

**MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE**

**Conformément aux dispositions réglementaires en vigueur tient lieu de
THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Développement, validation, mise en œuvre et application d'une
méthode de dosage d'un biomarqueur de la consommation d'éthanol :
le phosphatidyléthanol sanguin**

Soutenu publiquement le 26 mai 2021, par

Monsieur Florian HAKIM

Membres du jury :

Président :

Mme le Professeur Delphine ALLORGE

PU-PH, PharmD, PhD, HDR

(CHU de Lille, Université de Lille - Faculté de pharmacie)

Assesseur(s) :

M. le Professeur Olivier COTTENCIN

PU-PH, MD, PhD, HDR, Responsable du Service d'Addictologie

(CHU de Lille, Université de Lille - Faculté de médecine)

M. le Docteur Thomas GICQUEL

MCU-PH, PharmD, PhD, HDR (CHU de Rennes)

Directeur de Thèse:

M. le Docteur Jean-Michel GAULIER

PH, PharmD, PhD, HDR (CHU de Lille)

**MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE**

**Conformément aux dispositions réglementaires en vigueur tient lieu de
THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Développement, validation, mise en œuvre et application d'une
méthode de dosage d'un biomarqueur de la consommation d'éthanol :
le phosphatidyléthanol sanguin**

Soutenu publiquement le 26 mai 2021, par

Monsieur Florian HAKIM

Membres du jury :

Président :

Mme le Professeur Delphine ALLORGE

PU-PH, PharmD, PhD, HDR

(CHU de Lille, Université de Lille - Faculté de pharmacie)

Assesseur(s) :

M. le Professeur Olivier COTTENCIN

PU-PH, MD, PhD, HDR, Responsable du Service d'Addictologie

(CHU de Lille, Université de Lille - Faculté de médecine)

M. le Docteur Thomas GICQUEL

MCU-PH, PharmD, PhD, HDR (CHU de Rennes)

Directeur de Thèse:

M. le Docteur Jean-Michel GAULIER

PH, PharmD, PhD, HDR (CHU de Lille)



3, rue du Professeur Laguesse
B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Nicolas POSTEL
Vice-présidente formation :	Lynne FRANJIE
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président relations internationales :	François-Olivier SEYS
Vice-président stratégie et prospective	Régis BORDET
Vice-présidente ressources	Georgette DAL
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-doyen et Assesseur à la recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux relations internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur aux relations avec le monde professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la vie de la Faculté :	Claire PINÇON
Assesseur à la pédagogie :	Benjamin BERTIN
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Victoire LONG

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers			
Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	DEPREUX	Patrick	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire

Professeurs des Universités			
Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique et application de RMN
Mme	DEPREZ	Rebecca	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

Professeurs des Universités (suite)			
Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	DEPREZ	Benoît	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie industrielle
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Éric	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers			
Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie

Maîtres de Conférences			
Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire

Maîtres de Conférences (suite)			
Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale
Mme	CHARTON	Julie	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	FLIPO	Marion	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie

Maîtres de Conférences (suite)			
Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences Végétales et Fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / service innovation pédagogique
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie

Maîtres de Conférences (suite)			
Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Certifiés			
Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps			
Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Hai Pascal	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DHANANI	Alban	Législation et Déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences associés - mi-temps			
Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	GILLOT	François	Législation et Déontologie pharmaceutique

Assistants Hospitalo-Universitaires			
Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

Attachés Temporaire d'Enseignement et de Recherche			
Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	GHARBI	Zied	Biomathématiques
Mme	FLÉAU	Charlotte	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale
M.	RUEZ	Richard	Hématologie
M.	SAIED	Tarak	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
Mme	VAN MAELE	Laurie	Immunologie

Enseignant contractuel			
Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

Faculté de Pharmacie de Lille
3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises
dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

REMERCIEMENTS

A ma présidente de jury :

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 mes juges :

Monsieur le Professeur Olivier COTTENCIN

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

Je suis honoré que vous ayez accepté de juger cette thèse en tant que membre du jury. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre aide dans la mise en place du projet dont cette thèse découle. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements les plus sincères et de mon grand respect.

Monsieur le Docteur Thomas GICQUEL

MCU-PH, Laboratoire de toxicologie, CHU de Rennes

Je suis honoré que tu aies accepté de juger cette thèse en tant que membre du jury. Je garde un très bon souvenir de ta venue au laboratoire, merci pour nos échanges, ta bienveillance et ton accessibilité.

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 ce mémoire. J'ai un grand plaisir à travailler avec toi.

Je tiens également à remercier tout particulièrement :

Mes collègues : Marie, Romain, Alexandr, Corentin, Benjamin, 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 mes stagiaires : Alban, Chloé, Léa, Basile, Farah, Océane, Rémy, Sofia et Théo avec qui j'ai eu la chance de travailler et pour leur grande aide dans le développement et la validation de cette méthode.

Je remercie Jérémy, Fanny, Florent, Vincent, Alice, Sébastien, Audrey, Lucie de m'avoir accueilli dans votre groupe (et aidé pour mes stats).

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 accessoirement d'avoir lu et relu cette thèse).

ABREVIATIONS ET MOTS-CLES

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

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CDT : Carbohydre Deficient Transferrin (transferrine désialylée)

CL : Chromatographie Liquide

CPP : Comité de Protection des Personnes

CYP: Cytochrome P450

DBS: Dried Blood Spot

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

EI : Étalon Interne

ES : 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

HEPT : Hauteur Équivalente de Plateaux Théoriques

LDD : Limite De Détection

LIDQ : Limite Inférieure De Quantification

LSDQ : Limite Supérieure De Quantification

MEOS: Metabolizing Ethanol Oxidative System (système microsomial d'oxydation de l'éthanol)

NIAAA: National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism

PA : Acide Phosphatidique

PC : PhosphatidylCholine

PEth : PhosphatidylEthanol

PLD : PhosphoLipase D

PSI : livre-force par pouce carré

SAF : Syndrome d'Alcoolisation Fœtale

SM : Spectrométrie de Masse

SPE : Solid Phase Extraction

TCAF : Troubles Causés par l'Alcoolisation Fœtale

TUA : Troubles liés à l'Usage d'Alcool

UGT : UDP-Glucuronyl-Transférases

US : Unité standard

VGM : Volume Globulaire Moyen

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Évolution de la quantité d'alcool consommée quotidiennement depuis 1961	24
Figure 2: Mécanismes de la toxicité induite par le métabolisme de l'éthanol	26
Figure 3: Métabolisme oxydatif de l'éthanol	32
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 (18).....	33
Figure 5 : Ethanolémie en mg/dL à jeun (rond vide) et immédiatement après le petit déjeuner (rond plein) d'après William E.M Lands (19)	34
Figure 6: Molécule d'EtG.....	36
Figure 7 : Formation du PEth à partir de la PC.....	41
Figure 8 : Noyau de PEth avec ses deux radicaux R1 et R2.....	41
Figure 9: 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 210 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.....	46
Figure 10: 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 210 µg/L par la droite verte en pointillés et la LIDQ de 20 µg/L par la ligne en pointillés noire.	47
Figure 11: Spectromètre de masse : CL-SM/SM XEVO TQ-S (source : site du fabricant Waters)50	
Figure 12: Courbe de Van Deemter Plot.....	55
Figure 13: Stabilité du PEth 16:0/18:1 dans le tube citraté à température ambiante (n=27).....	59
Figure 14: Stabilité du PEth 16:0/18:1 dans le tube citraté à 4°C (n=26)	60
Figure 15: Stabilité du PEth 16:0/18:1 dans le tube citraté à -20°C (n=28)	61
Figure 16 : Stabilité du PEth 16:0/18:1 sur DBS à température ambiante (n=28).....	62
Figure 17 : Stabilité du PEth 16:0/18:1 dans les DBS et les tubes citratés en fonction de la température.....	62
Figure 18: Evolution de la concentration moyenne en PEth 16:0/18:1 lorsque la concentration initiale de PEth est détectée et de OH non détectée.....	63
Figure 19: Evolution de la concentration moyenne en PEth 16:0/18:1 lorsque la concentration initiale de PEth et d'OH est non détectée	64
Figure 20: Evolution de la concentration moyenne en PEth 16:0/20:4 lorsque la concentration initiale de PEth est détectée et d'OH non détectée	64

Figure 21: Evolution de la concentration moyenne en PEth 16:0/20:4 lorsque la concentration initiale de PEth et d'OH est non détectée.....	64
Figure 22: Evolution de la concentration moyenne en PEth 16:0/18:1 et 16:0/20:4 lorsque la concentration initiale en OH est détectée.....	65
Figure 23: Résultat de l'analyse avec vortex et un temps de diffusion de 10 minutes.....	66
Figure 24: Résultats de l'analyse avec vortex et ultrasons pendant 2 minutes et 10 minutes avec un temps de diffusion de 10 minutes.....	66
Figure 25 : Résultats de l'analyse avec vortex et ultrason pendant 2 minutes et sans puis avec centrifugation 10 minutes (4°C, 15000g).....	67
Figure 26 : Résultats de l'analyse sans et avec agitation avec un temps de diffusion de 10 minutes.....	67
Figure 27: Premiers essais selon la méthode J.Dégion 2018.....	68
Figure 28: Chromatogramme selon la molarité d'acétate d'ammonium (2 mM à gauche et 5 mM à droite).....	69
Figure 29: Chromatogramme selon la molarité d'acétate d'ammonium (10 mM).....	69
Figure 30: Chromatogramme selon le pH (3,7 à gauche et 4,7 à droite).....	69
Figure 31: Chromatogramme selon le débit (de gauche à droite : 0,4 ; 0,45 et 0,5 mL/min).....	70
Figure 32: Chromatogramme selon la température de colonne (de gauche à droite: 60, 50 et 40°C).....	70
Figure 33: Chromatogramme selon la température de colonne (de gauche à droite: 30, 25 et 20°C).....	70
Figure 34: Comparaison des chromatogrammes du gradient le moins efficace (test 11) et du plus efficace (test 20) (Tableau des gradients disponibles en annexe 2).....	71
Figure 35: 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=36, Whiskers 10-90 percentile).....	74
Figure 36: Décroissance du PEth 16:0/18:1 depuis le prélèvement d'admission.....	75
Figure 37: Répartition des concentrations en PEth 16:0/18:1 et 16:0/20:4 entre le prélèvement d'admission et le 2nd prélèvement.....	75
Figure 38: Décroissance du PEth 16:0/20:4 depuis le prélèvement d'admission.....	76
Figure 39: 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).....	76
Figure 40: Demi-vie des PEth 16:0/18:1 et 16:0/20:4 dans une population de patients hospitalisés pour sevrage alcoolique (n=36, Whiskers 10-90 percentile).....	77

Figure 41: 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) 77

Figure 42: 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=26, Whiskers 10-90 percentile)..... 78

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Recommandations des principales sociétés savantes concernant l'alcoolisation aiguë	27
Tableau 2: Recommandations des principales sociétés savantes concernant l'alcoolisation chronique	28
Tableau 3: Récapitulatif des biomarqueurs d'une alcoolisation aiguë (usuels en bleu; peu utilisés en grisé).....	39
Tableau 4: Récapitulatif des biomarqueurs d'une alcoolisation chronique (usuels en bleu; peu utilisés en grisé)	40
Tableau 5: Récapitulatif des études indiquant une valeur seuil d'interprétation d'environ 210 µg/L de PEth.....	44
Tableau 6: Méta-analyse des relations entre les concentrations de PEth et la quantité d'alcool ingérée d'après Ulwelling W. (44).....	45
Tableau 7 : Influence des anticoagulants sur la concentration en PEth sanguin à T0 (n=4, 4 échantillons du même patient pris le même jour à la même heure).....	59
Tableau 8 : Résultats des analyses de temps de contact (0, 5, 10, 20, 30 et 60 minutes) (en µg/L)	66
Tableau 9: Résumé des résultats pré analytiques	68
Tableau 10 : Données de validation de la méthode de dosage sanguin des PEth 16:0/18:1 et 16:0/20:4 sur DBS.....	72
Tableau 11: Questionnaire T-ACE	93

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	23
1 L'ETHANOL.....	24
1.1 L'ALCOOLISATION EN FRANCE	24
1.2 METABOLISME TOXIQUE DE L'ETHANOL	25
1.3 TROUBLES LIES A L'USAGE DE L'ALCOOL ET SEVRAGE	27
1.3.1 Recommandations des différentes autorités de santé sur les risques de la consommation d'alcool	27
1.3.1.1 Alcoolisation aigüe	27
1.3.1.2 Alcoolisation chronique	28
1.3.2 Définitions	29
1.3.3 Dépistage	29
1.3.4 Alcool et grossesse	29
1.3.5 Hépatopathies alcooliques	30
1.4 PHARMACOCINETIQUE DE L'ETHANOL	31
1.4.1 Absorption, distribution et élimination	31
1.4.2 Métabolisme	31
1.4.2.1 Métabolisme oxydatif	31
1.4.2.2 Métabolisme non oxydatif	32
1.4.3 Variabilité inter-individuelle et intra-individuelle	33
1.4.4 Formation endogène et post-mortem	34
2 LES BIOMARQUEURS DE L'ETHANOL	35
2.1.1 Les marqueurs indirects : liés à des modifications métaboliques chez les alcooliques chroniques	35
2.1.1.1 Transaminases	35
2.1.1.2 VGM	35
2.1.1.3 Gamma-Glutamyl Transférase : enzyme membranaire des hépatocytes	35
2.1.2 Les marqueurs directs (Éthanol et métabolites mineurs)	36
2.1.2.1 Éthanol	36
2.1.2.2 Ethylglucuronide	36
2.1.2.3 Ethyl-Esters d'Acides Gras	37
2.1.2.4 Phosphatidyléthanol	37

2.1.2.5	Ethylsulfate	38
2.1.2.6	Cocaéthylène	38
2.1.3	Marqueurs de l'alcoolisation aiguë et chronique	38
3	LE PHOSPHATIDYLETHANOL	41
3.1	GENERALITES	41
3.2	STABILITE	43
3.3	CUT-OFF ET INTERPRETATION	43
3.4	METHODES D'ANALYSES	47
4	POURQUOI DEVELOPPER CETTE METHODE DE DOSAGE ?	49
 DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE METHODE.....		50
1.	EQUIPEMENT.....	50
2	MATERIEL ET METHODE.....	51
2.1	PHASE PRE-ANALYTIQUE	51
2.1.1	Méthodes de prélèvement	51
2.1.1.1	Dispositifs de prélèvement capillaires volumétriques	51
2.1.1.2	Tube de sang	51
2.1.2	Transfert sur papier buvard	51
2.1.2.1	Pipette de précision	51
2.1.2.2	Test de contamination de la poinçonneuse	52
2.1.2.3	Temps de séchage des taches de sang sur buvards	52
2.1.3	stabilité in vitro du PEth	52
2.1.3.1	Stabilité sur tube de sang total	52
2.1.3.2	Stabilité sur buvards	53
2.1.3.3	Stabilité post-extraction	53
2.1.3.4	Néoformation in-vitro du PEth	53
2.1.4	Extraction du PEth à partir des DBS	54
2.1.4.1	Choix de la solution d'extraction	54
2.1.4.2	Temps de contact	54
2.1.4.3	Ultrasons	54
2.1.4.4	Centrifugation	54
2.1.4.5	Agitation	54
2.2	PHASE ANALYTIQUE	55
2.2.1	Séparation chromatographique	55

2.2.1.1	Choix de la colonne	55
2.2.1.2	Choix des phases mobiles	55
2.2.1.3	Choix de l'étalon interne	56
2.2.1.4	Molarité de l'acétate d'ammonium	56
2.2.1.5	pH	56
2.2.1.6	Débit de la phase mobile	56
2.2.1.7	Température de colonne	56
2.2.1.8	Gradients de phases mobiles	57
2.2.2	Essai de vérification de stabilité	57
2.2.2.1	Stabilité des phases mobiles	57
2.2.2.2	Stabilité des solutions mères méthanoliques	57
2.2.3	Validation	58
2.2.3.1	Procédure de validation	58
3	RESULTATS.....	58
3.1	PHASE PRE ANALYTIQUE	58
3.1.1	Multipipette	58
3.1.2	Contamination de la poinçonneuse	58
3.1.3	Temps de séchage des DBS	58
3.1.4	Essai de stabilité in vitro du PEth	59
3.1.4.1	Influence de l'anticoagulant	59
3.1.4.2	Influence de la température	59
3.1.4.3	Post-extraction	63
3.1.4.4	Néoformation in-vitro de PEth	63
3.1.5	Extraction du PEth à partir des DBS	65
3.1.5.1	Choix de la solution d'extraction	65
3.1.5.2	Temps de contact	65
3.1.5.3	Ultrasons	66
3.1.5.4	Centrifugation	67
3.1.5.5	Agitation	67
3.1.5.6	Synthèse pré analytique	67
3.2	PHASE ANALYTIQUE	68
3.2.1	Premiers essais	68
3.2.2	Molarité	69
3.2.3	pH	69

3.2.4 Débit de la phase mobile	70
3.2.5 Température de colonne	70
3.2.6 Gradients des phases mobiles	71
3.2.7 Infusion du PEth	71
3.2.8 Validation	71
<u>APPLICATION : PROTOCOLE DE RECHERCHE PETHOXICO</u>	<u>73</u>
1 MISE EN ŒUVRE	73
2 RESULTATS	73
<u>CONCLUSION</u>	<u>79</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE.....</u>	<u>81</u>
<u>ANNEXES</u>	<u>87</u>

INTRODUCTION

Préambule : dans ce document, sous le terme d'« alcool », c'est bien l' « éthanol » qui est désigné. Ce terme d'alcool est utilisé ici par commodité et par souci de fluidité dans le propos.

L'éthanol est un toxique communément consommé et dont l'abus chronique est associé à de nombreux problèmes sociétaux et pathologies. Actuellement, les biomarqueurs directs utilisés en routine pour détecter une consommation d'alcool permettent d'estimer la consommation d'alcool des dernières heures, voire des derniers jours. Cette fenêtre de détection relativement étroite ne permet pas de répondre à de nombreuses situations. Par exemple, dans le cas d'un suivi de sevrage alcoolique, une fois dépassée la fenêtre de détection des biomarqueurs directs actuels (maximum 72 h), le clinicien ne dispose plus d'outils pour objectiver l'abstinence du patient. Les biomarqueurs indirects, outre leurs spécificités perfectibles, ne commencent à décroître qu'après une phase de latence ne permettant pas un suivi « en temps réel » du sevrage. Ainsi, afin de mettre à disposition des cliniciens un biomarqueur direct disposant d'une fenêtre de détection accrue (de l'ordre de 28 jours), quantitatif et cumulatif et dont la décroissance après l'arrêt de la consommation d'alcool est quasi immédiate, nous avons développé la méthode de dosage sanguin du phosphatidyléthanol (PEth).

L'objectif de ce travail est d'apporter un exemple concret de l'utilisation du phosphatidyléthanol en pratique clinique et ainsi démontrer sa plus-value parmi les biomarqueurs de la consommation d'alcool utilisés en routine.

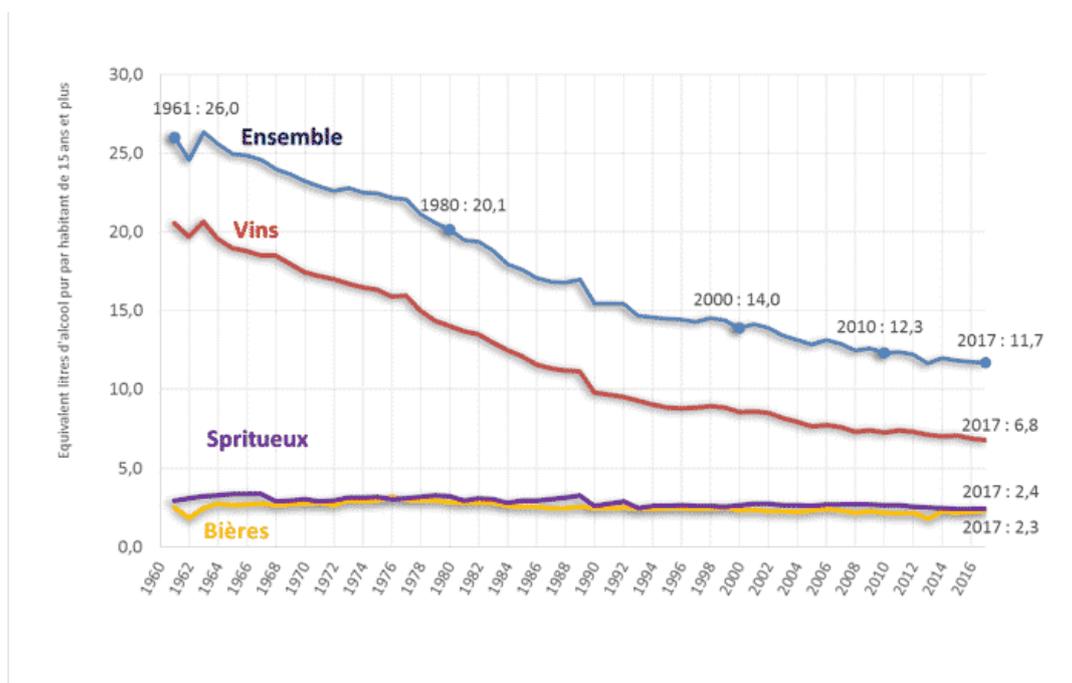
Pour cela, nous commencerons ce travail par replacer l'alcool dans son contexte épidémiologique et toxicologique et ferons un rappel des recommandations actuelles quant aux risques liés à sa consommation. Nous détaillerons ensuite les différents biomarqueurs utilisés pour détecter une consommation aiguë comme chronique d'éthanol ainsi que leurs avantages et inconvénients avant de se concentrer 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 seront exposés. Nous verrons ensuite l'étape de validation de cette méthode analytique en suivant la norme NF EN ISO 15189. Nous aboutirons aux résultats du projet de recherche clinique PETHOXICO, en collaboration avec le service d'addictologie du CHU de Lille, dont l'objectif est notamment de confronter les résultats du dosage de phosphatidyléthanol sanguin de patients consommateurs chroniques et excessifs d'éthanol hospitalisés pour un sevrage hospitalier, aux valeurs seuils d'interprétation proposées dans la littérature.

1 L'ETHANOL

1.1 L'ALCOOLISATION EN FRANCE

La France fait partie des pays européens où l'on consomme le plus d'alcool 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.



Source : OMS, groupe IDA, Insee/OFDT

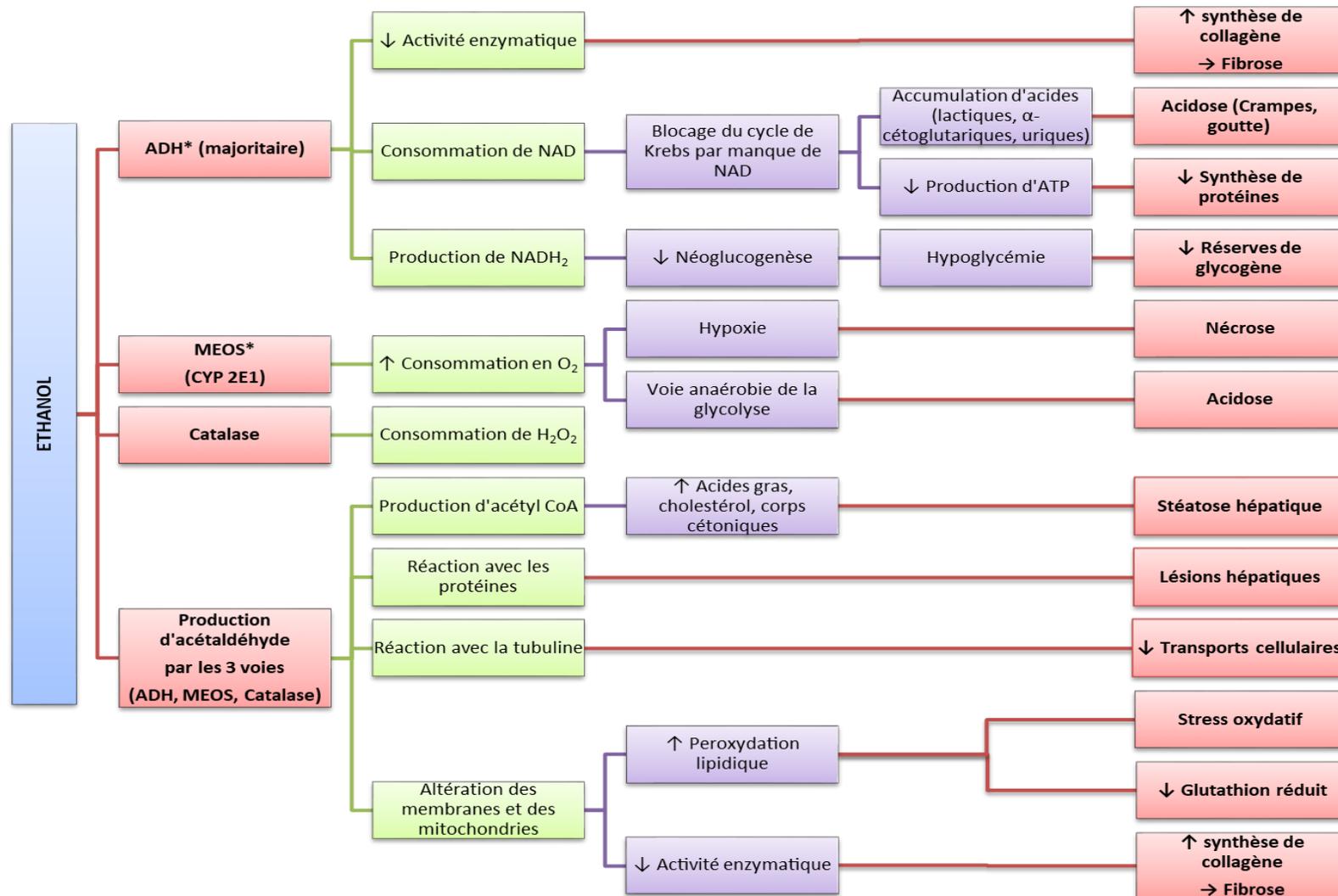
Figure 1: Évolution de la quantité d'alcool consommée quotidiennement depuis 1961

1.2 METABOLISME TOXIQUE DE L'ETHANOL

Il existe plusieurs voies métaboliques de l'éthanol (figure 2) dont le principal métabolite, l'acétaldéhyde, est à l'origine de nombreux mécanismes toxiques. Il se lie notamment à de nombreuses protéines au niveau de groupes thiol (-SH). Sa liaison à la tubuline entraîne une diminution de la polymérisation des microtubules et ainsi une diminution de la sécrétion des protéines qui favorise la séquestration. L'accumulation des vésicules sécrétrices et des protéines entraîne finalement un élargissement des hépatocytes. Ainsi, la rétention de l' α 1-antitrypsine est associée à la progression vers la fibrose et la cirrhose. La liaison de l'acétaldéhyde avec les protéines forme des adduits ce qui diminue l'activité de certaines enzymes et stimule la réponse immunitaire dirigée contre l'épitope de l'acétaldéhyde pouvant contribuer à des lésions hépatiques. La métabolisation de l'alcool 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, induit 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 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 inductible 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

1.3 TROUBLES LIES A L'USAGE DE L'ALCOOL ET SEVRAGE

1.3.1 RECOMMANDATIONS DES DIFFERENTES AUTORITES DE SANTE SUR LES RISQUES DE LA CONSOMMATION D'ALCOOL

Les repères de consommation d'alcool ont fortement évolués dans le temps et ne sont pas homogènes selon les pays et les sociétés savantes. Les unités standards (US) ou doses standards (DS) 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 Etats-Unis.

1.3.1.1 ALCOOLISATION AIGÛE

Un résumé des recommandations actuelles concernant la consommation aigüe d'alcool en France comparées à celles des Etats-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	
Termes utilisés	Recommandations (2019) (5)	Usage à risque (2015) (6)	« Reduced risks » (2021)	« Binge drinking » (2021) (7)	Risque d'une consommation aigüe (2000) (8)	« Heavy episodic drinking » (2000) (8)
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	

1.3.1.2 ALCOOLISATION CHRONIQUE

Un résumé des recommandations actuelles concernant la consommation chroniques d'alcool en France comparées à celles des Etats-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) (5)	Usage à risque (2015) (6)	“Reduced risks” (2021) (7)	“Heavy Alcohol consumption” (2021) (7)	Risque d'une consommation chronique (2000) (8)
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

1.3.2 DEFINITIONS

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

- un consommateur d'alcool à risque, qui est une personne buvant plus que les recommandations pour une consommation d'alcool à faible risque, c'est-à-dire, correspondant à 10 unités standards (US) ou moins par semaine et 2 US ou moins 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).

1.3.3 DEPISTAGE

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 présentent une consommation d'alcool à risque ou des TUA. 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).

1.3.4 ALCOOL ET GROSSESSE

L'incidence des troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF) 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 TCAF vont de la difficulté dans les apprentissages ou l'adaptation sociale, au Syndrome d'Alcoolisation Fœtale (SAF). Ce syndrome étant la forme la plus sévère, elle comprend une dysmorphie faciale (fentes palpébrales raccourcies, sillon naso-labial 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, quel que soit la quantité. En effet, les doses minimales n'entraînant pas de conséquences pour le fœtus ne sont pas connues. Toutefois, une consommation supérieure à un verre par jour semble constituer un risque significatif. L'élément premier du dépistage des TCAF 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 moyens. 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-psycho-social de type motivationnel soit mis en place. (11)

1.3.5 HEPATOPATHIES ALCOOLIQUES

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 (12). 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 de façon efficace. C'est dans ce cadre que l'utilisation des biomarqueurs de la consommation d'éthanol tels que le phosphatidyléthanol (PEth) sanguin est essentielle (13).

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 (14,15).

1.4 PHARMACOCINETIQUE DE L'ETHANOL

1.4.1 ABSORPTION, DISTRIBUTION ET ELIMINATION

L'éthanol est principalement absorbé par voie digestive (25 % par l'estomac, 75 % par l'intestin grêle) (16). 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 médicaments...). La pénétration par voie pulmonaire est importante (environ 60 %) et nécessite, en cas d'exposition importante, le port de protections respiratoires. La pénétration cutanée doit être prise en compte en cas de lésions ou chez les nouveau-nés et 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 foeto-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 %) (17).

1.4.2 METABOLISME

1.4.2.1 METABOLISME 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'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'ALDH (NAD⁺ dépendante, population asiatique, disulfirame) 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 (NADPH⁺ → NADP⁺) 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 (17).

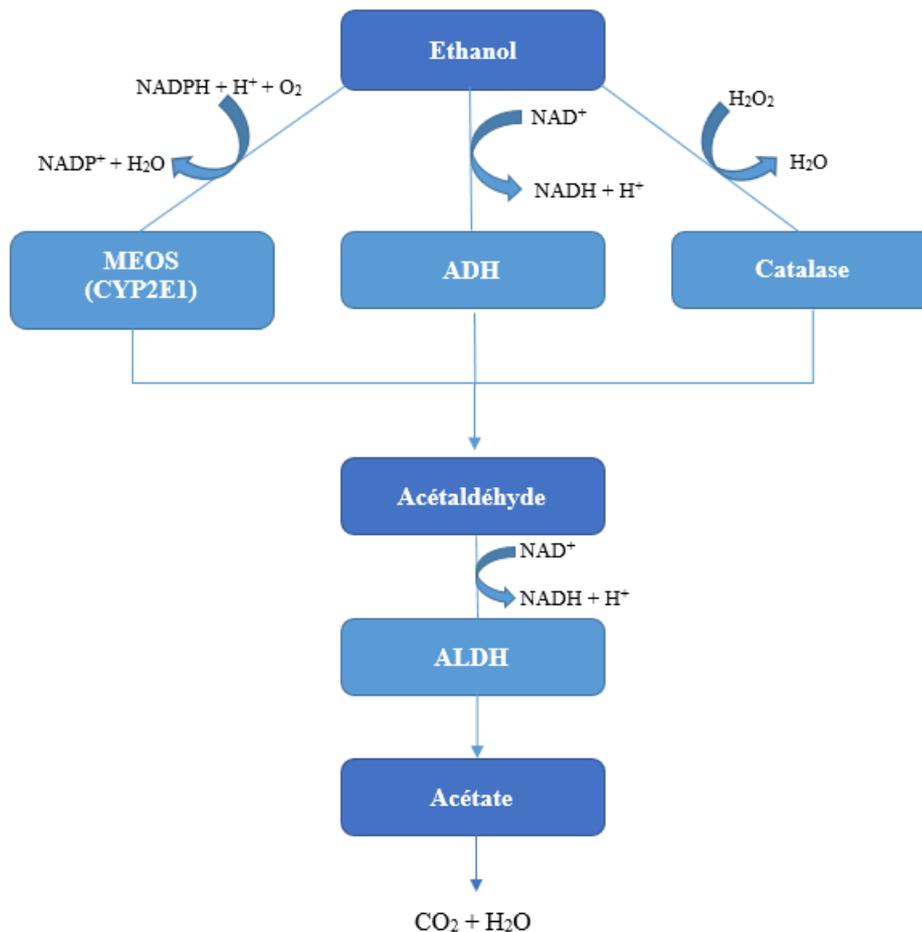


Figure 3: Métabolisme oxydatif de l'éthanol

1.4.2.2 METABOLISME 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 :

- Esters éthyliques d'acides gras (FAEE) : 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.

- Phosphatidyléthanol (PEth) : l'éthanol se lie au phosphate libéré de la phosphatidylcholine après action de la phospholipase D sur la membrane des érythrocytes.

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

- Ethylglucuronide (EtG) : l'éthanol se conjugue à l'acide glucuronique sous l'action d'une glucuronosyl transférase (17).

1.4.3 VARIABILITE INTER-INDIVIDUELLE ET INTRA-INDIVIDUELLE

La pharmacocinétique de l'éthanol varie selon les individus (variabilité inter-individuelle) notamment en fonction du sexe, de l'âge, du poids, du métabolisme. Elle varie également chez un même individu (variabilité intra-individuelle) selon le degré alcoolique des boissons consommées (figure 4)(18), du moment de la prise (avant ou après un repas, figure 5)(19) mais également selon le profil de consommation du sujet (occasionnel ou chronique)(17). 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) :

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

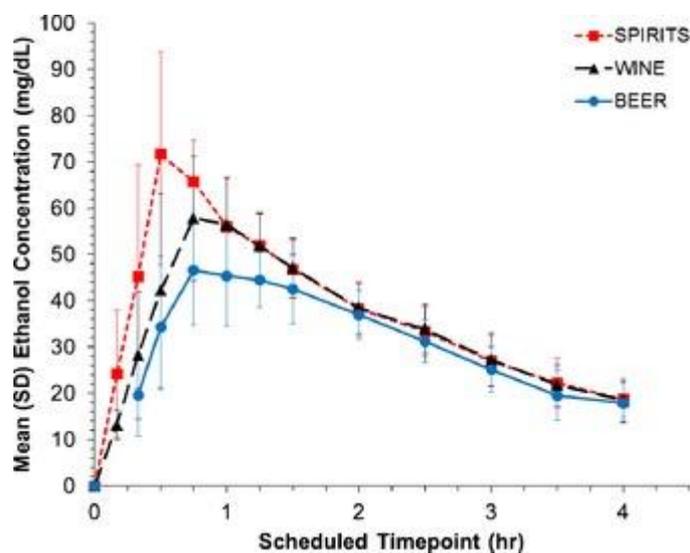


Figure 4 : Evolution de l'éthanolémie dans le temps selon le titre alcoolique de la boisson consommée (alcools forts en rouge, vin en noir, bière en violet) d'après Mitchell MC (18)

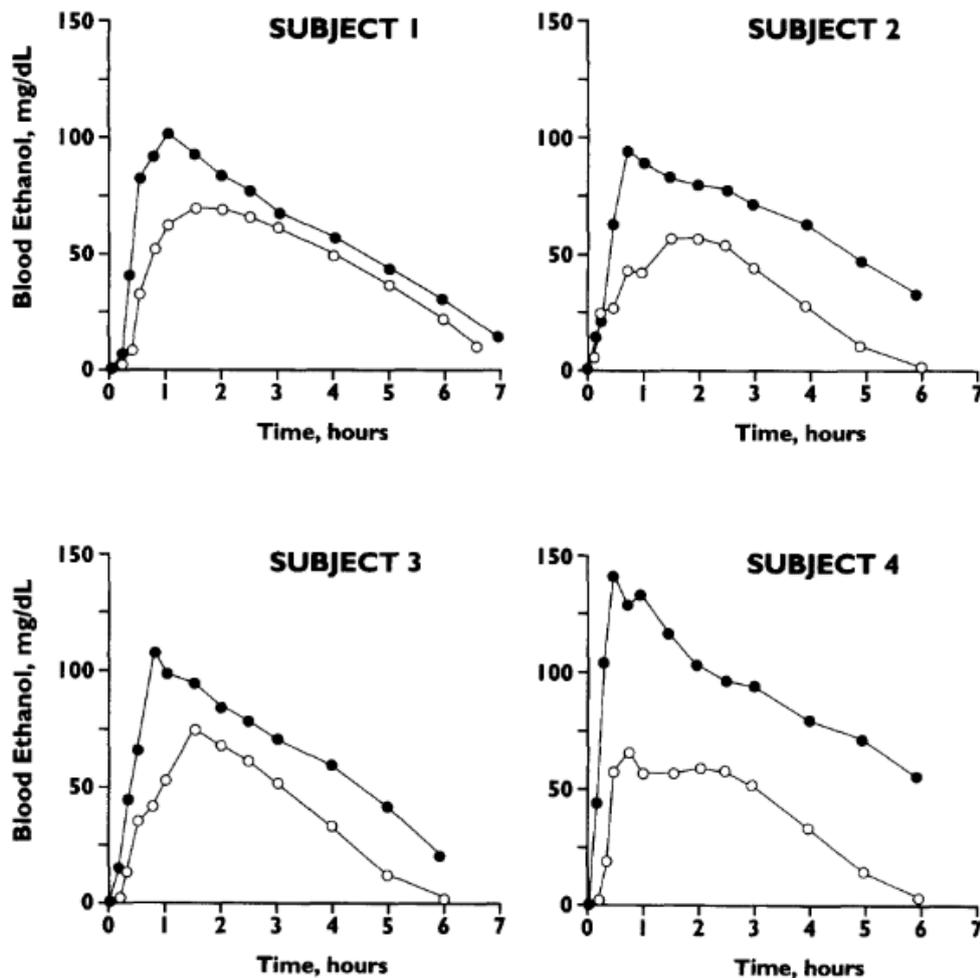


Figure 5 : Ethanolémie en mg/dL à jeun (rond vide) et immédiatement après le petit déjeuner (rond plein) d'après William E.M Lands (19)

1.4.4 FORMATION ENDOGENE ET POST-MORTEM

Chez l'individu en vie, la production endogène d'éthanol par fermentation 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'auto-brasserie 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 (20).

La formation *post-mortem* d'éthanol est en revanche beaucoup plus fréquente du fait de la redistribution de l'éthanol produit par les levures présentes dans le tractus intestinale induite par les phénomènes de putréfaction ou les traumatismes. Les concentrations sanguines d'éthanol retrouvées en post-mortem peuvent atteindre 0,7 g/L et ainsi poser des problèmes d'interprétation médico-légale (21).

2 LES BIOMARQUEURS DE L'ETHANOL

2.1.1 LES MARQUEURS INDIRECTS : LIES A DES MODIFICATIONS METABOLIQUES CHEZ LES ALCOOLIQUES CHRONIQUES

2.1.1.1 TRANSAMINASES

Une consommation chronique excessive d'éthanol entraîne une augmentation des transaminases par effet inducteur enzymatique et dommages cellulaires (traduction de la cytolysé hépatique). Un rapport 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 reste altérée plusieurs semaines après l'arrêt de la consommation d'alcool. La sensibilité et la spécificité de ce rapport pour détecter une consommation d'alcool est très faible. De plus, les transaminases ne sont pas applicables en *post-mortem* et présentent peu d'intérêt comme biomarqueurs d'une consommation d'alcool.

2.1.1.2 VGM

Le 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 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.

2.1.1.3 GAMMA-GLUTAMYL TRANSFERASE : ENZYME MEMBRANAIRE DES HEPATOCYTES

L'activité de la gamma-glutamyl transférase (GGT) est augmentée par l'effet inducteur enzymatique ainsi que par les dommages cellulaires 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 utilisé dans la surveillance de l'abstinence et le suivi de sevrage.

2.1.1.4 TRANSFERRINE DÉSIALYLÉE

L'éthanol entraîne une augmentation des formes désialylées de la transferrine (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 qu'il 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 (22).

2.1.2 LES MARQUEURS DIRECTS (ÉTHANOL ET METABOLITES MINEURS)

2.1.2.1 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 éthylysme 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 de sa production par fermentation (un prélèvement sur fluorure de sodium réduit cette production fongique) (22).

2.1.2.2 ETHYLGLUCURONIDE

L'éthylglucuronide (EtG) (figure 6) 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), l'urine et les cheveux.

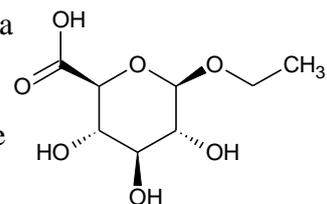


Figure 6: Molécule d'EtG

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 6 mois précédant le prélèvement. Il permet de différencier un abstinent ou consommateur occasionnel (< 7 pg/mg) d'un éthylique chronique (> 30 pg/mg) (23). Il est utilisé comme marqueur d'une consommation excessive et chronique d'éthanol chez le vivant et en *post-mortem*.

2.1.2.3 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).

2.1.2.4 PHOSPHATIDYLETHANOL

Le phosphatidyléthanol (PEth) est un métabolite mineur 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). Il est

délectable de façon précoce, avec un pic plasmatique entre 90 et 120 minutes post-ingestion, et une fenêtre de détection allant de 21 à 28 jours après la consommation d'alcool.

2.1.2.5 ETHYLSULFATE

L'éthylsulfate (EtS) est formé par transfert d'un groupement sulfate sur l'éthanol, catalysé par les sulfotransférases hépatiques 1A1 et 1A2. A ce jour, il n'a pas été démontré d'un intérêt supérieur à celui de l'EtG pour la prise aiguë (pic 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.

2.1.2.6 COCAETHYLENE

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. Il est utilisable en *post-mortem*.

2.1.3 MARQUEURS DE L'ALCOOLISATION AIGUË ET CHRONIQUE

Pour détecter une consommation aiguë, plusieurs marqueurs directs peuvent être utilisés (tableau 3) (24), tandis que pour la détection d'une consommation chronique des marqueurs directs comme indirects peuvent être utilisés (tableau 4) (25–27).

Tableau 3: Récapitulatif des biomarqueurs d'une alcoolisation aiguë (usuels en bleu; peu utilisés en grisé)

Biomarqueur d'alcoolisation aiguë	Matrice	Fenêtre de détection	Sensibilité	Spécificité	Application en <i>post-mortem</i>	Contraintes et coût	Délai de résultat	Intérêt / Limites
Ethanol	Sang Urine Air expiré Humeur vitrée	Quelques heures	100 %	100 %	OUI	+	+	Marqueur de choix Fenêtre de détection réduite
EtG	Urine	2 à 3 jours	> 80 %	> 95 %	OUI	+	+	Pas d'évaluation de l'importance de la consommation
EtS	Urine	30 heures	> 80 % (?)	> 90 % (?)	OUI	+	++	Intérêt < EtG
FAAE	Sang	24 heures	Non évalué	> 50 %	OUI	++	+++	Intérêt limité
PEth 16:0/18:1	Sang	3 à 4 semaines	Non évaluée	> 99 %	?	++	++	Pas d'évaluation de l'importance de la consommation ni du délai la séparant du prélèvement
Congénères de l'éthanol	Sang	46 heures (MeOH)	Faible	Faible	OUI	++	++	Intérêt limité

Tableau 4: Récapitulatif des biomarqueurs d'une alcoolisation chronique (usuels en bleu; peu utilisés en grisé)

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 % (80 à 90 % si combiné à GGT)	> 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	86 à 95 %	> 99 %	?	++	++	Marqueur spécifique et sensible / cumulatif, données d'interprétation à consolider

3 LE PHOSPHATIDYLETHANOL

3.1 GENERALITES

Le PEth est un métabolite découvert lors d'une étude sur les interactions entre l'éthanol et le métabolisme des acides gras essentiels (22). 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 (28). Il est formé par la transphosphatidylation de phospholipides (principalement la phosphatidylcholine (PC)) avec l'éthanol (figure 7) (29,30). 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 (31).

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 (32).

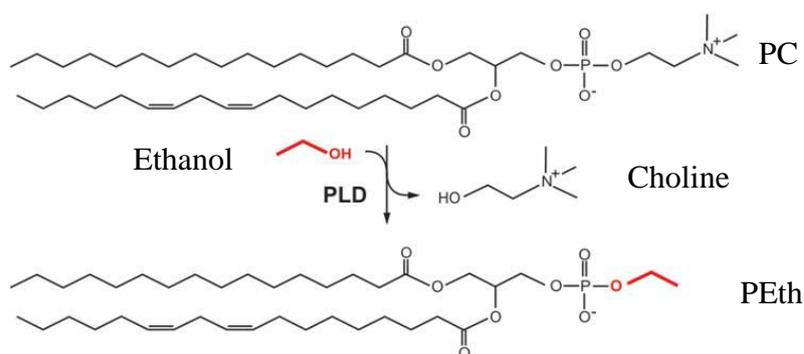


Figure 7 : Formation du PEth à partir de la PC

Ce sont également des phospholipases qui dégradent le PEth, notamment la phospholipase A₂, la PC phospholipase C et la PA phosphohydrolase (33–35). Nous savons également que le propanolol, 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 (33,36).

Il existe en fait 48 homologues de PEth, qui diffèrent par leurs deux chaînes d'acide gras (R¹ et R², figure 8). Ils ont été découverts en 1992 (37) via Bombardement par des Atomes Rapides couplé à un Spectromètre de Masse (BAR-SM). Les plus abondants

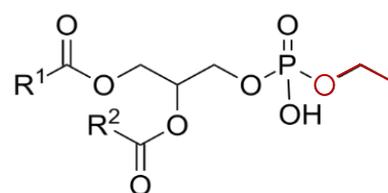


Figure 8 : Noyau de PEth avec ses deux radicaux R¹ et R²

dans le sang humain sont les PEth 16:0/18:1, 16:0/18:2, et 18:1/18:1 (38). Pour exemple, le PEth 16:0/18:1 correspond à un PEth dont l'acide gras en R¹ est composé de 16 carbones sans insaturation et l'acide gras en R² de 18 carbones avec 2 insaturations.

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 (39). 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 de 86 % et une spécificité de 100 % (39). Le PEth est retrouvé après une consommation aiguë d'éthanol, 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) (40,41), ce qui explique l'utilisation du sang total comme matrice pour le PEth ainsi que sa longue demi-vie (3 à 7 jours) (22,42–44). 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) :

- 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 (45).

- Le PEth est dit instable *in vitro* (dans le tube de sang) au bout de quelques jours à température ambiante (46,47). 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 (39,48).

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 (49). 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).

3.2 STABILITE

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°C , il serait stable au moins 1 mois (certaines études annoncent une stabilité de 6 mois (39), d'autres une stabilité de 12 mois (46), voire de 14 mois (50)). Une étude indique une stabilité limitée à 8 jours à -20°C (51). À 4°C , les études se contredisent indiquant une stabilité de quelques jours (45,46) à plusieurs semaines (47,52). Enfin, à température ambiante, les études indiquent une stabilité de plusieurs heures à plusieurs jours (45–47). Une étude (45) 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°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) (51).

L'utilisation de DBS permet de pallier à ces problèmes de stabilité. Effectivement, une fois $10\ \mu\text{L}$ d'échantillon transféré 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 (45) et les différents anticoagulants n'ont pas d'incidence sur le PEth dans le DBS (51). Le PEth présent dans le sang séché apparaît stable à température ambiante au moins 6 mois (39), voire 9 mois (53).

3.3 CUT-OFF ET INTERPRETATION

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 $210\ \mu\text{g/L}$ 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 210 µg/L de PEth

Critères	Patient en « alcool détoxification 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 (39)	200 µg/L (24)	202 µg/L (54)	215 µg/L (55)

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 (26). 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) (44) 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 Ulwellling W. (44)

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, Farinano, 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 (<i>n</i> = 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) (<i>n</i> = 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 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 (24) a créé plusieurs scénarii dans lesquels il faisait varier la quantité d'alcool consommée ainsi que le rythme de consommation (figures 9 et 10). 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.

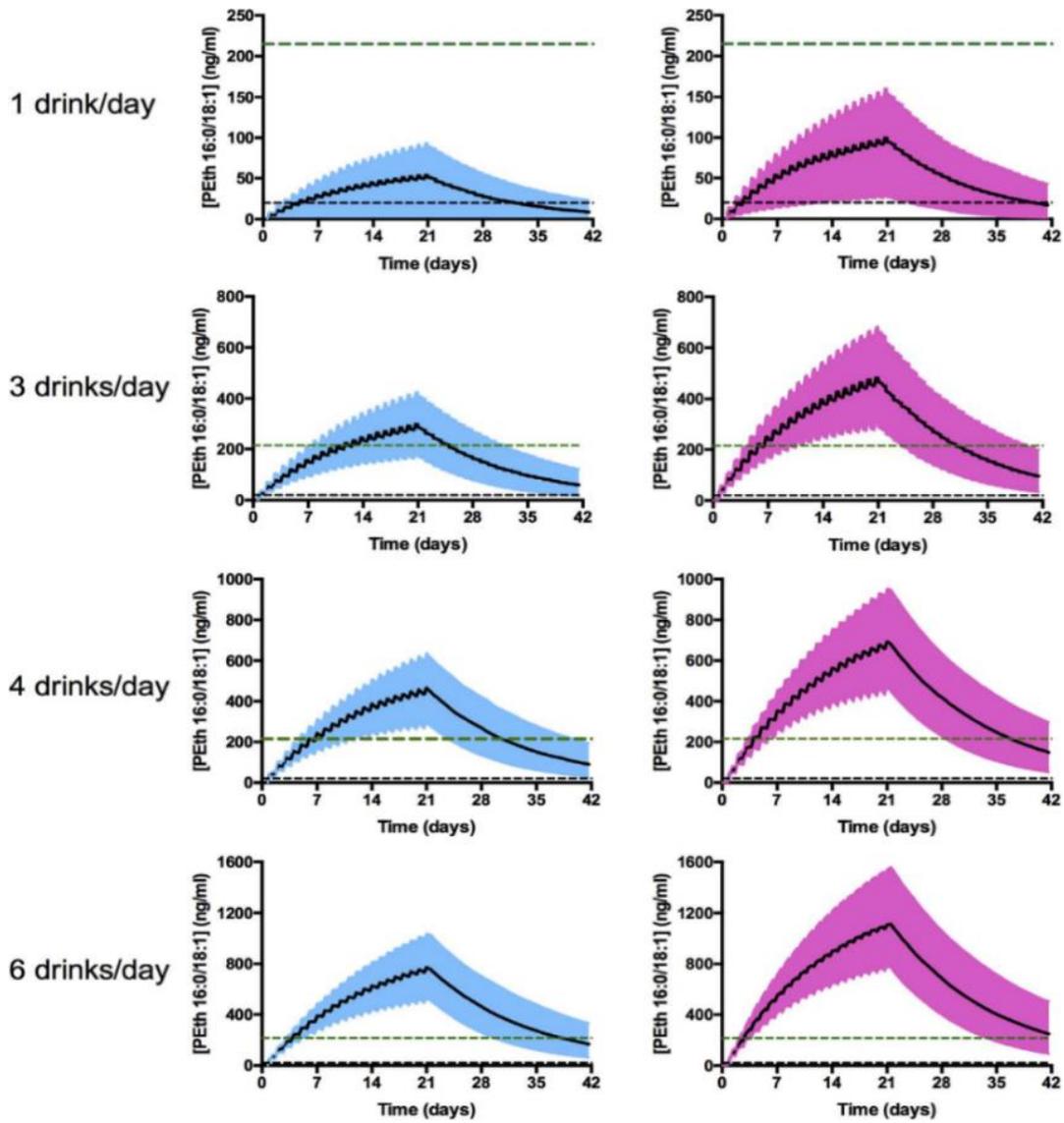


Figure 9: Evolution de la concentration en PEth en fonction de la consommation journalière chez l'homme (en bleu) et chez la femme (en rose). La médiane est représentée par la courbe noire, les écarts interquartiles par les bandes de couleur, la valeur-seuil d'interprétation de 210 µg/L par la droite verte en pointillés et la limite inférieure de quantification LIDQ de 20 µg/L par la ligne en pointillés noire.

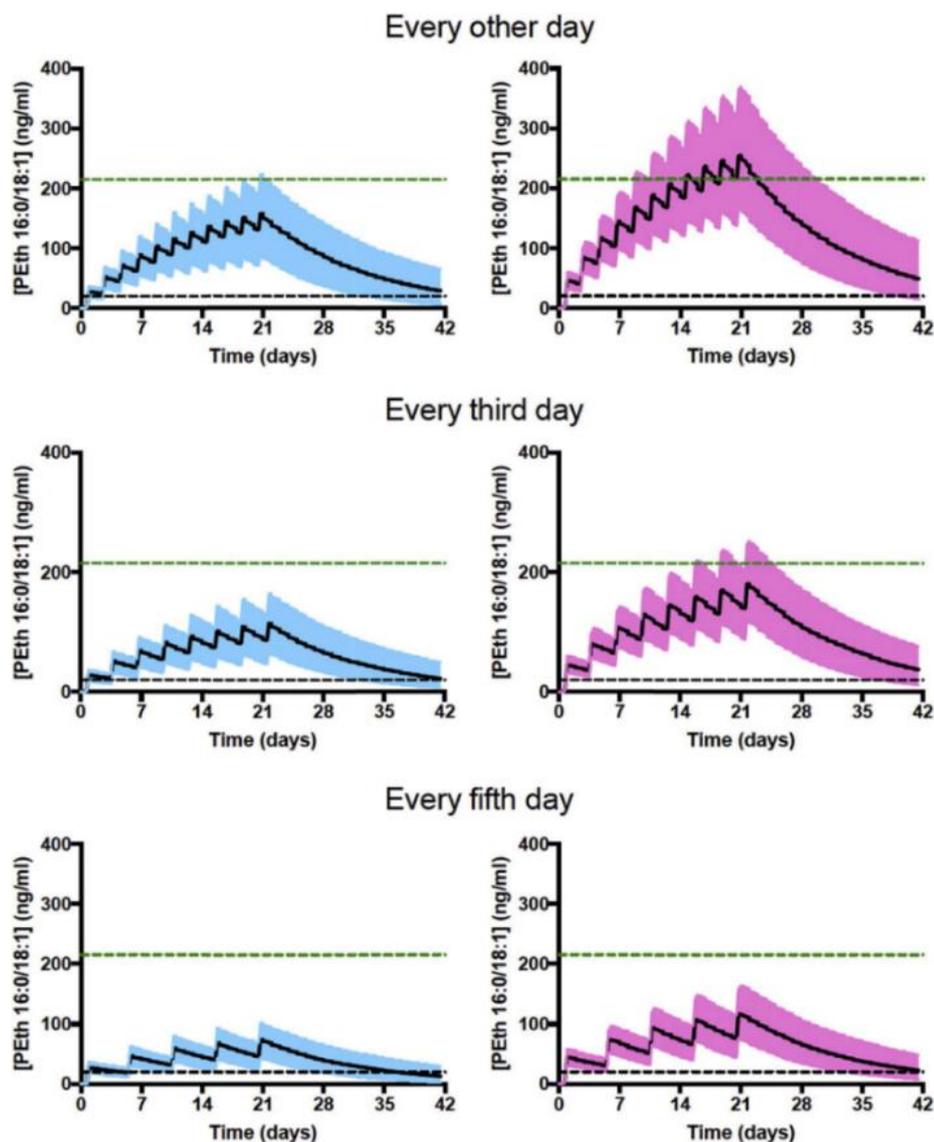


Figure 10: Evolution de la concentration en PEth en fonction de la consommation de 3 doses d'alcool à intervalle variable (1j/2, 1j/3, 1j/5) chez l'homme (en bleu) et chez la femme (en rose). La médiane est représentée par la courbe noire, les écarts interquartiles par les bandes de couleur, la valeur-seuil d'interprétation de 210 $\mu\text{g/L}$ par la droite verte en pointillés et la LIDQ de 20 $\mu\text{g/L}$ par la ligne en pointillés noire.

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

- > 210 $\mu\text{g/L}$ 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.

3.4 METHODES D'ANALYSES

En ce qui concerne les méthodes d'analyses mises en œuvre retrouvées dans la littérature (45), 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 µg/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 mieux apprécier la quantité d'alcool consommée.

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 et/ou l'automatisation a été également rapportée. 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 µL), 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.

4 POURQUOI DEVELOPPER CETTE METHODE DE DOSAGE ?

Cette méthode de dosage a été développée à la demande des cliniciens. En effet, les addictologues voient en ce biomarqueur un outil objectif permettant de les aider dans la détection des rechutes lors des sevrages et, ainsi, améliorer la prise en charge de leurs patients. Les hépatologues, notamment dans le cadre des transplantations hépatiques, utilisent ce biomarqueur dans le suivi de l'abstinence pré- et/ou post-greffe. Les obstétriciens, quant à eux, y voient un moyen potentiel d'améliorer la prévention des alcoolisations chez la femme enceinte dans le but de réduire la survenue des TSAF chez le nouveau-né. Cette méthode de dosage a été également développée sur demande des experts-toxicologues analystes, toujours à la recherche de mesures objectives concernant la consommation d'éthanol *in-vivo* et en *post-mortem*.

DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE METHODE

1. EQUIPEMENT



Figure 11: Spectromètre de masse : CL-SM/SM XEVO TQ-S (source : site du fabricant Waters)

L'analyse du PEth a été réalisée par CL-SM/SM (XEVO TQ-S de la société WATERS, figure 11). Il existe plusieurs sources d'ionisations disponibles sur cet appareil : dans le cadre de ce travail, l'ionisation par électrospray en mode négatif (ESI) sera utilisée. Le spectromètre de masse est un triple quadripôle qui permet d'avoir une bonne fiabilité et une sensibilité relativement basse (limite de détection annoncée de l'ordre du fg/L). Cet équipement permet d'avoir une sensibilité et une spécificité adaptées aux exigences médico-légales.

La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qu'il n'était pas possible de réaliser avec la chromatographie sur couche mince ou en phase gazeuse. En effet, contrairement à ces deux autres techniques, la CL permet d'aborder la recherche et/ou le dosage de substances organiques thermosensibles ou non volatiles à de très faibles concentrations dans des milieux biologiques.

Un liquide est envoyé dans une phase stationnaire conditionnée dans une colonne. Cette phase mobile est poussée par un système de pompage à travers le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté et transporté au travers du système où ses constituants vont pouvoir être séparés. Effectivement, les composés en solution se répartissent suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, ces différents composés sont caractérisés par un pic spécifique.

La spectrométrie de masse en tandem utilise une cellule de collision pour fragmenter les ions sélectionnés dans un premier filtre quadripolaire. Cette cellule comporte elle-même un autre quadripôle qui permet de se focaliser sur les ions choisis. Un gaz de collision

neutre est injecté dans ce quadripôle (dans la méthode utilisée au laboratoire, c'est de l'azote). Il permet d'accélérer les ions et de provoquer leur fragmentation par collision. Ces fragments sont admis dans le deuxième filtre de masse pour être analysés en mode balayage.

2 MATERIEL ET METHODE

Pour développer cette méthode, nous nous sommes basé sur les travaux d'une équipe suisse (56) que nous avons adaptée, optimisée et validée dans un environnement d'accréditation selon la Norme NF EN ISO 15 189.

2.1 PHASE PRE-ANALYTIQUE

2.1.1 METHODES DE PRELEVEMENT

2.1.1.1 DISPOSITIFS DE PRELEVEMENT CAPILLAIRES VOLUMETRIQUES

Il s'agit de systèmes de prélèvement volumétriques permettant le dépôt direct d'un volume précis de 10 µL de sang capillaire sur un papier buvard. L'intérêt de ces dispositifs est de limiter le caractère invasif du prélèvement, de disposer de « spots » facilement et avec un volume connu. Cependant, dans un cadre hospitalier et si les patients sont prélevés pour d'autres analyses, son utilisation 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).

2.1.1.2 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.

2.1.2 TRANSFERT SUR PAPIER BUVARD

2.1.2.1 PIPETTE DE PRECISION

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 (903 five spot blood card, EBF.inc), 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.

2.1.2.2 TEST DE CONTAMINATION DE LA POINÇONNEUSE

Ce test consiste à vérifier la contamination de la pince lors du poinçonnage. Afin de quantifier cette contamination, 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.

2.1.2.3 TEMPS DE SECHAGE 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).

2.1.3 STABILITE IN VITRO DU PETH

Les résultats de cette étude de stabilité *in-vitro* sont considérés comme instables lorsque deux valeurs successives ont un coefficient de variation (CV) supérieur à 15%. Le choix de cette limite découle de plusieurs raisons :

- Pour rester proche des CV utilisés généralement dans la littérature (57–61) ;
- Car les données issues de la validation analytique et notamment celles de répétabilité donnent un CV maximum proche de 15% (11%) ;
- Car les variabilités inter- et intra-individuelle ne sont pas encore établies et sont vraisemblablement suffisamment importantes pour qu'une variabilité analytique de 15% ne soit pas significative (du moins dans l'état actuel des données d'interprétation).

2.1.3.1 STABILITE SUR TUBE DE SANG TOTAL

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 4 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.

Influence de la température

Le délai d'acheminement d'un prélèvement depuis un laboratoire extérieur n'est pas une donnée totalement maîtrisable et un délai de plusieurs heures entre la réalisation du prélèvement dans les services de soins et la mise sur papier buvard au laboratoire de l'échantillon est couramment observé en routine. Ainsi, connaître la stabilité du PEth pendant cette période est nécessaire à la production d'un résultat analytique fiable. Afin de

déterminer la stabilité du PEth dans le sang, nous avons sélectionné des échantillons de sang total sur tubes citratés issus de divers services cliniques du CHU de Lille. Ces échantillons ont été choisis pour disposer d'un large éventail de concentrations en PEth.

Température ambiante (n=27) : Les échantillons de sang total (allant de non détecté à 972 µg/L) ont été analysés le jour de la réception (J0) puis laissés à température ambiante afin d'être analysés à J1, J2, J3, J4, J7, J14, J22, M1, M2 et M3. 3 échantillons ont été choisis « non détectés » afin de confirmer l'absence de néoformation de PEth.

Température de 4°C (n=26) : Les échantillons de sang total (allant de non détecté à 972 µg/L) ont été analysés le jour de la réception (J0) puis laissés à 4°C afin d'être analysés à J1, J2, J3, J4, J7, J14, J22, M1, M2 et M3. 3 échantillons ont été choisis « non détectés » afin de confirmer l'absence de néoformation de PEth.

Température de -20°C (n=29) : Les échantillons de sang total (allant de non détecté à 972 µg/L) ont été analysés le jour de la réception (J0) puis 3 aliquots ont été créés (afin d'éliminer la variable cycles de congélation/décongélation) et laissés à -20°C afin d'être analysés à J14, M2 et M3. 3 échantillons ont été choisis « non détectés » afin de confirmer l'absence de néoformation de PEth.

2.1.3.2 STABILITE SUR BUVARDS

Pour chaque échantillon (n = 28), 5 spots de 10 µL de sang total (allant d'une concentration de PEth non détectée à 972 µg/L) ont été transférés sur DBS : 1 spot a été analysé le jour de la réception (J0), puis un spot a été analysé à J14, M2, M6 et M14. 3 échantillons ont été choisis « non détectés » afin de confirmer l'absence de néoformation de PEth.

2.1.3.3 STABILITE POST-EXTRACTION

Nous avons également entrepris de tester la stabilité des extraits (dans les vials d'extraction) pendant 24 heures à 10°C. Pour cela, 23 échantillons sont passés 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.

2.1.3.4 NEOFORMATION IN-VITRO DU PETH

Afin de déterminer s'il existe une formation de PEth dans le tube de sang total, 30 tubes fluorés de sang total provenant des demandes d'éthanolémie du service des urgences sont séparés en 3 groupes selon le résultat d'éthanolémie :

- Éthanolémie négative : 2 spots de 10 µL sont réalisés à H0, H4, J1, J2 et J7

- Éthanolémie positive : 2 spots de 10 µL sont réalisés à H0, H4, J1, J2 et J7
- Éthanolémie négative avec ajout d'éthanol à environ 2g/L : dans un aliquot de 1 mL de sang, 2 mg d'éthanol pur sont ajoutés. 2 spots de 10 µL sont réalisés à H0, H4, J1, J2 et J7.

L'ensemble des spots d'un même échantillon est passé dans la même série.

2.1.4 EXTRACTION DU PETH A PARTIR DES DBS

2.1.4.1 CHOIX DE LA SOLUTION D'EXTRACTION

Afin de déterminer la meilleure solution d'extraction, nous avons effectué des tests en utilisant tout d'abord un mélange de phases mobiles (A et B) à différentes proportions (A/B (%/%) : 30/70, 40/60, 60/40 et 70/30), puis du méthanol pur (Methanol absolute Biosolve BV ULC/MS).

2.1.4.2 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.

2.1.4.3 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).

2.1.4.4 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 centrifugation (15000g, 10 min, 4°C) (Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16R).

2.1.4.5 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 test avec agitation de 10 secondes après le délai d'extraction (durée 0, 5, 10, 20, 30, 60 min)

2.2 PHASE ANALYTIQUE

2.2.1 SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

2.2.1.1 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 12).

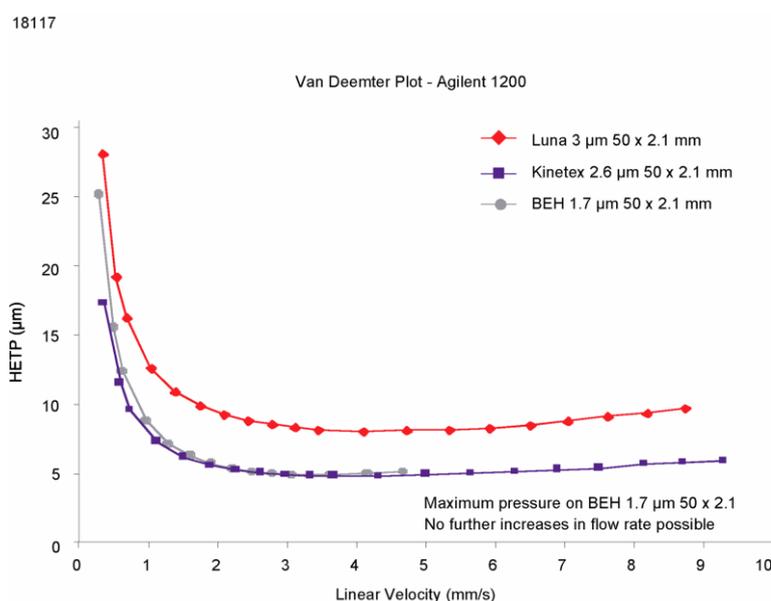


Figure 12: Courbe de Van Deemter Plot

2.2.1.2 CHOIX DES PHASES MOBILES

- 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).

2.2.1.3 CHOIX DE L'ÉTALON INTERNE

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).

2.2.1.4 MOLARITE DE L'ACETATE 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.

2.2.1.5 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 potentiel chimique (pK_C), 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.

2.2.1.6 DEBIT 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 est < 20 PSI).

2.2.1.7 TEMPERATURE 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.

2.2.1.8 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 :

- La durée de plateau
- Le gradient de phases mobiles du plateau
- La pente
- Le nettoyage de la colonne
- La stabilisation de la colonne

La durée du plateau et le gradient de phases mobiles du plateau aboutissent à l'élution des composés hydrophiles ainsi qu'à la concentration de notre composé dans la colonne. La pente permet d'optimiser la séparation de notre composé. Le nettoyage de la colonne permet d'éviter la contamination inter échantillons. 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 du delta de temps de rétention 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.

2.2.2 ESSAI DE VERIFICATION DE STABILITE

2.2.2.1 STABILITE DES PHASES MOBILES

La consommation rapide des phases mobiles permet leur rotation tous les mois, ainsi leur stabilité sur cette courte période n'est pas étudiée.

2.2.2.2 STABILITE DES SOLUTIONS MERES METHANOLIQUES

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.

2.2.3 VALIDATION

2.2.3.1 PROCEDURE DE VALIDATION

La validation d'une méthode analytique selon la norme NF EN ISO 15 189 nécessite l'évaluation de nombreux paramètres (Annexe 1). Pour valider et accréditer auprès du 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 » (62) et le « guide technique d'accréditation: contrôle de qualité en biologie médicale » (63).

3 RESULTATS

3.1 PHASE PRE ANALYTIQUE

3.1.1 MULTIPIPETTE

Afin de nous assurer de la répétabilité des multipipettes sur nos matrices, 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 d'acter l'utilisation de cette pipette pour notre protocole de dosage.

3.1.2 CONTAMINATION DE LA POINÇONNEUSE

Les résultats d'analyses des échantillons ont révélé une contamination inférieure à la LIDQ ($5 \mu\text{g/L}$) (Échantillon 1 : $2 \mu\text{g/L}$, échantillons 2 et 3 non détectables). Pour remédier à cette contamination, la poinçonneuse est nettoyée au méthanol entre chaque spot.

3.1.3 TEMPS DE SECHAGE DES DBS

Nous avons constaté qu'au-delà de 30 minutes de séchage, les spots ont eu le temps de sécher correctement sans pour autant affecter la suite de l'analyse.

Résultats pour un échantillon à $350 \mu\text{g/L}$:

- Après 20 minutes de séchage : $225 \mu\text{g/L}$
- Après 30 minutes de séchage : $361 \mu\text{g/L}$
- Après 60 minutes de séchage : $355 \mu\text{g/L}$

3.1.4 ESSAI DE STABILITE IN VITRO DU PETH

3.1.4.1 INFLUENCE DE L'ANTICOAGULANT

Les données sur cette étude (tableau 7) montrent l'absence d'impact des anticoagulants sur l'analyse du PETH, à un temps T et au CV de 15%. Ainsi, l'utilisation de ces 4 types de tubes est possible dès lors que le prélèvement est pris en charge dès réception.

Tableau 7 : Influence des anticoagulants sur la concentration en PETH sanguin à T0 (n=4, 4 échantillons du même patient pris le même jour à la même heure)

Patient	PETH (µg/L)			
	1	2	3	4
Tube Citraté	62	102	16	845
Tube EDTA	64	103	15	823
Tube Hépariné	52	99	18	859
Tube Fluoré	57	104	14	847
Moyenne	59	102	16	844
CV maximum	8.1 %	2.9 %	12.5 %	2.4 %

3.1.4.2 INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

Température ambiante

A température ambiante (figure 13), dans le tube de sang citraté, nous constatons que 88% des 27 échantillons restent sous 15% de biais relatif à J0 les premières 24 heures. Ce pourcentage est de 83% à J2, puis décroît rapidement à 20% à M3. Ainsi nous considérons que le PETH conservé à température ambiante est stable dans le tube de sang citraté pendant 24h (plus de 85% des échantillons respectant la condition de biais de 15%).

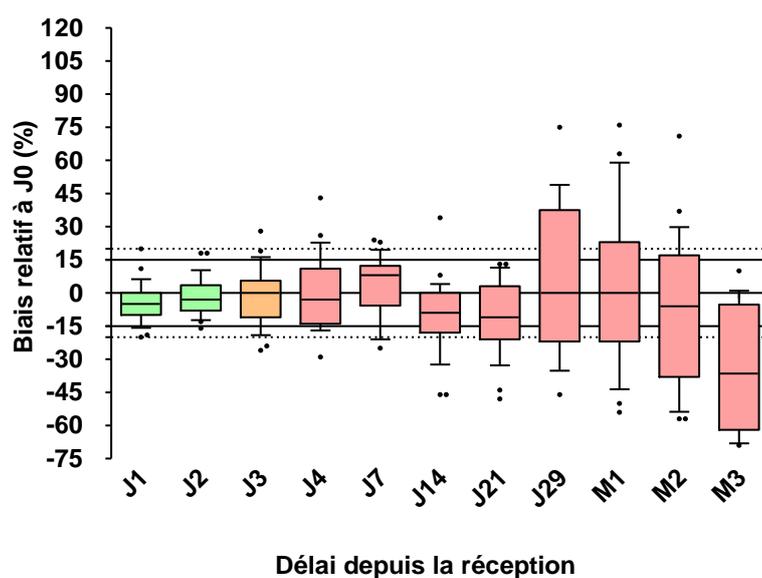


Figure 13: Stabilité du PETH 16:0/18:1 dans le tube citraté à température ambiante (n=27)

Réfrigéré à 4°C

A une température de 4°C (figure 14), dans le tube de sang citraté, 100% des 26 échantillons respectent les 15% de biais relatif à J0 avant de décroître à 86% à J7, puis 83% à J21. Ce taux décroît ensuite rapidement sous les 60%. Ainsi, à 4°C, le PEth est stable dans le tube de sang citraté jusqu'à 7 jours avec un biais de 15%.

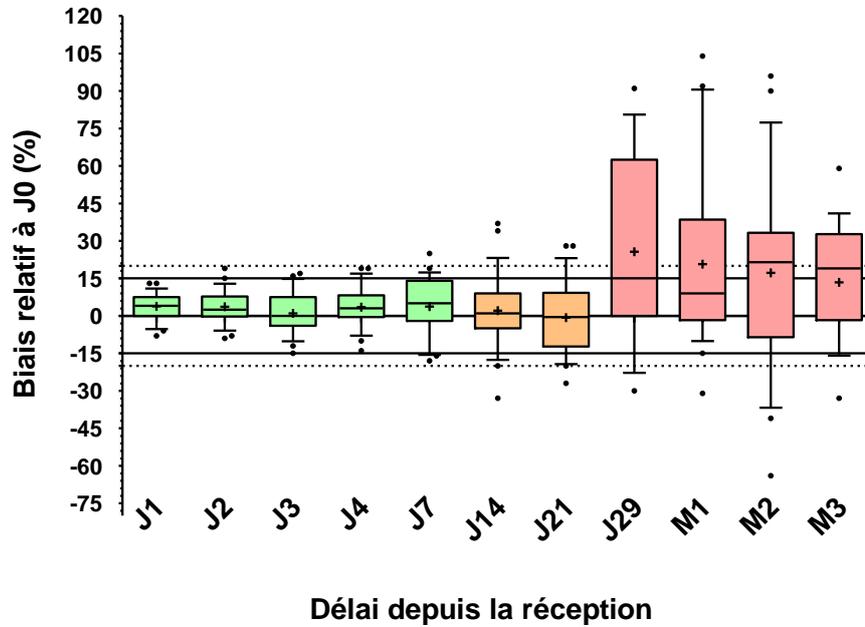


Figure 14: Stabilité du PEth 16:0/18:1 dans le tube citraté à 4°C (n=26)

Congelé à -20°C

A une température de -20°C (figure 15), dans le tube de sang citraté, 96% des 28 échantillons restent sous les 15% de biais relatif à J0 après 14 jours et ce taux devient inférieur à 50% à M2. Ainsi, à -20°C le PEth est stable pendant 14 jours avec un biais relatif de 15%.

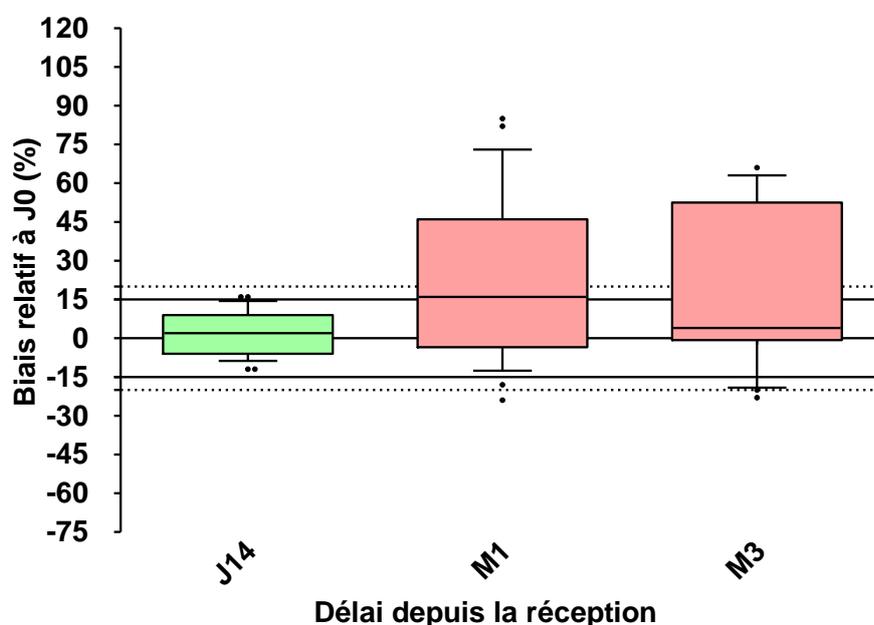


Figure 15: Stabilité du PEth 16:0/18:1 dans le tube citraté à -20°C (n=28)

Stabilité sur DBS

Concernant les échantillons transférés sur DBS (figure 16), jusqu'au 6^{ème} mois, 92% des 28 échantillons demeurent sous les 15% de biais relatif à J0. Nous avons également pu constater que sur les 18 échantillons que nous avons pu conserver plus longtemps, 83% restent sous les 15% de biais au bout de 14 mois. Ainsi, le PEth est stable 6 mois avec un biais accepté de 15%.

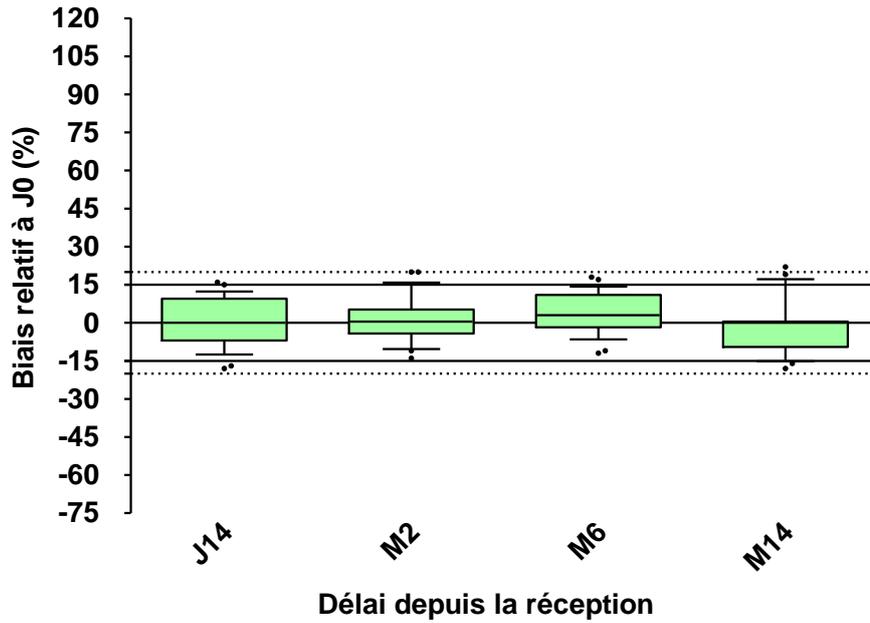


Figure 16 : Stabilité du PEth 16:0/18:1 sur DBS à température ambiante (n=28)

Synthèse influence de la température

En résumé, la matrice DBS est plus stable que le sang total, quelle que soit la température (figure 17).

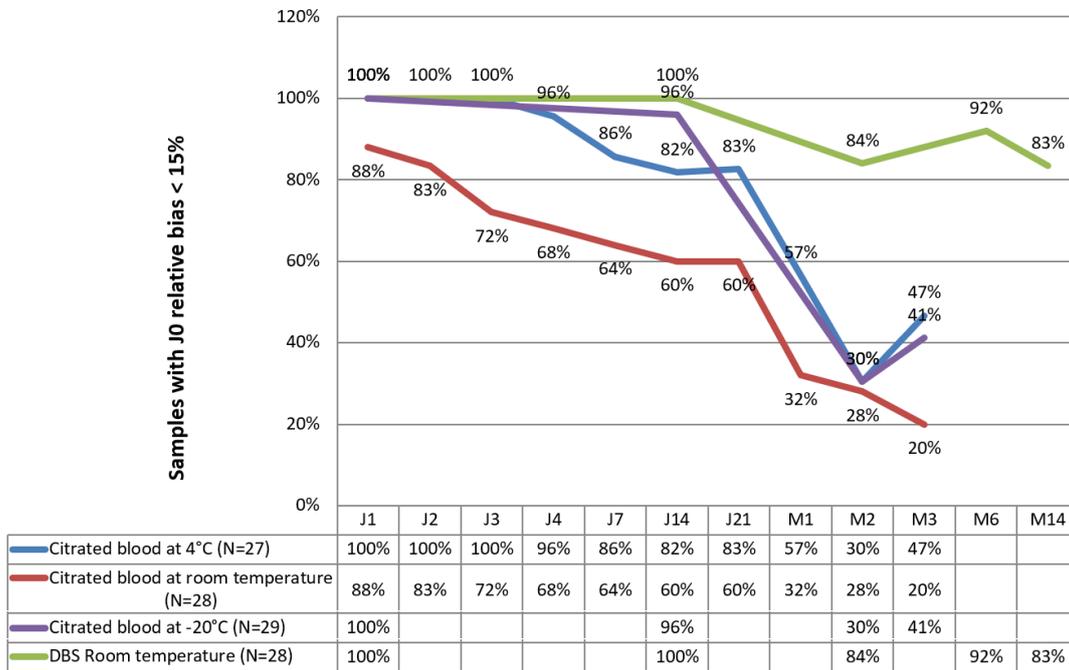


Figure 17 : Stabilité du PEth 16:0/18:1 dans les DBS et les tubes citratés en fonction de la température

3.1.4.3 POST-EXTRACTION

Après extraction du PEth du DBS par une solution méthanolique, 100% des 23 échantillons restent sous les 15% de biais relatif à J0. Ainsi, le PEth, une fois extrait du DBS par une solution méthanolique, est stable au minimum 24h dans l'enceinte thermostatée à 10°C avec un biais accepté de 15%.

3.1.4.4 NEOFORMATION IN-VITRO DE PETh

Pour évaluer la néoformation in-vitro de PEth dans un tube fluoré, plusieurs tests ont été effectués sur 48 échantillons à différentes température et avec ou sans ajout d'éthanol (OH) (figures 18 à 22).

A température ambiante, il y a une néoformation de PEth dans le tube de sang fluoré en présence d'OH, qu'il soit présent ou ajouté dans le sang au moment du prélèvement. Ce résultat est identique pour les PEth 16:0/20:4 et 16:0/18:1. La présence ou non de PEth au moment du prélèvement n'influence pas ce résultat.

A une température de 4°C, cette néoformation semble être suffisamment ralentie pour que les variations de PEth ne soient pas significatives au biais relatif à J0 de 15%.

En l'absence d'OH dans le sang, aucune néoformation n'est détectée au biais relatif de 15%.

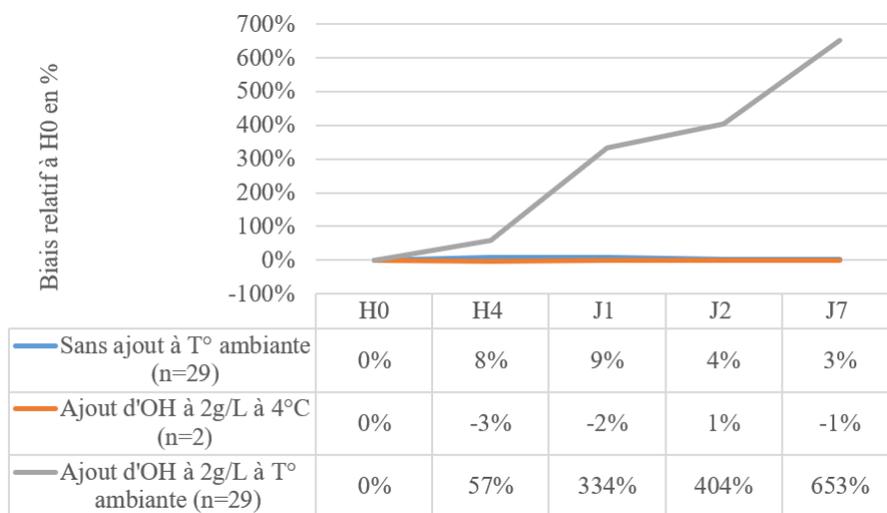


Figure 18: Evolution de la concentration moyenne en PEth 16:0/18:1 lorsque la concentration initiale de PEth est détectée et de OH non détectée

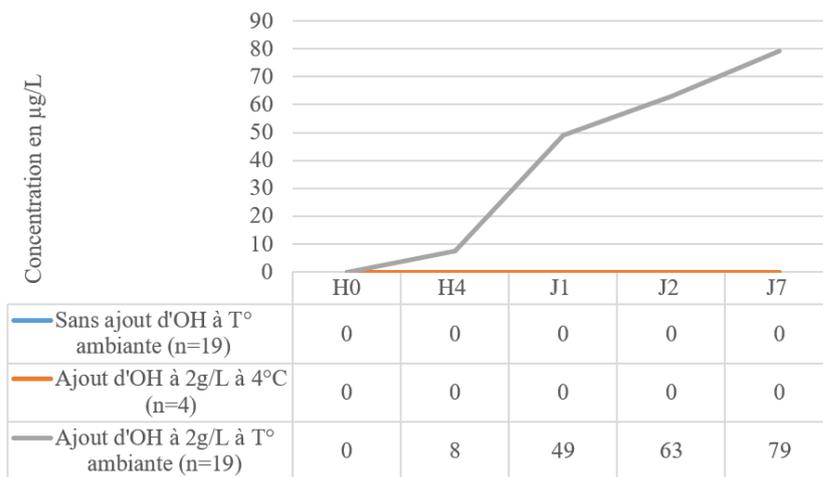


Figure 19: Evolution de la concentration moyenne en PEth 16:0/18:1 lorsque la concentration initiale de PEth et d'OH est non détectée

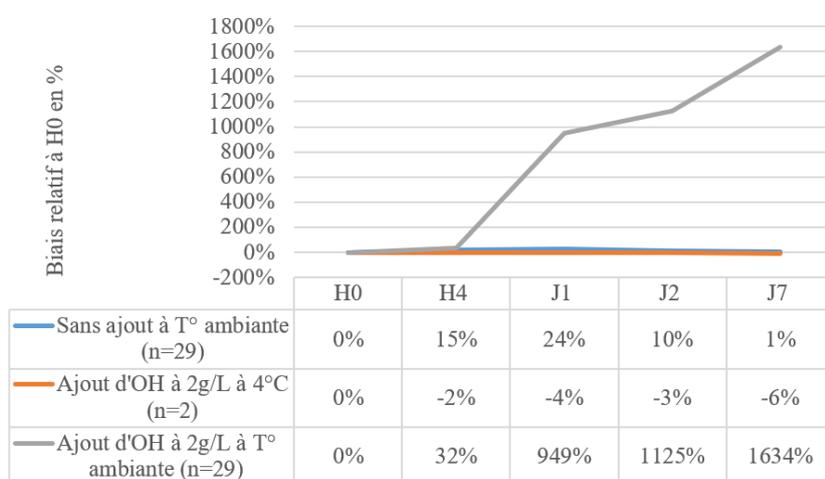


Figure 20: Evolution de la concentration moyenne en PEth 16:0/20:4 lorsque la concentration initiale de PEth est détectée et d'OH non détectée

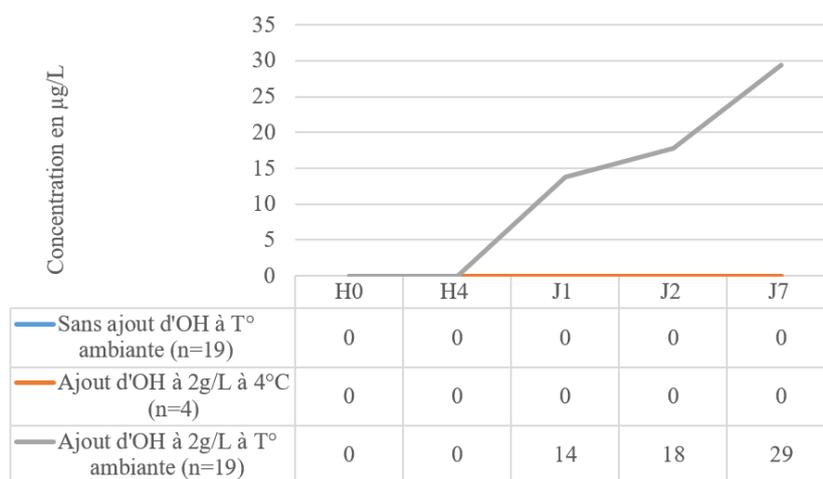


Figure 21: Evolution de la concentration moyenne en PEth 16:0/20:4 lorsque la concentration initiale de PEth et d'OH est non détectée

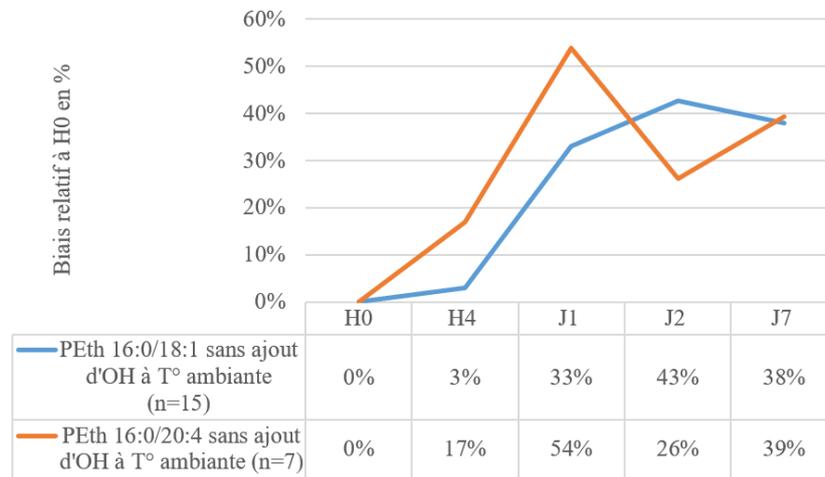


Figure 22: Evolution de la concentration moyenne en PEth 16:0/18:1 et 16:0/20:4 lorsque la concentration initiale en OH est détectée

3.1.5 EXTRACTION DU PETH A PARTIR DES DBS

3.1.5.1 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. Les résultats montrent une meilleure extraction par les phases mobiles A2/B2, plus particulièrement pour le ratio 40%/60% (1346 d'aire sous la courbe, AUC), en comparaison au méthanol (1202 d'AUC). Cependant, les analyses effectuées par la suite montrent une moins bonne répétabilité de l'extraction 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 coussin 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 la pré-humidification du cône ainsi que la fermeture rapide et hermétique des vials.

3.1.5.2 TEMPS DE CONTACT

L'influence du temps de contact sur les concentrations de PEth dans notre échantillon a été évalué (tableau 8). Le rendement maximal est obtenu après 30 minutes.

Tableau 8 : Résultats des analyses de temps de contact (0, 5, 10, 20, 30 et 60 minutes) (en µg/L)

Temps de contact (min)	Temps de rétention (min)	AUC	AUC de l'étalon interne (EI)	Concentration (µg/L)
0	3.59	104173	270372	610
5	3.59	181673	262373	1096
10	3.59	199014	239361	1317
20	3.59	100455	146478	1086
30	3.59	226993	241851	1487
60	3.59	213732	247710	1367

3.1.5.3 ULTRASONS

L'utilisation d'ultrasons ou non n'influence pas le rendement d'extraction du PEth à partir des DBS (figures 23 et 24).

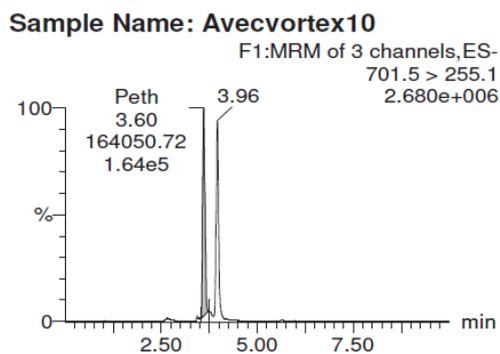


Figure 23: Résultat de l'analyse avec vortex et un temps de diffusion de 10 minutes

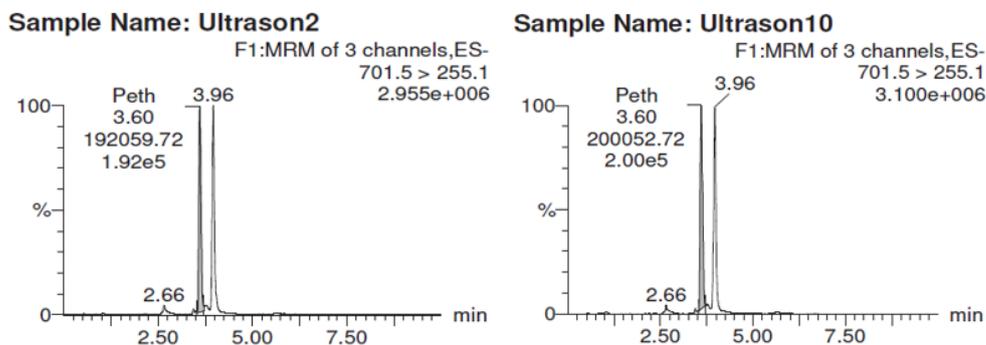


Figure 24: Résultats de l'analyse avec vortex et ultrasons pendant 2 minutes et 10 minutes avec un temps de diffusion de 10 minutes

3.1.5.4 CENTRIFUGATION

L'utilisation de centrifugation n'influence pas le rendement d'extraction du PEth à partir des DBS (figure 25).

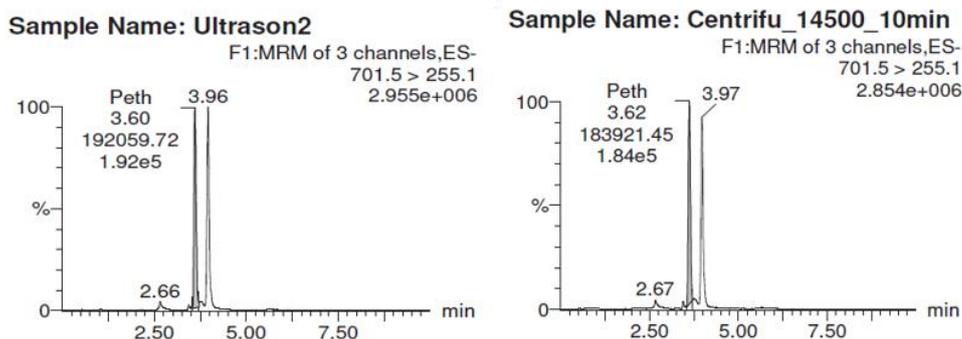


Figure 25 : Résultats de l'analyse avec vortex et ultrason pendant 2 minutes et sans puis avec centrifugation 10 minutes (4°C, 15000g)

3.1.5.5 AGITATION

Au bout de 10 minutes, le rendement maximal d'extraction du PEth a été atteint avec ou sans agitation (figure 26).

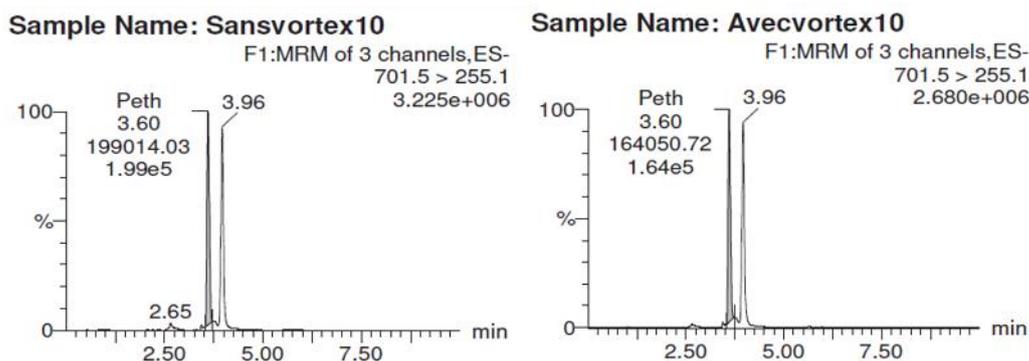


Figure 26 : Résultats de l'analyse sans et avec agitation avec un temps de diffusion de 10 minutes

3.1.5.6 SYNTHÈSE PRE ANALYTIQUE

L'ensemble de ces tests (tableau 9) nous indique que l'extraction doit se faire avec du méthanol à 100%, que l'utilisation du vortex, des ultrasons et de la centrifugation n'a pas d'influence sur le rendement d'extraction. Enfin, seul le temps de contact est d'une importance significative, en effet 10 minutes sont nécessaires pour atteindre le rendement d'extraction maximal et les résultats sont stables jusqu'à 60 minutes.

Tableau 9: Résumé des résultats pré analytiques

Echantillons	Temps de retention (min)	AUC	AUC de l'EI	Ratio AUC	Peth (µg/L)
10 Sansvortex0	3.59	104173.031	270372.000	0.385	610.1
11 Sansvortex5	3.59	181673.188	262373.188	0.692	1096.8
12 Sansvortex10	3.60	199014.031	239361.938	0.831	1317.1
13 Sansvortex20	3.60	100455.172	146478.188	0.686	1086.3
14 Sansvortex30	3.60	226993.984	241851.375	0.939	1486.9
15 Sansvortex60	3.60	213732.563	247710.297	0.863	1366.9
16 Avecvortex0	3.60	132392.203	294989.344	0.449	710.8
17 Avecvortex5	3.60	183768.328	278528.594	0.660	1045.1
18 Avecvortex10	3.60	164050.719	281851.969	0.582	921.9
19 Avecvortex20	3.60	184792.203	253764.531	0.728	1153.5
20 Avecvortex30	3.60	204267.531	257159.797	0.794	1258.3
21 Avecvortex60	3.60	212040.703	254604.328	0.833	1319.3
22 Ultrason1	3.60	201282.594	248018.938	0.812	1285.6
23 Ultrason2	3.60	192059.719	238265.484	0.806	1276.9
24 Ultrason3	3.60	198722.203	253905.109	0.783	1239.8
25 Ultrason4	3.60	178607.703	249739.016	0.715	1132.9
26 Ultrason5	3.60	204039.406	248494.859	0.821	1300.8
27 Ultrason10	3.60	200052.719	236197.797	0.847	1341.7
28 Blanc_10min	3.62	2074.600	300418.625	0.007	10.5
29 Centrifu_14500_...	3.62	183921.453	248073.016	0.741	1174.4

3.2 PHASE ANALYTIQUE

3.2.1 PREMIERS ESSAIS

Nous avons tout d’abord pensé que les paramètres chromatographiques de notre première méthode de dosage donnaient des résultats concluants (figure 27). Cependant, le rapport entre les deux ions fils n’était pas celui retrouvé dans la littérature (rapport entre les ions fils = 2.0), notre rapport était plus élevé (environ 3.0). Ainsi, nous avons envisagé une co-élution avec l’un des deux ions fils. Nous avons donc cherché à séparer ces deux composés.

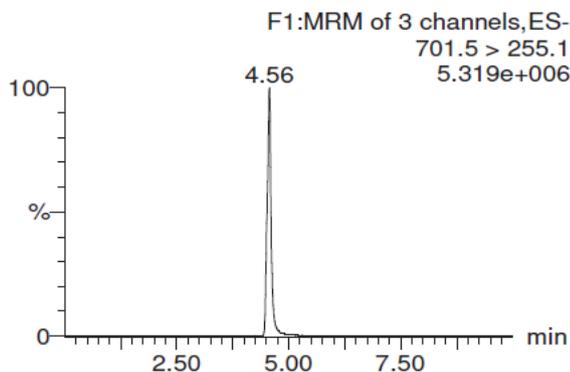


Figure 27: Premiers essais selon la méthode J.Dégion 2018

3.2.2 MOLARITE

Les tests ont été effectués à 2 mM, 5 mM (figure 28) et 10 mM (figure 29). Nous avons conclu que le 10 mM d'Acétate d'ammonium est le plus efficace (delta de temps de rétention le plus élevé) pour discriminer les pics.

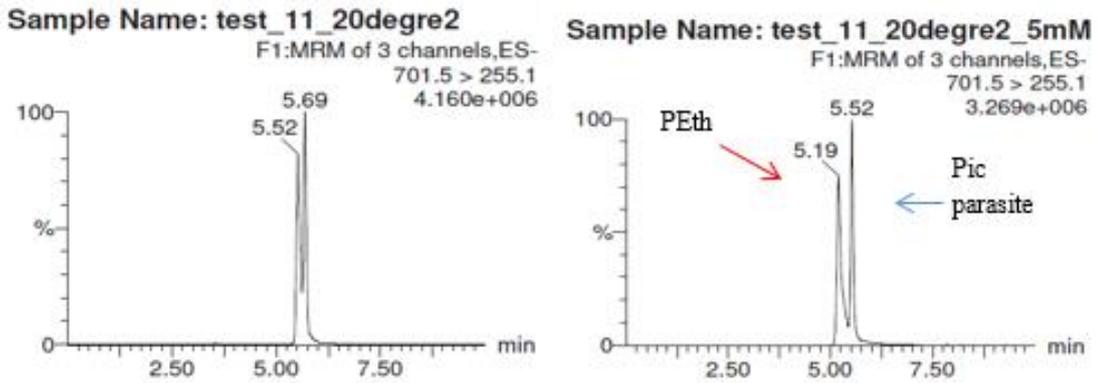


Figure 28: Chromatogramme selon la molarité d'acétate d'ammonium (2 mM à gauche et 5 mM à droite)

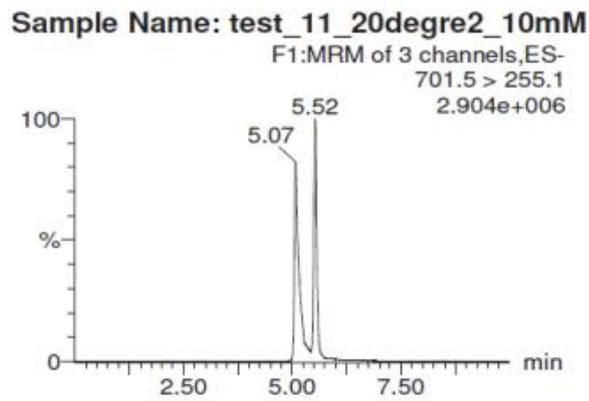


Figure 29: Chromatogramme selon la molarité d'acétate d'ammonium (10 mM)

3.2.3 pH

La modification du pH montre (figure 30) une légère amélioration de la séparation des deux pics.

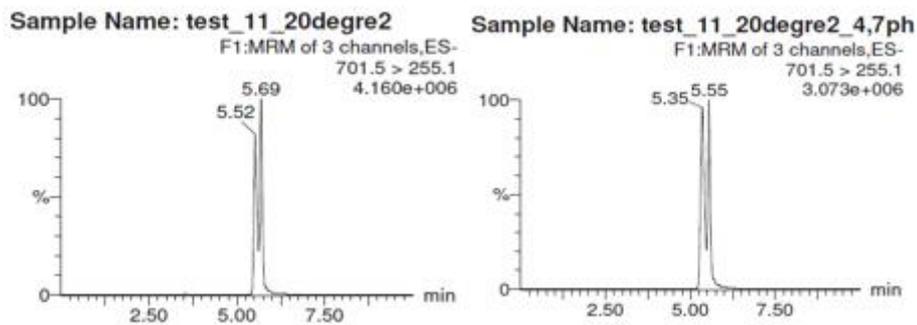


Figure 30: Chromatogramme selon le pH (3,7 à gauche et 4,7 à droite)

3.2.4 DEBIT DE LA PHASE MOBILE

Les essais de débits (figure 31), montrent que, du fait de la viscosité accrue des solvants à basse température (20°C), notamment 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.

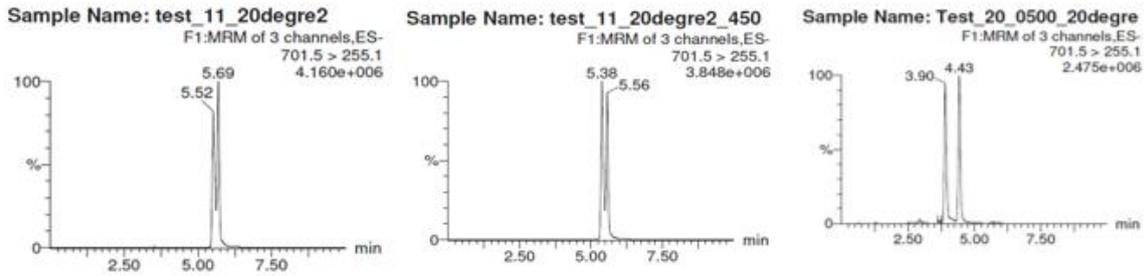


Figure 31: Chromatogramme selon le débit (de gauche à droite : 0,4 ; 0,45 et 0,5 mL/min)

3.2.5 TEMPERATURE DE COLONNE

Les résultats des tests de température (figures 32 et 33) 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.

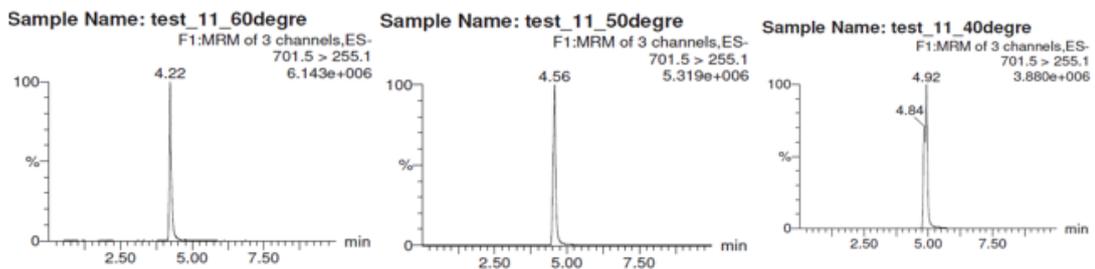


Figure 32: Chromatogramme selon la température de colonne (de gauche à droite: 60, 50 et 40°C)

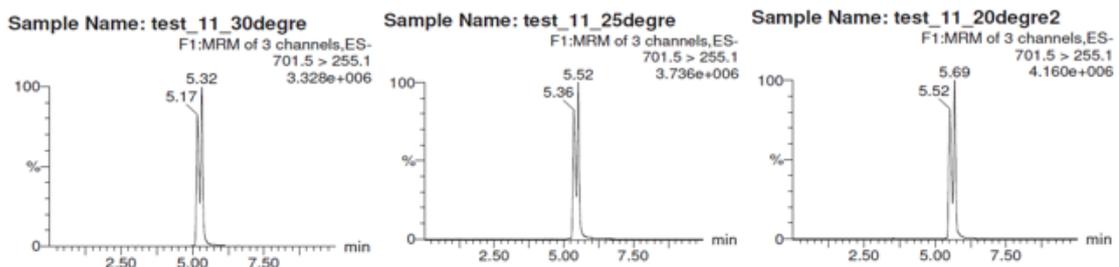


Figure 33: Chromatogramme selon la température de colonne (de gauche à droite: 30, 25 et 20°C)

3.2.6 GRADIENTS DES PHASES MOBILES

Les tableaux des gradients sont disponibles en annexe 2 et étudient :

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

À la suite de ces modifications, le test 20 nous permet de parvenir à un delta de séparation de 0,38 minute (figure 34).

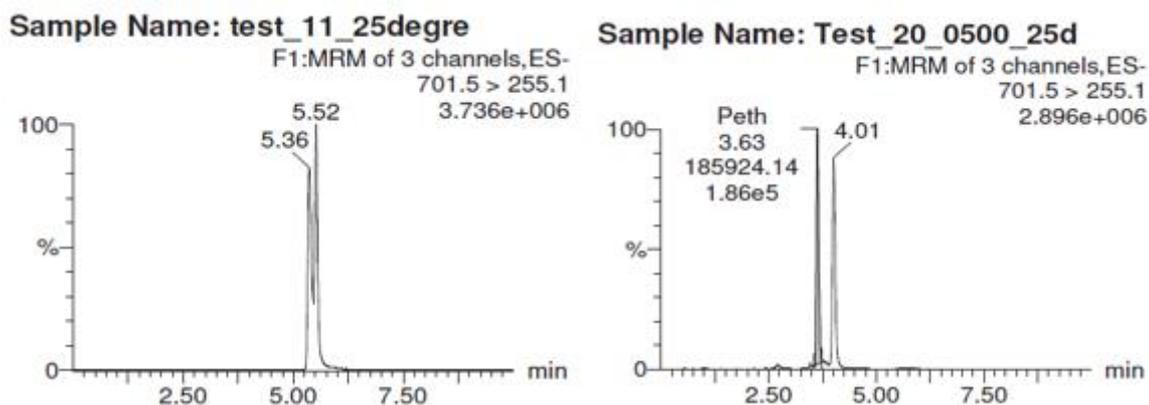


Figure 34: Comparaison des chromatogrammes du gradient le moins efficace (test 11) et du plus efficace (test 20) (Tableau des gradients disponibles en annexe 2)

3.2.7 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 AUC maximale (30 V), puis quelle énergie de collision (fragmentation par collision d'un atome neutre (Argon)) permet une AUC maximale pour chaque ion fils (32 V pour l'ion 1 et 36 V pour l'ion 2).

3.2.8 VALIDATION

Les données de validation de méthode effectuée selon la norme ISO 15189 et accréditée CoFrac en portée B sont résumées dans le tableau 10.

Tableau 10 : Données de validation de la méthode de dosage sanguin des PEth 16:0/18:1 et 16:0/20:4 sur DBS

	PEth 16:0/18:1	PEth 16:0/20:4
Gamme de calibration	2 - 1000 µg/L	2 – 500 µg/L
CV	$R^2 \geq 0.999$	$R^2 \geq 0.998$
Limite de détection (LDD)	5 µg/L	5 µg/L
Limite inférieure de quantification (LIDQ)	5 µg/L	5 µg/L
Répétabilité	$CV \leq 6\%$	$CV \leq 11\%$
Reproductibilité	$CV \leq 8\%$	$CV \leq 15\%$
Limite supérieure de quantification (LSDQ)	1000 µg/L	500 µg/L
Contamination	1,12 %	0,17 %

APPLICATION : PROTOCOLE DE RECHERCHE PETHOXICO

1 MISE EN ŒUVRE

Le protocole PETHOXICO a pour objectif de confronter les résultats de patients consommateurs chroniques et excessifs d'éthanol au cut-off proposé dans la littérature. Pour cela, nous allons déterminer le pourcentage de patients pour lesquels la concentration de PEth est supérieure à 210 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 (39). Il est 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 deuxième temps, nous définirons 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 sera proposée à tous les patients majeurs consommateurs d'éthanol, présentant un TUA. Ils seront 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 sera réalisé lors de l'admission. Le patient sera interrogé sur ses consommations concernant le mois précédant l'admission et une prise de sang sera effectuée (tube citraté de 5 mL). Les prélèvements seront transportés réfrigérés sous 24h au laboratoire de toxicologie. À leur arrivée 10 µL de sang total seront déposés sur papier buvard pour doser deux isoformes de PEth : 16:0/18:1 et 16:0/20:4.

2 RESULATS

Les données brutes de cette étude sont disponibles en annexe 3. Nous avons inclus, de novembre 2020 à mars 2021, 36 patients (10 femmes et 26 hommes) ayant un âge moyen de 47,5 ans (\pm 9,8 ans).

Les concentrations moyennes en PEth 16:0/18 :1 et 16:0/20:4 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 non-détectée à 2353 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 35). 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).

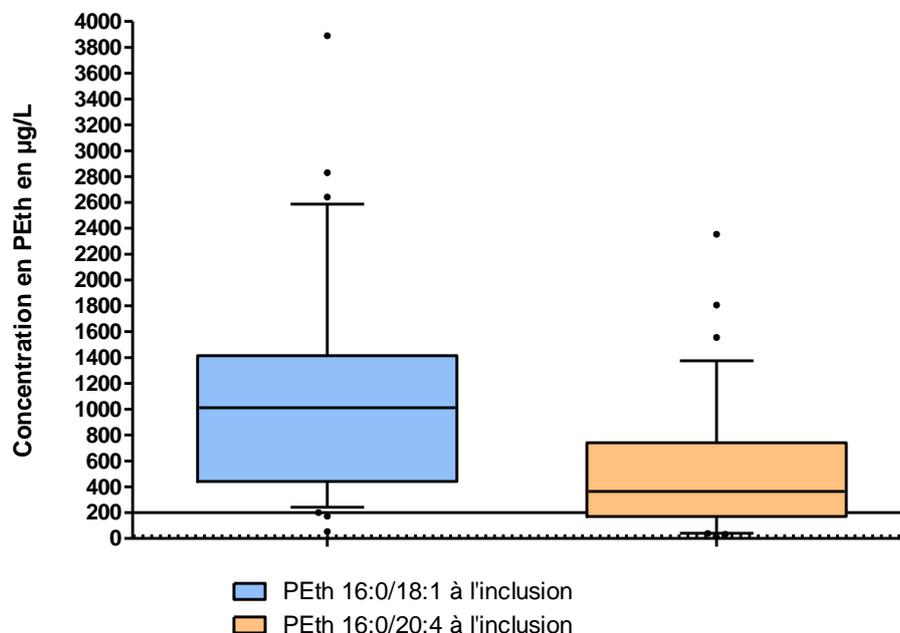


Figure 35: Répartition des concentrations en PEth lors de l'inclusion, la ligne en pointillé correspond à une concentration de 20 µg/L et celle en trait plein à une concentration de 200 µg/L (n=36, Whiskers 10-90 percentile)

Pour le second prélèvement dont le délai moyen après l'inclusion est de 6,7 jours (étendue : 6 à 8 jours), les concentrations moyenne 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 peut s'expliquer par la demi-vie 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 36 à 39).

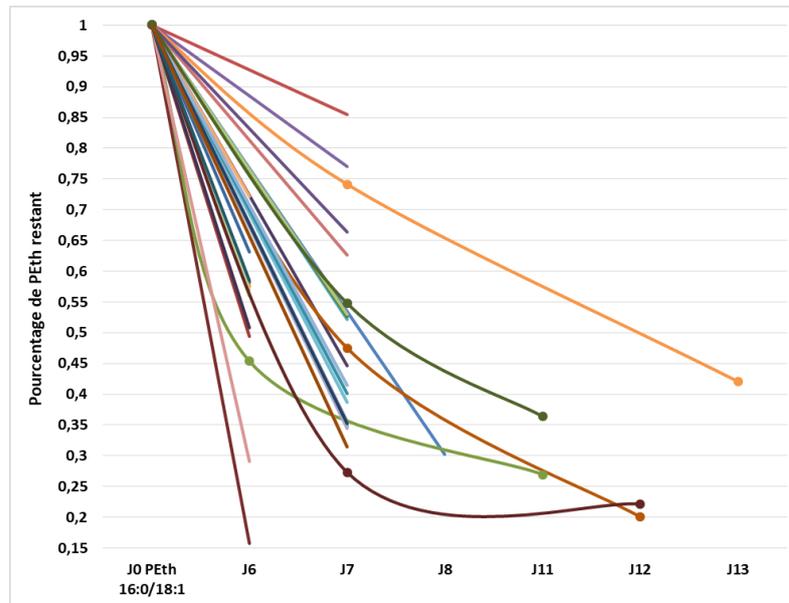


Figure 36: Décroissance du PEth 16:0/18:1 depuis le prélèvement d'admission

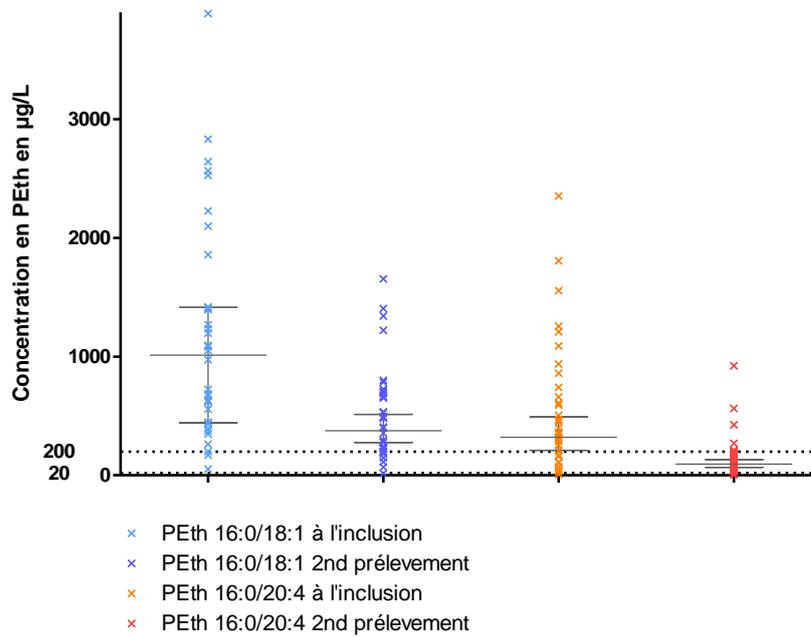


Figure 37: Répartition des concentrations en PEth 16:0/18:1 et 16:0/20:4 entre le prélèvement d'admission et le 2nd prélèvement

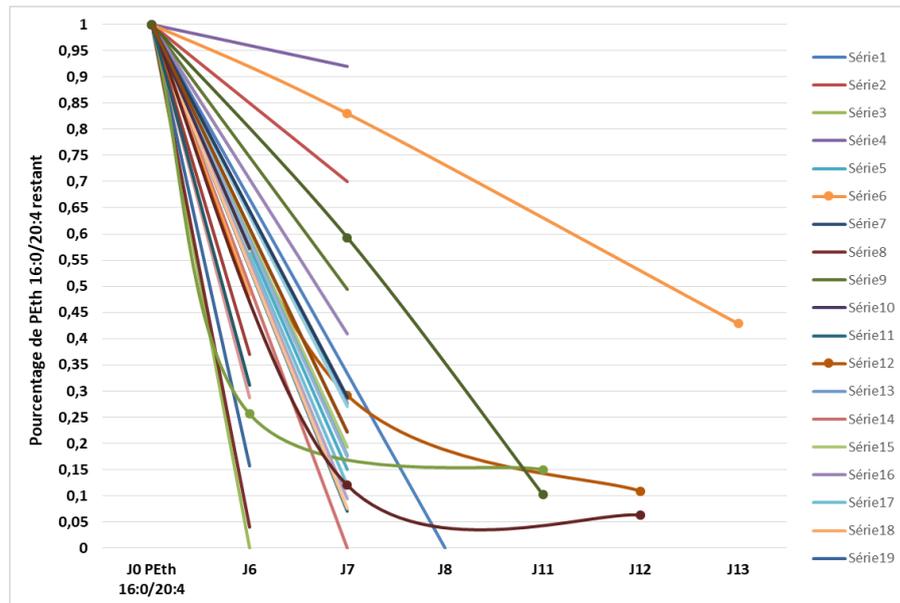


Figure 38: Décroissance du PEth 16:0/20:4 depuis le prélèvement d'admission

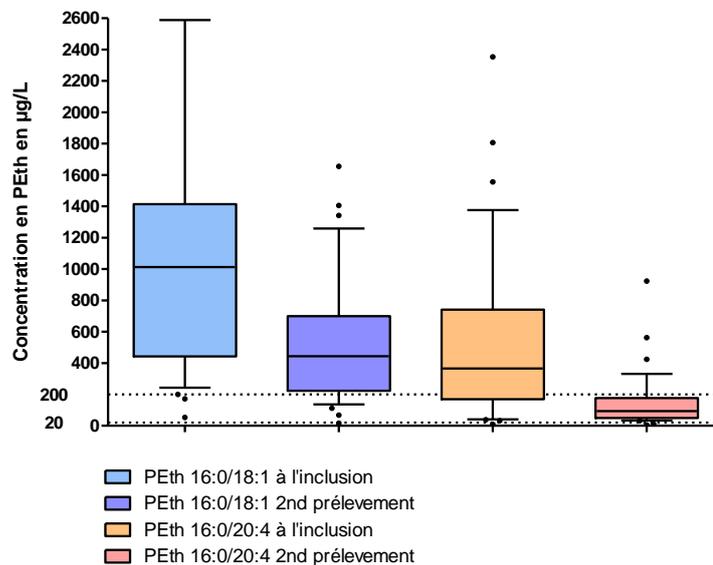


Figure 39: Concentrations sanguines en PEth 16:0/18:1 et 16:0/20:4 dans une population de patients hospitalisés pour sevrage alcoolique à l'admission et à la sortie (n=37, Whiskers 10-90 percentile)

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 (figure 40).

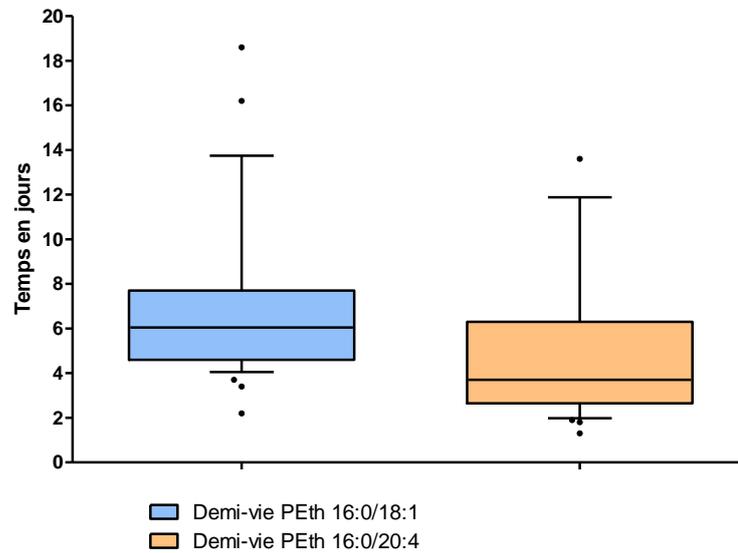


Figure 40: Demi-vie des PEth 16:0/18:1 et 16:0/20:4 dans une population de patients hospitalisés pour sevrage alcoolique (n=36, Whiskers 10-90 percentile)

Sur 5 patients dont l'hospitalisation a été de plus de 10 jours, 3 prélèvements ont été effectués avec un délai moyen entre le 2^{ème} et le 3^{ème} prélèvement de 5 jours. Chez un de ces participant, 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 être expliqué si le patient a bénéficié d'une permission durant son séjour et re-consommé durant cette permission.

Les données de cette étude ne montrent pas de différence significative pour les demi-vies d'élimination du PEth selon le sexe des individus (figure 41 et 42).

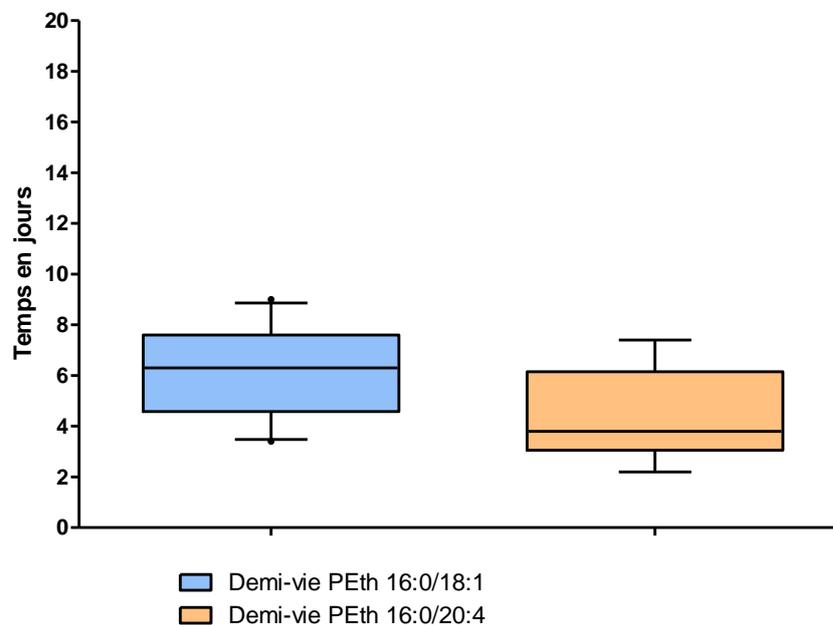


Figure 41: Demi-vie des PEth 16:0/18:1 et 16:0/20:4 dans une population de patients hospitalisés pour sevrage alcoolique. Population de sexe féminin (n=10, Whiskers 10-90 percentile)

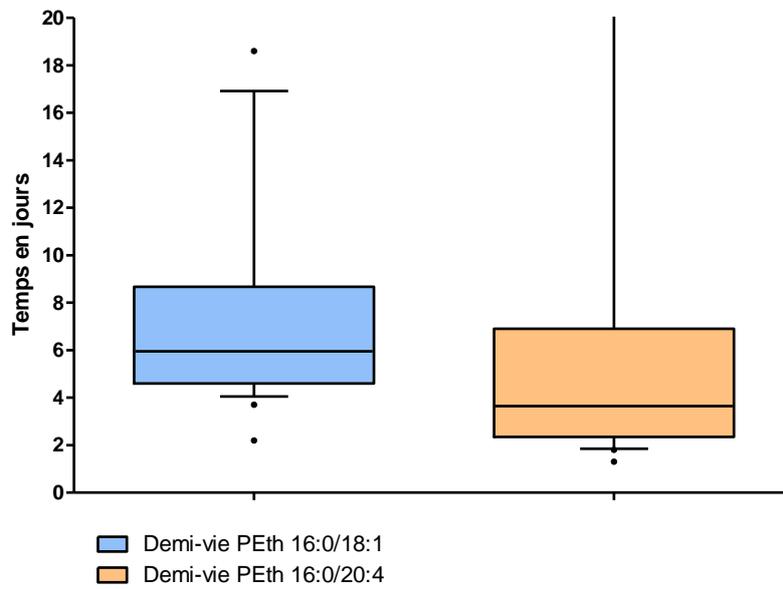


Figure 42: Demi-vie des PEth 16:0/18:1 et 16:0/20:4 dans une population de patients hospitalisés pour sevrage alcoolique. Population de sexe masculin (n=26, Whiskers 10-90 percentile)

CONCLUSION

Le développement de la méthode de dosage du PEth dans le sang a présenté de nombreux écueils pré-analytiques comme analytiques. La matrice de cette méthode de dosage (le sang total) contient de nombreux phospholipides similaires au PEth ce qui a nécessité un important travail de mise au point de la séparation chromatographique. Après optimisation, nous avons pu suffisamment séparer les pics parasites pour qu'ils n'interfèrent plus sur l'intégration des pics des deux ions fils du PEth. L'optimisation de la source et du spectromètre de masse a permis de diminuer la limite de quantification du dosage du PEth, nécessaire pour cet analyte dont les concentrations sanguines sont de l'ordre du $\mu\text{g/L}$.

Outre les résultats des tests de stabilité qui indiquent une stabilité du PEth dans les tubes de sang citratés de 1 jour à température ambiante et de 7 jours à 4°C , les tests de néoformation du PEth dans le tube de sang en présence d'éthanol indiquent la nécessité de conserver les tubes dans un délai inférieur à 4 heures à 4°C . Cependant, le suivi du transport de tube de sang à 4°C demeure compliqué et incertain. Ainsi, les DBS, avec une stabilité supérieure à 6 mois à température ambiante, permettent en plus de cette stabilisation du PEth, un stockage facilité (pas besoin de réfrigérateur, espace nécessaire restreint, transport par simple envoi postal...) et la possibilité d'un prélèvement capillaire moins invasif. Ils nécessitent cependant la dépose d'un volume précis et connu de sang et donc le recours, pour les services cliniques, à des dispositifs de prélèvements capillaires volumétriques pouvant s'avérer coûteux.

La validation de cette méthode de dosage sanguin du PEth selon la norme EN ISO 15189 a nécessité la détermination de nombreux paramètres tels que la justesse, la fidélité, la sélectivité, la spécificité, la répétabilité, la reproductibilité, la robustesse et la stabilité du métabolite. Cette validation nous a permis de proposer, en routine, au laboratoire de toxicologie du CHU de Lille, le dosage du PEth. Les résultats du protocole de recherche clinique PETHOXICO confortent globalement les données retrouvées dans la littérature, que ce soit pour la valeur seuil d'interprétation de $200 \mu\text{g/L}$ 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 4j contre 2j). 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 d'avenir.

D'autres protocoles sont en cours (annexe 4), notamment avec les services d'obstétrique dans le suivi de la consommation d'alcool chez la femme enceinte.

BIBLIOGRAPHIE

1. Beck F, Richard JB. La consommation d'alcool en France. *Presse Med.* 2014;43:1067–79.
2. Richard JB, Andler R, Cogordan C, Spilka S, F N-TV. 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.* 2013;23:588–93.
4. Inserm (dir.). *Alcool : Effets sur la santé. Synthèse et recommandations.* Paris : Les éditions Inserm, 2001, X- 49 p. - (Expertise collective). - <http://hdl.handle.net/10608/169>
5. 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;
6. Société Française d'Alcoologie. Mésusage de l'alcool : dépistage, diagnostic et traitement. Recommandation de bonne pratique. *Alcoologie Et Addictologie.* 2015 37(1), 5-84. Consulté à l'adresse <https://www.alcoologie-et-addictologie.fr/index.php/aa/article/view/570>
7. Drinking levels defined. NIAAA Alcohol & Your Health website. In: Accès le 09/04/2021 [Internet]. Available from: <https://www.niaaa.nih.gov/alcohol-health/overview-alcohol-consumption/moderate-binge-drinking>.
8. International guide for monitoring alcohol consumption and related Harm. Oms; 2000.
9. France S. Avis d'experts relatif à l'évolution du discours public en matière de consommation d'alcool en France. Vol. 2017.
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.
11. H.A.S. Troubles causés par l'alcoolisation fœtale : repérage. Rapp D'élaboration. 2013;
12. Celli R, Zhang X. Pathology of Alcoholic Liver Disease. *J Clin Transl Hepatol.* 2014 Jun;2(2):103-9. doi: 10.14218/JCTH.2014.00010

13. 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 Feb;42(2):238–43.
14. 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 Apr;41(4):857–62.
15. 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 May;11(5):105–10.
16. Goullé J, Lacroix C. Alcoolémie : aspects médico-légaux. *Annales Pharmaceutiques Françaises.* 2001;59(4):278.
17. Goullé JP, Guerbet M. Pharmacocinétique, métabolisme et méthodes analytiques. *Ann Pharm Fr.* 2015;73(5):313–22.
18. Mitchell MC, Teigen EL, Ramchandani VA. Absorption and Peak Blood Alcohol Concentration After Drinking Beer, Wine, or Spirits. *Alcohol Clin Exp Res.* 2014 May;38(5):1200–4.
19. Lands WEM. A review of alcohol clearance in humans. *Alcohol.* 1998 Feb 1;15(2):147–60.
20. 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.
21. Pajunen T, Vuori E, Lunetta P. Epidemiology of alcohol-related unintentional drowning: is post-mortem ethanol production a real challenge? *Inj Epidemiol.* 2018 Nov 1;5(1):39.
22. Heier C, Xie H, Zimmermann R. Nonoxidative ethanol metabolism in humans-from biomarkers to bioactive lipids: Nonoxidative Ethanol Metabolism in Humans. *IUBMB Life.* 2016 Dec;68(12):916–23.
23. 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.* 2015;249:A1–2.

24. Simon TW. Providing context for phosphatidylethanol as a biomarker of alcohol consumption with a pharmacokinetic model. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018 Apr;94:163–71.
25. 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*. 2007 Mar;12(1):81–4.
26. 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 Jul;50(4):399–406.
27. 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.
28. Alling C, Gustavsson L, Änggård E. An abnormal phospholipid in rat organs after ethanol treatment. *FEBS Lett*. 1983 Feb 7;152(1):24–8.
29. Gustavsson L, Alling C. Formation of phosphatidylethanol in rat brain by phospholipase D. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987 Feb;142(3):958–63.
30. Kobayashi M, Kanfer JN. Phosphatidylethanol Formation via Transphosphatidylation by Rat Brain Synaptosomal Phospholipase D. *J Neurochem*. 1987 May;48(5):1597–603.
31. Frohman MA. The phospholipase D superfamily as therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36:137–44.
32. Siddiqi AR, Srajer GE, Leslie CC. Regulation of human PLD1 and PLD2 by calcium and protein kinase C. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2000;1497:103–14.
33. 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.

34. Pai JK, Liebl EC, Tettenborn CS, Ikegwuonu FI, Mueller GC. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activates the synthesis of phosphatidylethanol in animal cells exposed to ethanol. *Carcinogenesis*. 1987;8:173–8.
35. Lundqvist C, Alling C, Aradóttir S, Gustavsson L. Agonist-Stimulated and Basal Phosphatidylethanol Formation in Neutrophils from Alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*. 1994 Jun;18(3):580–6.
36. Aradóttir S, Moller K, Alling C. Phosphatidylethanol formation and degradation in human and rat blood. *Alcohol Alcohol*. 2004;39:8–13.
37. 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.
38. 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 Jan;33(1):e22631.
39. 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 Jan;408(3):825–38.
40. Shield KD, Parry C, Rehm J. Chronic Diseases and Conditions Related to Alcohol Use. *Alcohol Res*. 2012:155–73.
41. 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.
42. 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 Jan;131(1):153–60.
43. 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 May;42(5):851–60.

44. 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 Nov;63(6):1634–40.
45. Nguyen VL, Fitzpatrick M. Should phosphatidylethanol be currently analysed using whole blood, dried blood spots or both? *Clin Chem Lab Med CCLM.* 2019 Apr 24;57(5):617–22.
46. 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 Apr;40(2):268–75.
47. 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 Jan 1;42(1):33–41.
48. Kummer N, Lambert WEE, Samyn N, Stove CP. Alternative sampling strategies for the assessment of alcohol intake of living persons. *Clin Biochem.* 2016 Sep;49(13–14):1078–91.
49. 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 Nov;42(11):2094–9.
50. Helander A, Zheng Y. Molecular Species of the Alcohol Biomarker Phosphatidylethanol in Human Blood Measured by LC-MS. *Clin Chem.* 2009 Jul 1;55(7):1395–405.
51. 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 May;127(3):603–10.
52. 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 Apr;479:38–42.
53. Bakhireva LN, Shrestha S, Gutierrez HL, Berry M, Schmitt C, Sarangarm D. Stability of Phosphatidylethanol in Dry Blood Spot Cards. *Alcohol Alcohol.* 2016 May;51(3):275–80.

54. Viel G, Boscolo-Berto R, Cecchetto G, Fais P, Nalesso A, Ferrara S. Phosphatidylethanol in Blood as a Marker of Chronic Alcohol Use: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*. 2012 Nov 13;13(12):14788–812.
55. Helander A, Hansson T. [National harmonization of the alcohol biomarker PEth]. *Lakartidningen*. 2013 Oct 25;110(39–40):1747–8.
56. 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. *Toxicol Anal Clin*. 2018 Jun;30(2):S42–3.
57. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int*. 2007;165(2–3):216–24.
58. 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.
59. Peters FT, Wissenbach DK, Busardo FP, Marchei E, Pichini S. Method Development in Forensic Toxicology. *Curr Pharm Des*. 2017;23(36):5455–67.
60. Wille SMR, Peters FT, Di Fazio V, Samyn N. Practical aspects concerning validation and quality control for forensic and clinical bioanalytical quantitative methods. *Accred Qual Assur*. 2011;16:279–92.
61. 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.
62. SH-GTA-04 [Internet]. CoFrAc. [cited 2021 Apr 24]. Available from: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
63. SH-GTA-06 [Internet]. CoFrAc. [cited 2021 Apr 24]. Available from: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-06>

ANNEXES

ANNEXE 1 : Tableau des paramètres de validation	86
ANNEXE 2 : Tests des gradients	87
ANNEXE 3 : Tableau des résultats du projet PETHOXICO	88
ANNEXE 4 : Études cliniques en cours	89

ANNEXE 1 : TABLEAU DES PARAMETRES 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>

ANNEXE 2 : TESTS DES GRADIENTS

TEST 1			TEST 4			TEST 11			TEST 11 B			
DUREE (MIN)	A2 (%)	B2 (%)	DUREE (MIN)	A2 (%)	B2 (%)	DUREE (MIN)	A2 (%)	B2 (%)	DUREE (MIN)	A2 (%)	DUREE (MIN)	
0	70	30	0	70	30	0	70	30	0	80	0	
1	70	30	1	70	30	1	70	30	1	80	2	
4.5	5	95	3.5	5	95	9	5	95	9	5	5.5	
5	5	95	5	1	99	9.1	70	30	9.1	80	6	
5.5	70	30	6	70	30	10	70	30	10	80	10	
10	70	30	10	70	30							
RESULTATS (MIN)	Temps de rétention: 3.31 DELTA RT : 0.02			Temps de rétention: ND DELTA RT : 0			Temps de rétention: 5.36 DELTA RT : 0.19			Temps de rétention: 5.19 Delta RT : 0.20		

TEST 13			TEST 15			TEST 16			TEST 20			
A2 (%)	B2 (%)	B2 (%)	DUREE (MIN)	A2 (%)	B2 (%)	DUREE (MIN)	A2 (%)	B2 (%)	DUREE (MIN)	A2 (%)	B2 (%)	
90	10	20	0	70	30	0	90	10	0	100	0	
90	10	20	2	70	30	3	90	10	3	100	0	
5	95	95	5.5	5	95	8	5	95	8	5	95	
90	10	20	6	70	30	8.1	90	10	8.1	100	0	
90	10	20	10	70	30	10	90	10	10	100	0	
RESULTATS (MIN)	Temps de rétention: 4.35 Delta RT : 0.24			Temps de rétention: 4.83 Delta RT : 0.18			Temps de rétention: 6.69 Delta RT : 0.25			Temps de rétention: 3.63 Delta RT : 0.38		

ANNEXE 3 : TABLEAU DES RESULTATS DU PROJET PETHOXICO

	Sexe	Age (ans)	Résultat inclusion PEth 16:0/18:1 (µg/L)	Résultat inclusion PEth 16:0/20:4 (µg/L)	Résultat 2nd prélèvement PEth 16:0/18:1 µg/L	Résultat 2nd prélèvement PEth 16:0/20:4 µg/L	Délai entre les prélèvements 1 et 2 (Jours)	Demi-vie d'élimination PEth 16:0/18:1 (jours)	Demi-vie d'élimination PEth 16:0/20:4 (Jours)
1	M	43	53	9	16	<5	8	4,6	/
2	M	49	172	70	147	49	7	30,9	13,6
3	F	43	200	32	112	ND	6	7,2	/
4	M	30	261	39	201	36	7	18,6	60,6
5	M	44	347	255	181	38	7	7,5	2,5
6	M	42	371	42	275	35	7	16,2	26,6
7	M	51	394	103	229	66	6	7,7	9,3
8	M	53	432	254	68	11	6	2,2	1,3
9	F	40	441	170	232	84	7	7,6	6,9
10	M	61	446	158	199	35	7	6,0	3,2
11	M	51	557	471	194	33	7	4,6	1,8
12	F	45	619	322	294	94	7	6,5	3,9
13	F	38	625	286	222	79	7	4,7	3,8
14	M	41	634	ND	397	139	7	10,4	/
15	F	37	670	462	355	89	7	7,6	2,9
16	F	67	683	110	242	45	7	4,7	5,4
17	M	46	724	609	280	73	7	5,1	2,3
18	M	33	973	308	702	149	6	12,7	5,7
19	F	59	1052	937	664	147	6	9,0	2,2
20	M	64	1083	365	535	135	6	5,9	4,2
21	M	61	1091	207	495	53	6	5,3	3,1
22	M	59	1094	659	726	190	7	11,8	3,9
23	M	47	1197	1089	480	192	7	5,3	2,8
24	M	58	1235	450	710	212	6	7,5	5,5
25	M	41	1269	505	526	88	7	5,5	2,8
26	F	57	1396	397	406	114	6	3,4	3,3
27	M	35	1406	358	801	203	6	7,4	7,3
28	M	63	1417	1256	488	118	7	4,6	2,1
29	M	43	1859	348	650	94	7	4,6	3,7
30	M	47	2098	2353	661	177	7	4,2	1,9
31	M	40	2227	591	784	170	7	4,6	3,9
32	M	55	2526	859	690	103	7	3,7	2,3
33	M	36	2565	1556	1405	923	7	8,1	9,3
34	F	52	2642	741	1342	424	6	6,1	7,4
35	M	45	2831	1807	1655	562	6	7,7	3,6
36	F	36	3889	1208	1222	268	7	4,2	3,2
Médiane		46	1013	365	443	99	7	6	4
Moyenne		47,5	1152,2	553,9	516,3	153,8	6,7	7,6	6,7
Etendue		30-67	53-3889	ND-2353	16-1655	ND-923	6-8	2,2-30,9	1,3-60,6
Demi - vie = $\frac{\ln 2 \times \text{délai}}{\ln C1/C2}$									

Post analytique : Mise en œuvre d'un protocole de recherche

PREPARATION D'UN PROTOCOLE DE RECHERCHE

Source : LEEM. Conférence de presse “Attractivité de la France pour la recherche clinique” 2018. Un essai clinique désigne une recherche biomédicale pratiquée chez l'homme en vue de développer les connaissances biologiques ou médicales.

Lors d'un essai clinique, il y existe 4 étapes successives :

- **Phase de préparation** : Consiste à rédiger la question scientifique à laquelle on souhaite répondre et à rédiger le protocole de recherche correspondant.
- **Phase de validation** : Demande d'autorisation par le comité de protection des personnes (CPP) et par l'ANSM selon la catégorie de l'essai clinique.
- **Phase d'inclusion et de suivi** : Marque le début de l'essai clinique, les patients sont envoyés vers leurs médecins, les données sont recueillies au cours de l'essai, on vérifie la cohérence des informations.
- **Phase d'analyse et de publication** : La base de données est complète et cohérente l'analyse des données peut commencer et être traitée. Une revue scientifique peut alors être rédigée.

Lors de la rédaction d'un protocole de recherche, une revue exhaustive de la littérature sur le sujet de recherche est effectuée, cela permet de mieux comprendre le sujet et d'expliquer pourquoi il est nécessaire d'entreprendre cette nouvelle recherche.

Les nouvelles catégories de recherches définies selon le niveau de risque encouru mises en place par la loi Jardé de 2012 (art L1121-1), et les avis et/ou autorisations à obtenir.

AVANT : LOI HURIET RÉVISÉE (2004)	APRÈS : LOI JARDÉ (2012)
Recherches biomédicales AVIS FAVORABLE CCP + AUTORISATION ANSM	Recherches interventionnelles non dénuées de risques AVIS FAVORABLE CCP + AUTORISATION ANSM
Recherches portant sur les soins courants AVIS FAVORABLE CCP	Recherches à risques minimales (liste publiée par arrêté) AVIS FAVORABLE CCP
Recherches non-interventionnelles HORS CHAMP DE LA LOI HURIET	Recherches non-interventionnelles AVIS FAVORABLE CCP

Depuis la modernisation de la loi du 26 janvier 2016, la notion de recherche biomédicale est ainsi remplacée par la recherche impliquant la personne humaine qui regroupe les **recherches interventionnelles** et les **recherches non interventionnelles**.

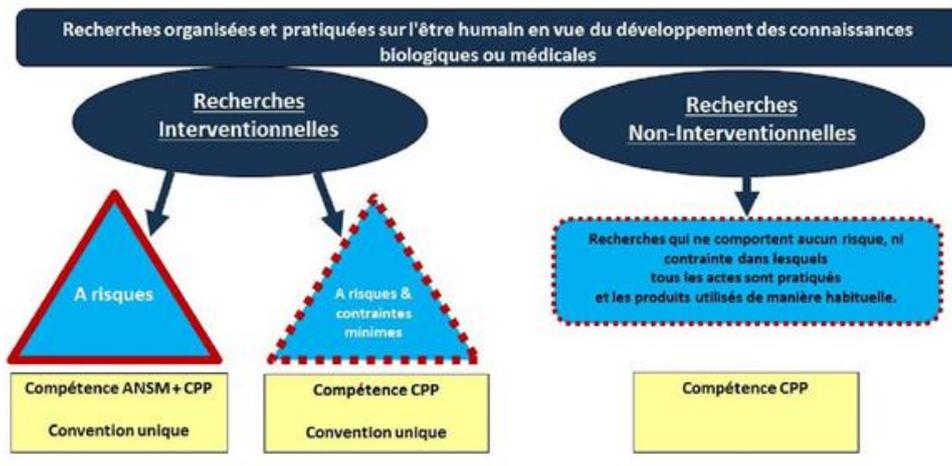


Schéma récapitulatif de l'encadrement des recherches sur la personne

(<https://www.leem.org/sites/default/files/questions%20sur%20les%20essais%20cliniquesVF.pdf> (Visité le 15/01/19))

La CNIL (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés) a aussi une responsabilité vis-à-vis des données personnelles afin de le recueillir et de les protéger.

L'avis favorable du CPP :

Dans un délai de 60 jours, le CPP a pour mission de donner un avis à toute recherche clinique impliquant la personne humaine. Cet avis est indispensable pour entreprendre une recherche.

Les missions du CPP :

Le CPP s'assure de la pertinence de la recherche et assure la protection des participants lors d'un essai clinique (information préalable, recueil du consentement, période d'exclusion, délai de réflexion ...). Il vérifie si l'évaluation du rapport bénéfice/risque est satisfaisante ainsi que la méthodologie. Les membres des CPP sont bénévoles, tenus au secret professionnel, indépendants vis-à-vis des investigateurs et des promoteurs.

PROTOCOLE AUTOQUEST

Ce projet a pour titre : Évaluation de la valeur diagnostique d'un autoquestionnaire T-ACE pour dépister les consommations d'alcool à risque pendant la grossesse : comparaison au résultat du dosage d'un biomarqueur sanguin utilisé comme « gold standard ». Étude AUTOQUEST.

C'est un protocole de gynécologie utilisant le PEth comme « gold standard » en comparaison avec un autoquestionnaire, le T-ACE. C'est une étude de catégorie 2, diagnostique, multicentrique, régionale et transversale avec recrutement prospectif de 2425 femmes enceintes suivies en période anténatale dans 3 maternités hospitalières (Roubaix, Arras, Lille). L'autoquestionnaire T-ACE est systématiquement remis aux femmes enceintes lors de leurs consultations prénatales dans les 3 maternités. Durant la période de recrutement de

l'étude, il sera proposé à chaque femme enceinte éligible se présentant dans l'un des 3 centres pour une consultation prénatale, et ayant rendu son autoquestionnaire, un unique prélèvement sanguin pour dosage du phosphatidyléthanol. Si elle accepte de participer à l'étude et signe le consentement éclairé, le dosage sanguin sera réalisé le jour même au décours de la consultation prénatale. La durée prévisionnelle de recrutement sera d'une année.

Objectif principal : Évaluer la sensibilité du T-ACE administré par autoquestionnaire dans le repérage de l'alcoolisation à risque pendant la grossesse par rapport au résultat du dosage sanguin de phosphatidyléthanol utilisé comme « gold-standard » d'une consommation d'éthanol au cours des 3 semaines précédentes.

Tableau 11: Questionnaire T-ACE

Devez-vous consommer plus de 2 verres d'alcool pour sentir son effet ?	<input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> oui
Les gens vous ont-ils déjà agacé en critiquant votre consommation d'alcool ?	<input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> oui
Avez-vous déjà eu l'impression que vous devriez réduire votre consommation d'alcool ?	<input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> oui
Vous est-il déjà arrivé de prendre un verre en vous levant pour calmer vos nerfs ou vous débarrasser d'une gueule de bois ?	<input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> oui

Acronyme : T = Tolerance (Q1) ; A = Annoyed (Q2) ; C = Cut-Down (Q3) ; E = Eye-opener (Q4)

Chaque réponse « oui » est cotée 1 point, sauf pour la question sur la tolérance (Q1) qui est cotée 2 points. Un score supérieur ou égal à 2 points est positif et identifie la patiente comme consommatrice.

PROTOCOLE CARMEL

Phase 2 d'un protocole multicentrique 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 troubles de l'usage d'alcool / Projet de recherche clinique de catégorie 1 (recherche interventionnelle) / Promoteur : Centre Hospitalier Le Vinatier, Lyon en cours de soumission CPP.

PROTOCOLE ELICSIR

L'objectif de cette étude est de comparer les patients d'HEPAVIH CO13 (Cohorte de l'ANRS concernant des patients co-infectés VIH-VHC) ayant un 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 / Projet de recherche ANRS hors recherche fondamentale

PROTOCOLE EN COURS D'ELABORATION

- PEth dans le cadre de la transplantation hépatique
- PEth *in-vitro* sur HepaRG (cellules de culture différenciées en hépatocytes)
- PEth dans le cadre *post-mortem*

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
(Tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2020/2021

Nom : HAKIM

Prénom : Florian

Titre du mémoire / thèse : Développement, validation, mise en œuvre et application d'une méthode de dosage d'un biomarqueur de la consommation d'éthanol : le phosphatidyléthanol sanguin

Mots-clés : Phosphatidyléthanol (PEth), Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem (CL-SM/SM), *Dried Blood Spot* (DBS), Ethanol, Validation

Résumé : L'éthanol est un toxique communément consommé et dont l'abus chronique est associé à de nombreux problèmes sociétaux et pathologies. Les biomarqueurs directs actuels d'une consommation d'alcool ne permettent de détecter et d'estimer cette consommation que durant 24 heures pour l'éthanol et 3 jours pour l'éthylglucuronide urinaire. Ainsi, nous avons cherché à identifier un biomarqueur direct permettant d'estimer la consommation d'alcool sur une période plus importante. Pour cela, nous avons développé une méthode de dosage du phosphatidyléthanol dans le sang séché par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem. En effet, ce nouveau biomarqueur offre une fenêtre de détection de 21 à 28 jours. Nous avons développé cette méthode de dosage en optimisant les paramètres pré-analytiques (le moyen de prélèvement, la stabilité et l'extraction du phosphatidyléthanol), puis analytiques (séparation chromatographique et paramètres de détection spectrométrique).

Le développement de cette méthode se base notamment sur les résultats de stabilité pré-analytique qui nous ont permis de définir une méthode de conservation applicable en routine (prélèvement sur buvards). Cette méthode de dosage a été validée et accréditée selon la norme EN ISO 15189 afin de la proposer en routine dans notre laboratoire. Enfin, nous avons entrepris le développement d'essais cliniques avec les cliniciens des principaux domaines médicaux intéressés tels que l'addictologie, la transplantation et le suivi de grossesse.

En conclusion, ce projet a permis de développer une méthode de détection et de quantification d'un biomarqueur disposant d'une fenêtre de détection dans le sang de 21 à 28 jours permettant d'optimiser le suivi des patients alcoolodépendants.

Keywords: Phosphatidylethanol (PEth), Liquid Chromatography coupled with tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS), *Dried Blood Spot* (DBS), Alcohol, Validation

Abstract: Ethanol is a widely consumed substance, whose chronic abuse is associated with many societal issues and pathologies. Currently used biomarkers of alcohol consumption allow a maximum detection window up to 24 hours for ethanol and 3 days for ethylglucuronide in urine. Thus, we sought to identify a direct biomarker allowing an alcohol consumption estimation over a longer period. For this, we have developed a blood phosphatidylethanol assay in *Dried Blood Spot* (DBS) by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Indeed, this new biomarker offers a detection window of 21 to 28 days. We have developed this assay method by optimizing pre-analytical (the sampling method, the stability and the extraction of phosphatidylethanol) and analytical parameters (chromatographic separation and spectrometric detection parameters).

This method development is mainly based on the results of pre-analytical stability which allowed us to define a conservation method applicable routinely (with DBS sampling). This method has been validated and accredited according to the EN ISO 15189 norm in order to offer it routinely in our laboratory. Finally, we have undertaken the development of clinical trials with clinicians from the main medical fields concerned, such as addictology, transplantation and obstetric.

In conclusion, this project has allowed the development of a biomarker with a detection window up to 28 days, enhancing the monitoring of alcohol-dependent patients.

Membres du jury :

Président : Mme le Professeur Delphine ALLORGE

PU-PH, PharmD, PhD, HDR

(CHU de Lille, Université de Lille - Faculté de pharmacie)

Assesseur(s) : M. le Professeur Olivier COTTENCIN

PU-PH, MD, PhD, HDR, Responsable du Service d'Addictologie

(CHU de Lille, Université de Lille - Faculté de médecine)

M. le Docteur Thomas GICQUEL

MCU-PH, PharmD, PhD, HDR (CHU de Rennes)

Directeur de Thèse:

M. le Docteur Jean-Michel GAULIER

PH, PharmD, PhD, HDR (CHU de Lille)