ou par un délai trop important séparant le décès du moment du prélèvement du moment.

L'EtG sanguin peut, quant à lui, remplacer l'EtG urinaire lorsque seul du sang est disponible. Il peut également faire partie du faisceau d'indices permettant à l'expert de statuer sur les résultats d'éthanolémie et notamment sur la présence de formation *post-mortem* d'éthanol.

CONCLUSION

Dans cette thèse, nous avons présenté les marqueurs biologiques à disposition des cliniciens dans la détection d'une consommation d'alcool. Nous avons situé le phosphatidyléthanol parmi ces biomarqueurs et présenté les différentes phases du développement de sa méthode de dosage dans le sang. Malgré les difficultés préanalytiques et analytiques imposées par le développement de cette méthode de dosage associant plusieurs biomarqueurs de caractéristiques éloignées, cette méthode est validée selon la norme EN ISO 15189 et accréditée par le Comité Français d'Accréditation.

Les résultats des tests de stabilité du PEth s'associent aux données présentes dans la littérature et confirment (i) l'instabilité et la néoformation en présence d'éthanol du PEth à température ambiante, (ii) l'absence de néoformation et la stabilité relative de cet analyte à 4 °C (4 jours) et (iii) l'absence de néoformation et la stabilité du PEth dans les DBS pendant 6 mois.

Ces résultats permettent également d'émettre des recommandations quant au stockage et au transport des échantillons. Les tests de néoformation du PEth dans le tube de sang en présence d'éthanol indiquent la nécessité de conserver les tubes pendant un délai inférieur à 4 heures à 4 °C avant leur analyse, ou de transférer un volume précis de sang sur un buvard, soit au laboratoire soit par un dispositif de type VAMS, pour son stockage ou son transport.

L'application de cette méthode en routine a permis de démontrer l'intérêt de ce biomarqueur dans différents domaines. En transplantation hépatique, en association avec l'éthylglucuronide urinaire, il a montré sa plus grande sensibilité face au gold standard actuel (la CDT). En addictologie, dans le suivi de sevrage hospitalier dans le cadre de l'étude PETHOXICO, il a montré tout l'intérêt d'un biomarqueur dont l'élimination est *quasi* immédiate, permettant une estimation des consommations à l'admission et une visualisation de l'abstinence pendant l'hospitalisation. Les résultats de PETHOXICO confortent globalement les données retrouvées dans la littérature, que ce soit pour la valeur seuil d'interprétation de 200 µg/L mais aussi pour la demi-vie d'élimination du PEth 16:0/18:1. Ces résultats confirment également la demi-vie inférieure du PEth 16:0/20:4 dans une moindre mesure que ce qui était annoncé dans la littérature (environ 4 jours contre 2 jours). En obstétrique, il a montré son intérêt dans le dépistage des troubles causés par l'alcoolisation fœtale et fait l'objet d'une étude dont l'objectif est d'évaluer la valeur diagnostique de l'autoquestionnaire T-ACE, proposé dans les maternités de la région Nord de la France afin d'améliorer la prévention de la consommation d'alcool chez la femme enceinte.

Les perspectives apportées par ce travail sont multiples. En toxicologie biologique par des protocoles dans des domaines variés afin d'étudier l'intérêt de ce biomarqueur dans diverses populations et situations. En toxicologie médico-légale pour développer son utilisation en France en se basant sur la démarche de plusieurs pays dans lesquels il remplace ou complète les biomarqueurs usuels. Le phosphatidyléthanol est un biomarqueur qui soulève néanmoins de nombreuses questions encore sans réponse dans la littérature. Les variabilités inter voire intra-individuelles en font partie et nécessitent des études complémentaires. Le manque d'homogénéité dans les études internationales publiées, que ce soit dans la définition d'une unité standard d'alcool, dans les valeurs d'interprétations du PEth, dans les précisions analytiques ou dans les homologues du PEth à doser, ne facilite pas le croisement des données. C'est pourquoi nous avons participé au premier consensus international sur l'utilisation du PEth en pratique clinique comme médico-légale à Basel. La publication de ce consensus de juin 2022 facilitera vraisemblablement l'utilisation généralisée de ce biomarqueur.

REFERENCES

1. Beck F, Richard J-B. Alcohol use in France. *Presse Med* [Internet]. 2014;43(10 Pt 1):1067–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lpm.2014.02.027>
2. Richard JB, Andler R, Cogordan C, Spilka S. La consommation d'alcool chez les adultes en France en 2017. *Bull Epidémiol Hebd*. 2017;2019:89–97.
3. Guérin S, Laplanche A, Dunant A, Hill C. Alcohol-attributable mortality in France. *Eur J Public Health* [Internet]. 2013;23(4):588–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/eurpub/ckt015>
4. Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm). Alcool : Effets sur la santé. Synthèses et recommandations. In: Collection Expertise collective Inserm. Les éditions Inserm; 2001. p. 169.
5. Goullé J-P, Guerbet M. Éthanol : pharmacocinétique, métabolisme et méthodes analytiques. *Ann Pharm Fr* [Internet]. 2015;73(5):313–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharma.2015.03.003>
6. Goullé J, Lacroix C. Alcoolémie : aspects médico-légaux. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2001;59(4).
7. Mitchell MC Jr, Teigen EL, Ramchandani VA. Absorption and peak blood alcohol concentration after drinking beer, wine, or spirits. *Alcohol Clin Exp Res* [Internet]. 2014;38(5):1200–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/acer.12355>
8. Lands WE. A review of alcohol clearance in humans. *Alcohol* [Internet]. 1998;15(2):147–60. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0741-8329\(97\)00110-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0741-8329(97)00110-9)
9. Santé publique France. AVIS D'EXPERTS RELATIF À L'ÉVOLUTION DU DISCOURS PUBLIC EN MATIÈRE DE CONSOMMATION D'ALCOOL EN FRANCE [Internet]. 2017. [Santepubliquefrance.fr](https://www.santepubliquefrance.fr). [cited 2022 Jul 18]. Available from: <https://www.santepubliquefrance.fr/content/download/8230/file/avis-alcool-040517.pdf>
10. Spithoff S. Prise en charge en soins primaires des troubles liés à l'usage d'alcool et de la consommation à risque 2015;61:259–65. 2015;61:259–65.
11. Andler R, Richard JB, Cogordan C, Deschamps V, Escalon H, Nguyen-Thanh V. Nouveau repère de consommation d'alcool et usage : résultats du Baromètre de Santé publique France 2017. *Bull Epidémiol Hebd*. 2019;
12. Société Française d'Alcoologie. Mésusage de l'alcool : dépistage, diagnostic et traitement. Recommandation de bonne pratique. *Alcoologie et Addictologie* [Internet]. 2015 [cited 2022 Jul 18];37(1):5–84. Available from: <https://www.alcoologie-et-addictologie.fr/index.php/aa/article/view/570>
13. Drinking levels defined [Internet]. Nih.gov. [cited 2022 Jul 18]. Available from: <https://www.niaaa.nih.gov/alcohol-health/overview-alcohol-consumption/moderate-binge-drinking>
14. WHO. International guide for monitoring alcohol consumption and related Harm [Internet]. 2000. *Who.int*. [cited 2022 Jul 18]. Available from:

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66529/WHO_MSD_MSB_00.4.pdf?sequence=1&isAllowed=y

15. HAS. Troubles causés par l'alcoolisation foetale : repérage [Internet]. Has-sante.fr. [cited 2022 Jul 18]. Available from: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2014-03/troubles_causés_par_l'alcoolisation_foetale_reperage-_rapport_delaboration.pdf
16. Celli R, Zhang X. Pathology of alcoholic liver disease. *J Clin Transl Hepatol* [Internet]. 2014;2(2):103–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.14218/JCTH.2014.00010>
17. Nguyen VL, Haber PS, Seth D. Applications and challenges for the use of phosphatidylethanol testing in liver disease patients (mini review). *Alcohol Clin Exp Res* [Internet]. 2018;42(2):238–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/acer.13558>
18. Fleming MF, Smith MJ, Oslakovic E, Lucey MR, Vue JX, Al-Saden P, et al. Phosphatidylethanol detects moderate-to-heavy alcohol use in liver transplant recipients. *Alcohol Clin Exp Res* [Internet]. 2017;41(4):857–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/acer.13353>
19. Lim J, Sundaram V. Risk factors, scoring systems, and interventions for alcohol relapse after liver transplantation for alcoholic liver disease: Alcohol Relapse After LT. *Clin Liver Dis*. 2018;11(5):105–10.
20. Goullé JP, Lacroix C, *Journal de Médecine Légale Droit Médical* 2000;43:17-32
21. Schröck A, Pfäffli M, König S, Weinmann W. Application of phosphatidylethanol (PEth) in whole blood in comparison to ethyl glucuronide in hair (hEtG) in driving aptitude assessment (DAA). *Int J Legal Med* [Internet]. 2016;130(6):1527–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00414-016-1394-4>
22. Kummer N, Wille SMR, Poll A, Lambert WEE, Samyn N, Stove CP. Quantification of EtG in hair, EtG and EtS in urine and PEth species in capillary dried blood spots to assess the alcohol consumption in driver's licence regranting cases. *Drug Alcohol Depend* [Internet]. 2016;165:191–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2016.06.012>
23. Pélissier-Alicot A-L. La redistribution post mortem : état des lieux en 2016. *Ann Toxicol Anal* [Internet]. 2016;28(2):103–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxac.2015.12.004>
24. Pelissier-Alicot A-L, Coste N, Bartoli C, Piercecchi-Marti M-D, Sanvoisin A, Gouvernet J, et al. Comparison of ethanol concentrations in right cardiac blood, left cardiac blood and peripheral blood in a series of 30 cases. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2006;156(1):35–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.12.008>
25. Sastre C, Baillif-Couniou V, Musarella F, Bartoli C, Mancini J, Piercecchi-Marti M-D, et al. Can subclavian blood be equated with a peripheral blood sample? A series of 50 cases. *Int J Legal Med* [Internet]. 2013;127(2):379–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00414-012-0736-0>

26. Martin M, Alvarez JC. Positive blood ethanol concentration without alcohol consumption in the living subject: The auto-brewery syndrome. Clinical and forensic consequences. *Toxicol Anal Clin*. 2020;32(3):194–9.
27. Boumba VA, Ziavrou KS, Vougiouklakis T. Biochemical pathways generating post-mortem volatile compounds co-detected during forensic ethanol analyses. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2008;174(2–3):133–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.03.018>
28. Boumba VA, Economou V, Kourkoumelis N, Gousia P, Papadopoulou C, Vougiouklakis T. Microbial ethanol production: experimental study and multivariate evaluation. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2012;215(1–3):189–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.03.003>
29. Pajunen T, Vuori E, Lunetta P. Epidemiology of alcohol-related unintentional drowning: is post-mortem ethanol production a real challenge? *Inj Epidemiol* [Internet]. 2018;5(1):39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40621-018-0169-4>
30. Nassibou S, Richeval C, Wiat J-F, Hakim F, Allorge D, Gaulier J-M. In heroin-related fatalities, testing for 6-acetylmorphine in vitreous humor seems to be of higher sensitivity than in blood or urine. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2021;44(9):e9–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jat/bkaa116>
31. Ioan BG, Jitaru V, Damian R, Damian SI. Study on the relationship between the concentration of ethanol in the blood, urine and the vitreous humour. *Rom J Leg Med* [Internet]. 2015;23(3):211–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.4323/rjlm.2015.211>
32. Lemaire E, Schmidt C, Denooz R, Charlier C, Boxho P. Popliteal vein blood sampling and the postmortem redistribution of diazepam, methadone, and morphine. *J Forensic Sci* [Internet]. 2016;61(4):1017–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/1556-4029.13061>
33. Heier C, Xie H, Zimmermann R. Nonoxidative ethanol metabolism in humans-from biomarkers to bioactive lipids: Nonoxidative Ethanol Metabolism in Humans. *IUBMB Life*. 2016;68:916–23.
34. Wang L, Zhang W, Wang R, Guang Y, Zhang D, Zhang C, et al. Estimating the time of last drinking from blood ethyl glucuronide and ethyl sulphate concentrations. *Sci Rep* [Internet]. 2022;12(1):14262. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-18527-8>.
35. Shukla L, Sharma P, Ganesha S, Ghadigaonkar D, Thomas E, Kandasamy A et al. Value of Ethyl Glucuronide and Ethyl Sulfate in Serum as Biomarkers of Alcohol Consumption. *Indian J Psychol Med*. 2017;39(4):481-487. Available from: http://dx.doi.org/10.4103/IJPSYM.IJPSYM_71_17.
36. Kintz P. 2014 consensus for the use of alcohol markers in hair for assessment of both abstinence and chronic excessive alcohol consumption. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2015;249:A1-2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.11.001>

37. Andraus M, Appenzeller B, Baumgartner M, Binz T, Crunelle C, Favretto D et al. 2019 Consensus for the use of alcohol markers in hair for supporting the assessment of abstinence and chronic alcohol consumption [Internet]. Soht.org. [cited 2022 Jul 18]. Available from: https://www.soht.org/images/pdf/Revision_2019_Alcoholmarkers.pdf
38. Lopez-Cruzan M, Roache JD, Hill-Kapturczak N, Karns-Wright TE, Dougherty DM, Sanchez JJ, et al. Pharmacokinetics of phosphatidylethanol 16:0/20:4 in human blood after alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res* [Internet]. 2018;42(11):2094–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/acer.13865>
39. Pergolizzi J, Breve F, Magnusson P, LeQuang JAK, Varrassi G. Cocaethylene: When cocaine and alcohol are taken together. *Cureus* [Internet]. 2022;14(2):e22498. Available from: <http://dx.doi.org/10.7759/cureus.22498>
40. Hartmann S, Aradottir S, Graf M, Wiesbeck G, Lesch O, Ramskogler K, et al. Phosphatidylethanol as a sensitive and specific biomarker: comparison with gamma-glutamyl transpeptidase, mean corpuscular volume and carbohydrate-deficient transferrin. *Addict Biol* [Internet]. 2007;12(1):81–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1369-1600.2006.00040.x>
41. Helander A, Hansson T. National harmonization of the alcohol biomarker PEth. *Lakartidningen*. 2013;110(39–40):1747–8.
42. Walther L, de Bejczy A, Löf E, Hansson T, Andersson A, Guterstam J, et al. Phosphatidylethanol is Superior to Carbohydrate-Deficient Transferrin and γ -Glutamyltransferase as an Alcohol Marker and is a Reliable Estimate of Alcohol Consumption Level. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015 Nov;39(11):2200–8.
43. Arnts J, Vanlerberghe BTK, Roozen S, Crunelle CL, Masclee AAM, Olde-Damink SWM, et al. Diagnostic accuracy of biomarkers of alcohol use in patients with liver disease: A systematic review. *Alcohol Clin Exp Res* [Internet]. 2021;45(1):25–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/acer.14512>
44. Hahn JA, Murnane PM, Vittinghoff E, Muyindike WR, Emenyonu NI, Fatch R, et al. Factors associated with phosphatidylethanol (PEth) sensitivity for detecting unhealthy alcohol use: An individual patient data meta-analysis. *Alcohol Clin Exp Res* [Internet]. 2021;45(6):1166–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/acer.14611>
45. Gicquel T, Lepage S, Morel I. Ethylglucuronide et éthylsulfate, marqueurs biologiques de la consommation d'alcool. *Rev francoph lab* [Internet]. 2016;2016(479):69–74. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s1773-035x\(16\)30050-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1773-035x(16)30050-8)
46. Politi L, Morini L, Leone F, Poletti A. Ethyl glucuronide in hair: is it a reliable marker of chronic high levels of alcohol consumption? *Addiction* [Internet]. 2006;101(10):1408–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1360-0443.2006.01537.x>
47. Morinaga M, Kon K, Uchiyama A, Fukada H, Fukuhara K, Yaginuma R, et al. Carbohydrate-deficient transferrin is a sensitive marker of alcohol consumption in fatty liver

- disease. *Hepatol Int* [Internet]. 2022;16(2):348–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12072-022-10298-8>
48. Van Uytvanghe K, Heughebaert L, Abatih E, Stove CP. Set-up of a population-based model to verify alcohol abstinence via monitoring of the direct alcohol marker phosphatidylethanol 16:0/18:1. *Addiction* [Internet]. 2022;117(7):2108–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/add.15811>
49. Berg T, Eliassen E, Jørgenrud B, Kabashi S, Petukhov A, Bogstrand ST. Determination of phosphatidylethanol 16:0/18:1 in whole blood by 96-well supported liquid extraction and UHPLC-MS/MS. *J Clin Lab Anal* [Internet]. 2019;33(1):e22631. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.22631>
50. Smith JM, Jones SP, White LD. Inhibition of the metabolism of phosphatidylethanol and phosphatidic acid, and stimulation of insulin release, by propranolol in intact pancreatic islets. *Biochem Pharmacol*. 1991;41:1–4.
51. Alling C, Gustavsson L, Anggård E. An abnormal phospholipid in rat organs after ethanol treatment. *FEBS Lett* [Internet]. 1983;152(1):24–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)80474-8](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(83)80474-8)
52. Gustavsson L, Alling C. Formation of phosphatidylethanol in rat brain by phospholipase D. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1987;142(3):958–63. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291x\(87\)91507-5](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291x(87)91507-5)
53. Kobayashi M, Kanfer JN. Phosphatidylethanol formation via transphosphatidylation by rat brain synaptosomal phospholipase D. *J Neurochem* [Internet]. 1987;48(5):1597–603. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.1987.tb05707.x>
54. Frohman MA. The phospholipase D superfamily as therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2015;36(3):137–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2015.01.001>
55. Siddiqi AR, Srajer GE, Leslie CC. Regulation of human PLD1 and PLD2 by calcium and protein kinase C. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* [Internet]. 2000;1497(1):103–14. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4889\(00\)00049-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4889(00)00049-5)
56. Pai JK, Liebl EC, Tettenborn CS, Ikegwonu FI, Mueller GC. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activates the synthesis of phosphatidylethanol in animal cells exposed to ethanol. *Carcinogenesis* [Internet]. 1987;8(1):173–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/8.1.173>
57. Lundqvist C, Alling C, Aradottir S, Gustavsson L. Agonist-stimulated and basal phosphatidylethanol formation in neutrophils from alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* [Internet]. 1994;18(3):580–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1530-0277.1994.tb00913.x>

58. Aradóttir S, Moller K, Alling C. Phosphatidylethanol formation and degradation in human and rat blood. *Alcohol Alcohol* [Internet]. 2004;39(1):8–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/alcalc/agh003>
59. Holbrook PG, Pannell LK, Murata Y, Daly W. Molecular species analysis of a product of phospholipase D activation. Phosphatidylethanol is formed from phosphatidylcholine in phorbol ester- and bradykinin-stimulated PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267:16834–40.
60. Kummer N, Ingels A-S, Wille SMR, Hanak C, Verbanck P, Lambert WEE, et al. Quantification of phosphatidylethanol 16:0/18:1, 18:1/18:1, and 16:0/16:0 in venous blood and venous and capillary dried blood spots from patients in alcohol withdrawal and control volunteers. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2016;408(3):825–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-015-9169-1>
61. Javors MA, Hill-Kapturczak N, Roache JD, Karns-Wright TE, Dougherty DM. Characterization of the pharmacokinetics of phosphatidylethanol 16:0/18:1 and 16:0/18:2 in human whole blood after alcohol consumption in a clinical laboratory study. *Alcohol Clin Exp Res* [Internet]. 2016;40(6):1228–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/acer.13062>
62. Shield KD, Parry C, Rehm J. Chronic diseases and conditions related to alcohol use. *Alcohol Res*. 2013;35(2):155–73.
63. Rowland A, Miners JO, Mackenzie PI. The UDP-glucuronosyltransferases : Their role in drug metabolism and detoxification. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45:1121–32.
64. Schröck A, Thierauf-Emberger A, Schürch S, Weinmann W. Phosphatidylethanol (PEth) detected in blood for 3 to 12 days after single consumption of alcohol—a drinking study with 16 volunteers. *Int J Legal Med* [Internet]. 2017;131(1):153–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00414-016-1445-x>
65. Hill-Kapturczak N, Dougherty DM, Roache JD, Karns-Wright TE, Javors MA. Differences in the synthesis and elimination of phosphatidylethanol 16:0/18:1 and 16:0/18:2 after acute doses of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* [Internet]. 2018;42(5):851–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/acer.13620>
66. Ulwelling W, Smith K. The PEth Blood Test in the Security Environment: What it is; Why it is Important; and Interpretative Guidelines. *J Forensic Sci* [Internet]. 2018;63(6):1634–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/1556-4029.13874>
67. Nguyen VL, Fitzpatrick M. Should phosphatidylethanol be currently analysed using whole blood, dried blood spots or both? *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2019;57(5):617–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2018-0667>
68. Van Der Nagel B, Wassenaar S, Bahmany S, Koch B. Quantification of Phosphatidylethanol in Whole Blood as a Proxy for Chronic Alcohol Consumption, Using

Ultra Performance Convergence Chromatography Tandem Mass Spectrometry: Ther Drug Monit. 2018;40:268–75.

69. Andreassen TN, Havnen H, Spigset O, Falch BMH, Skråstad RB. High throughput UPLC®-MSMS method for the analysis of phosphatidylethanol (PEth) 16:0/18:1, a specific biomarker for alcohol consumption, in whole blood. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2018;42(1):33–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jat/bkx075>
70. Kummer N, Lambert WEE, Samyn N, Stove CP. Alternative sampling strategies for the assessment of alcohol intake of living persons. *Clin Biochem* [Internet]. 2016;49(13–14):1078–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.05.007>
71. Helander A, Zheng Y. Molecular species of the alcohol biomarker phosphatidylethanol in human blood measured by LC-MS. *Clin Chem* [Internet]. 2009;55(7):1395–405. Available from: <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.120923>
72. Beck O, Kenan Modén N, Seferaj S, Lenk G, Helander A. Study of measurement of the alcohol biomarker phosphatidylethanol (PEth) in dried blood spot (DBS) samples and application of a volumetric DBS device. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2018;479:38–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2018.01.008>
73. Faller A, Richter B, Kluge M, Koenig P, Seitz HK, Skopp G. Stability of phosphatidylethanol species in spiked and authentic whole blood and matching dried blood spots. *Int J Legal Med* [Internet]. 2013;127(3):603–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00414-012-0799-y>
74. Bakhireva LN, Shrestha S, Gutierrez HL, Berry M, Schmitt C, Sarangarm D. Stability of phosphatidylethanol in dry blood spot cards. *Alcohol Alcohol* [Internet]. 2016;51(3):275–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/alcalc/agv120>
75. Simon TW. Providing context for phosphatidylethanol as a biomarker of alcohol consumption with a pharmacokinetic model. *Regul Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2018;94:163–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.01.029>
76. Viel G, Boscolo-Berto R, Cecchetto G, Fais P, Nalesso A, Ferrara SD. Phosphatidylethanol in blood as a marker of chronic alcohol use: a systematic review and meta-analysis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2012;13(11):14788–812. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms131114788>
77. Kechagias S, Dernroth DN, Blomgren A, Hansson T, Isaksson A, Walther L, et al. Phosphatidylethanol compared with other blood tests as a biomarker of moderate alcohol consumption in healthy volunteers: A prospective randomized study. *Alcohol Alcohol* [Internet]. 2015;50(4):399–406. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/alcalc/agv038>
78. Déglon J, Lauer E, Sporkert F, Valois N, Favrat B, Thomas A, et al. Analyse du phosphatidyléthanol sur micro-prélèvement de sang séché : nouvel outil pour le suivi de la consommation d'alcool. *Ann Toxicol Anal* [Internet]. 2018;30(2):S42–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxac.2018.04.050>

79. GUIDE TECHNIQUE D'ACCREDITATION DE VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) DES METHODES EN BIOLOGIE MEDICALE [Internet]. Cofrac.fr. [cited 2022 Jul 18]. Available from: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
80. GUIDE TECHNIQUE D'ACCREDITATION: CONTRÔLE DE QUALITE EN BIOLOGIE MEDICALE [Internet]. Cofrac.fr. [cited 2022 Jul 18]. Available from: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-06>
81. Harkey MR. Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci Int* [Internet]. 1993;63(1–3):9–18. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0379-0738\(93\)90255-9](http://dx.doi.org/10.1016/0379-0738(93)90255-9)
82. Cappelle D, Neels H, De Keukeleire S, Franssen E, Dom G, Vermassen A, et al. Ethyl glucuronide in keratinous matrices as biomarker of alcohol use: A correlation study between hair and nails. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2017;279:187–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.08.022>
83. Pragst F, Balikova MA. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2006;370(1–2):17–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2006.02.019>
84. Paul R, Kingston R, Tsanaclis L, Berry A, Guwy A. Do drug users use less alcohol than non-drug users? A comparison of ethyl glucuronide concentrations in hair between the two groups in medico-legal cases. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2008;176(1):82–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.06.025>
85. Foti RS, Fisher MB. Assessment of UDP-glucuronosyltransferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2005;153(2–3):109–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.12.003>
86. Cooper GAA, Kronstrand R, Kintz P, Society of Hair Testing. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2012;218(1–3):20–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.10.024>
87. Lamoureux F, Gaulier J-M, Sauvage F-L, Mercerolle M, Vallejo C, Lachâtre G. Determination of ethyl-glucuronide in hair for heavy drinking detection using liquid chromatography-tandem mass spectrometry following solid-phase extraction. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2009;394(7):1895–901. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-009-2863-0>
88. Biondi A, Freni F, Carelli C, Moretti M, Morini L. Ethyl glucuronide hair testing: A review. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2019;300:106–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.05.004>
89. Kummer N, Wille SMR, Di Fazio V, Ramírez Fernández MDM, Yegles M, Lambert WEE, et al. Impact of the grinding process on the quantification of ethyl glucuronide in hair using

- a validated UPLC–ESI–MS–MS method. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2015;39(1):17–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jat/bku108>
90. Crunelle CL, Yegles M, van Nuijs ALN, Covaci A, De Doncker M, Maudens KE, et al. Hair ethyl glucuronide levels as a marker for alcohol use and abuse: A review of the current state of the art. *Drug Alcohol Depend* [Internet]. 2014;134:1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2013.10.008>
91. Kintz P, Villain M, Vallet E, Etter M, Salquebre G, Cirimele V. Ethyl glucuronide: Unusual distribution between head hair and pubic hair. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2008;176(1):87–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.08.012>
92. Crépin G, Bréart G. ACADÉMIE NATIONALE DE MÉDECINE [Internet]. *Academie-medecine.fr*. [cited 2022 Jul 18]. Available from: <http://www.academie-medecine.fr/wp-content/uploads/2016/03/Rapport-alcoolisation-foetale-d%C3%A9finitif-14-3-16.pdf>
93. Sokol RJ, Martier SS, Ager JW. The T-ACE questions: practical prenatal detection of risk-drinking. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1989;160(4):863–8; discussion 868-70. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378\(89\)90302-5](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378(89)90302-5)
94. Bendroth P, Kronstrand R, Helander A, Greby J, Stephanson N, Krantz P. Comparison of ethyl glucuronide in hair with phosphatidylethanol in whole blood as post-mortem markers of alcohol abuse. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2008;176(1):76–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.09.012>