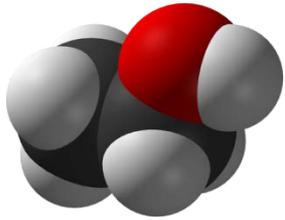


Centre Universitaire Romand
de Médecine Légale

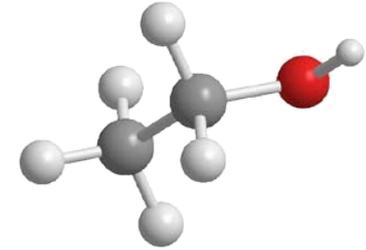
Indication des nouveaux marqueurs de la consommation d'alcool, l'exemple de l'éthylglucuronide

Marc Augsburger





Alcool



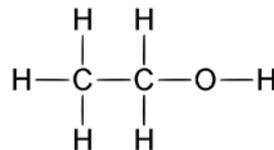
(alcool éthylique, éthanol)

($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)

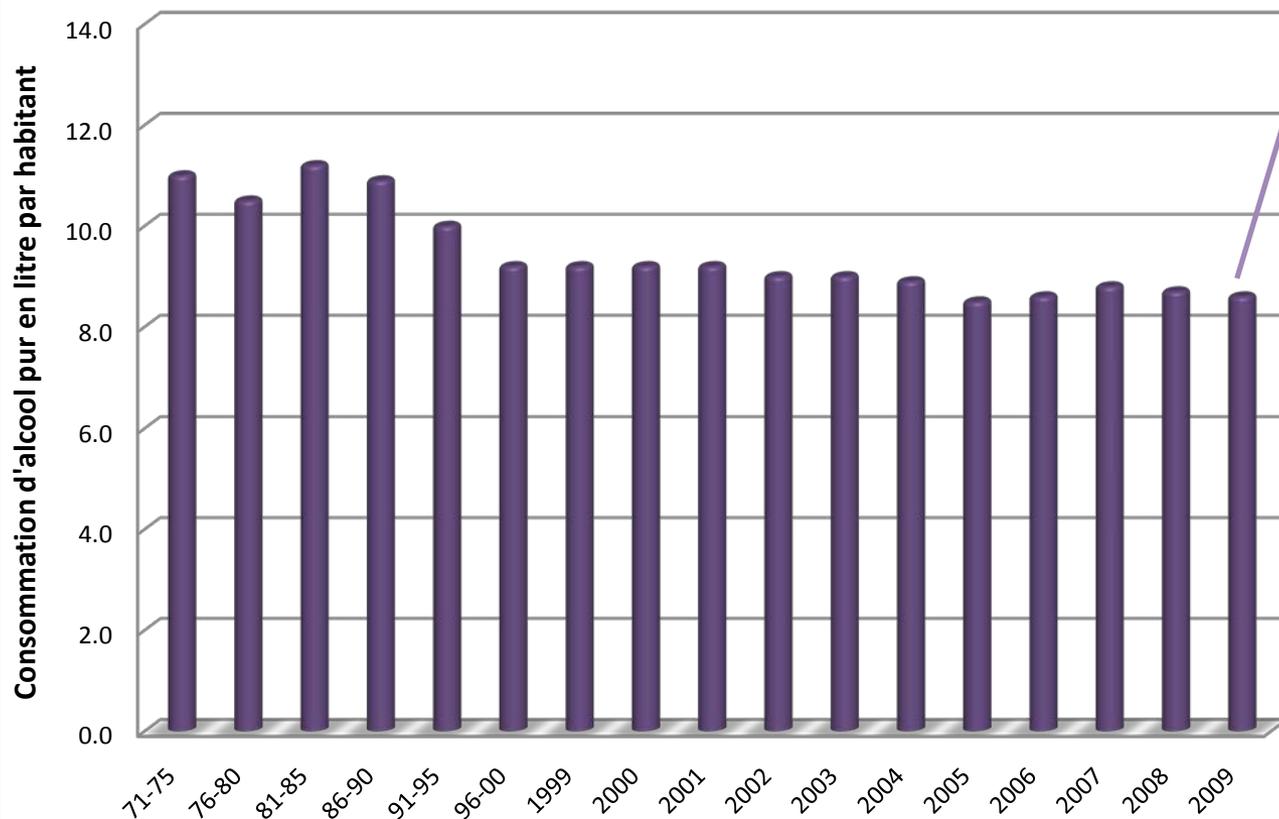
*Or, Noé, qui cultivait la terre, se mit à planter la vigne.
Puis, ayant bu du vin, il s'enivra ...*

Genèse 9:20-21

*Une personne sur deux dans le monde n'a jamais consommé d'alcool.
Lancet*



Consommation de boissons alcooliques par habitant en Suisse en litres, de 1971 à 2009



2009 - Suisse

8,6 l d'alcool pur/habitant:
34,2 l de vin (4,1 l)
56 l de bière (2,8 l)
3,6 l de spiritueux (1,6 l)
2 l de cidre (0,1 l)

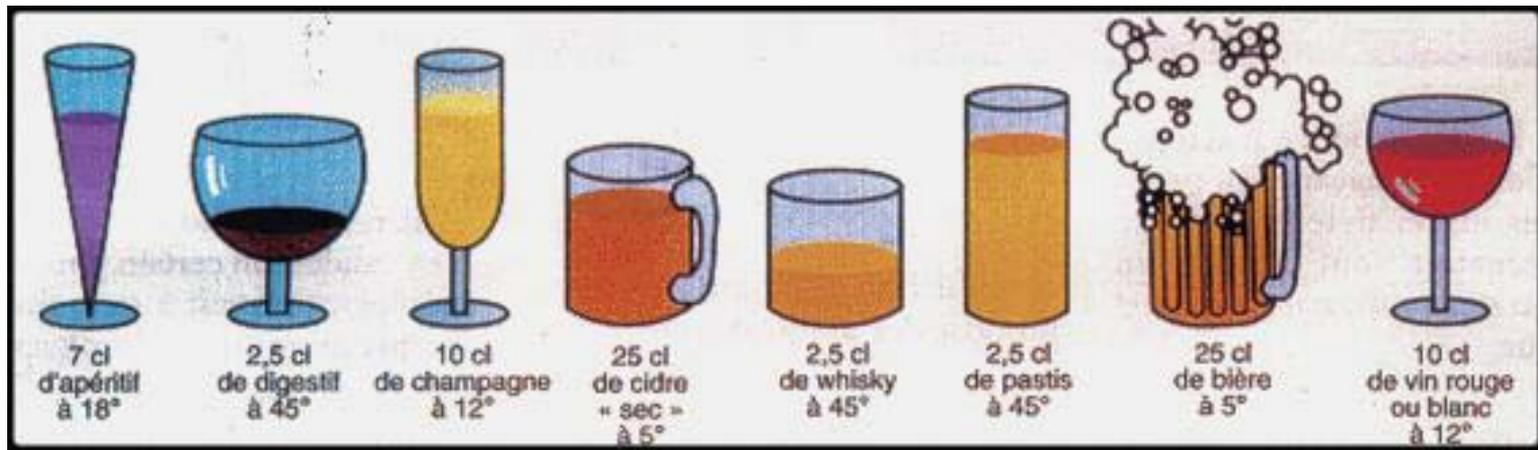
2009 – Monde

6,2 l d'alcool pur/ hab.,
ou 12 unités / semaines
1/25 décès (monde)
1/10 décès (Europe)

Source : Addiction info Suisse et Régie fédérale des alcools (RFA)

Repères de consommation

Un verre standard = 10 grammes d'alcool pur



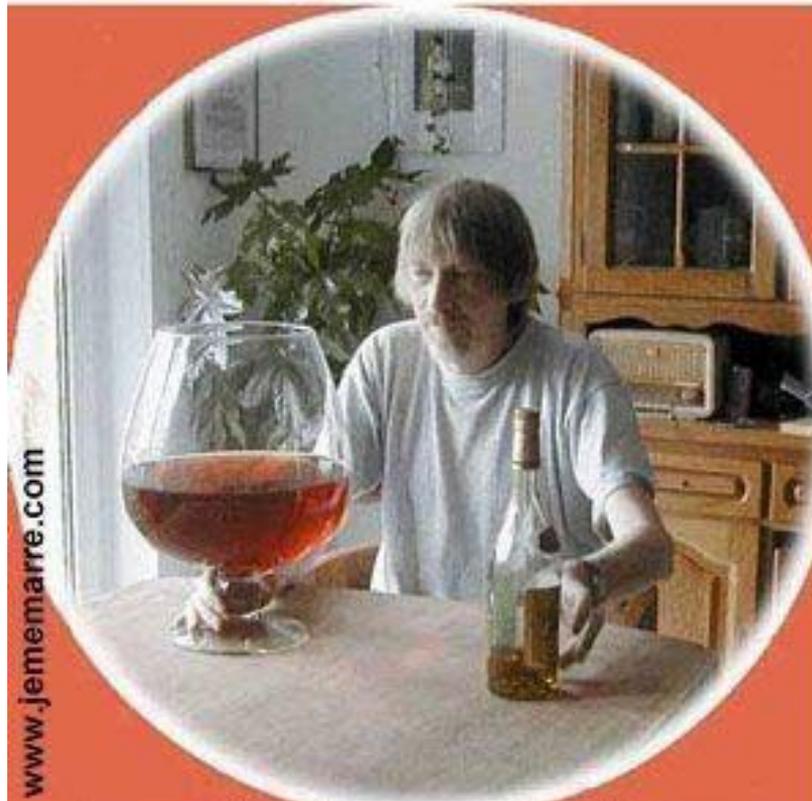
Exemples :

Trois cannettes de 33 cl de bière ordinaire = quatre verres standard.

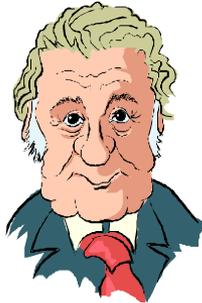
Une cannette de 50 cl de bière forte (8,6° ou 10°) = quatre verres standard.

Evaluation de la consommation d'alcool. Oui, mais combien ?

*Le docteur m'a dit "1 verre par jour".
Je crois que je peux y arriver...*



Seuils de risque ?



par jour

3

OMS

2

occasions

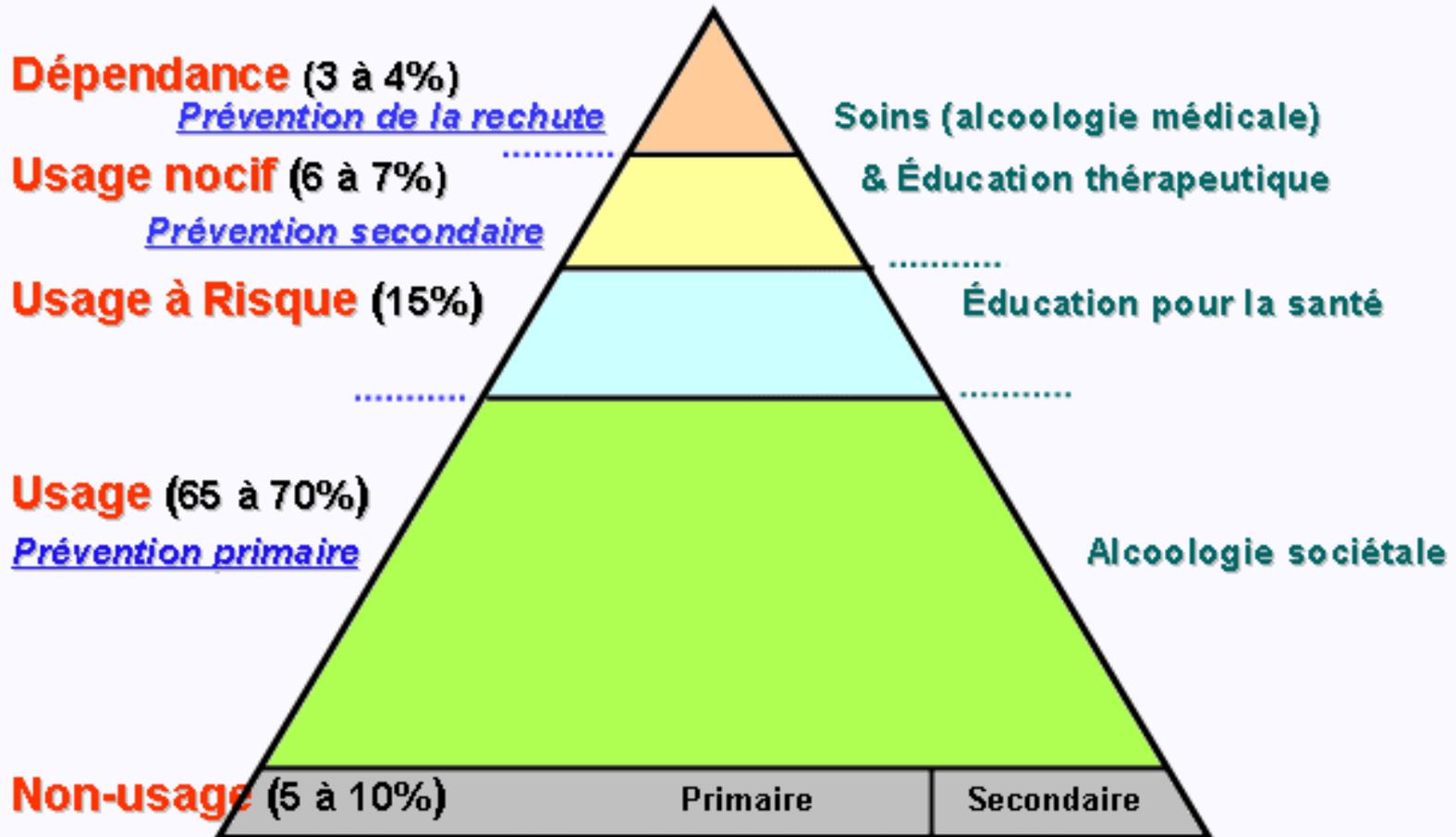
6



4

Ces seuils n'ont pas de valeur absolue car chacun réagit selon : son sexe, sa corpulence, son état physique et psychologique, ainsi que selon le contexte de la consommation.

Alcool : Pyramide du risque (Skinner)



D'après Skinner, Can Med Ass J 143 (1990) 1054-1059

L'identification primaire des consommateurs est parfois difficile

- déni**
- élimination relativement rapide de l'éthanol**

Solutions :

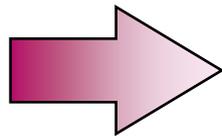
- anamnèse**
- questionnaires (AUDIT, CAGE, MAST, ...)**
- paramètres objectifs (marqueurs biologiques)**

Problèmes induits par la consommation d'alcool

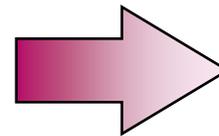


1. Intoxication aiguë

Exemple : conduite sous influence d'alcool



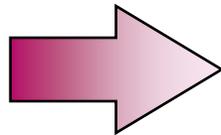
Ethanol ?



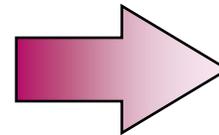
Ethanol : 2.80 g/kg
(2.66 – 2.94 g/kg)

2. Exposition chronique

Exemple : permis de conduire



Consommation abusive?



Marqueurs de l'abus l'alcool

Marqueurs biologiques de la consommation d'éthanol

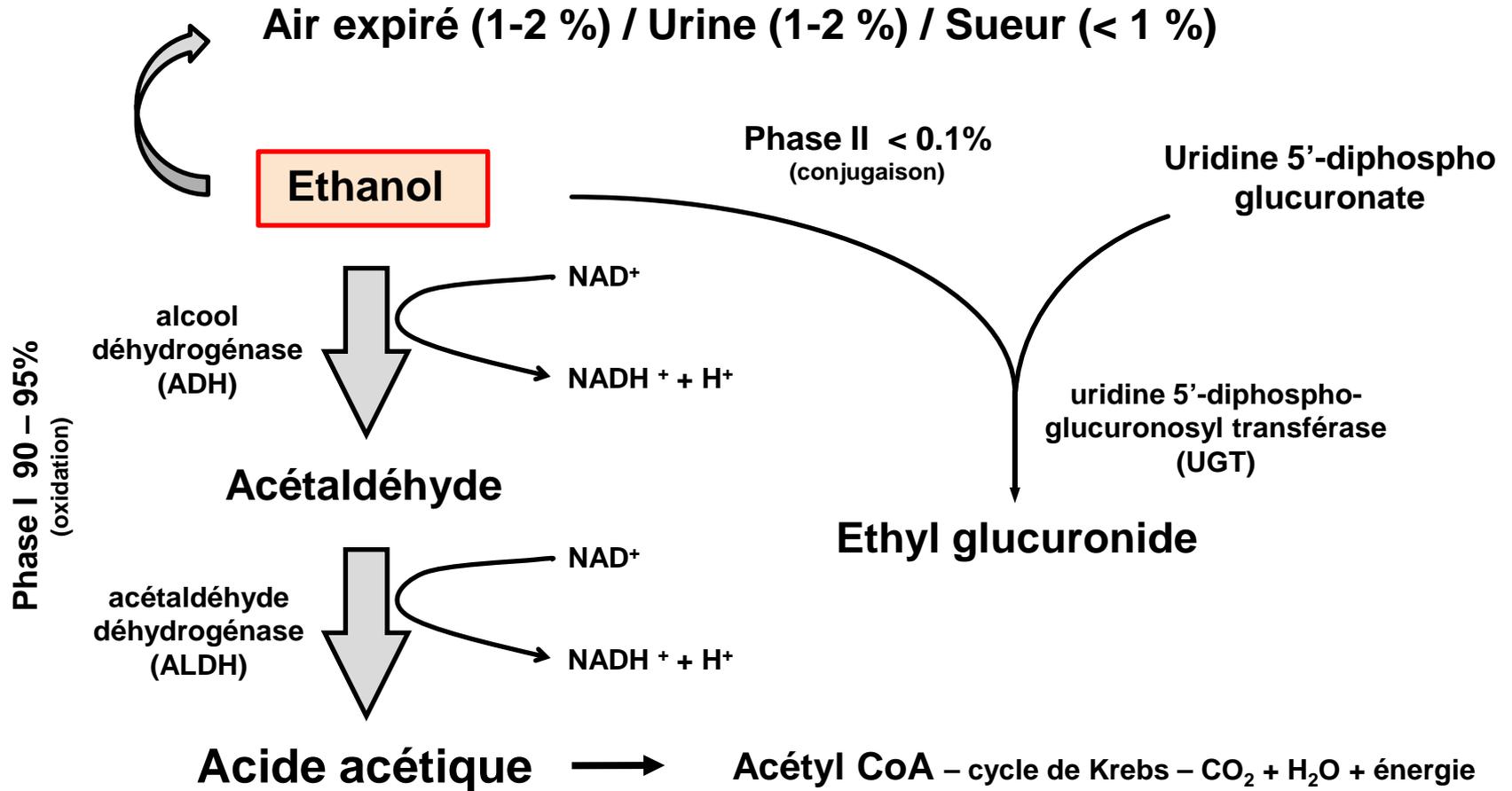
Les marqueurs directs

- Éthanol
- Congénères
- Éthyl glucuronide
- Éthyl sulfate
- Phosphatidyléthanol
- Ester d'acide gras
- Ethylcocaïne

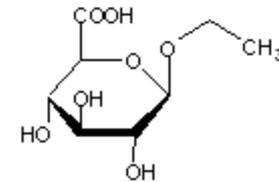
Les marqueurs indirects

- CDT
- ASAT (GOT)
- ALAT (GPT)
- gGT
- MCV (VGM)
- 5HTOL/5HIAA

Métabolisme de l'éthanol



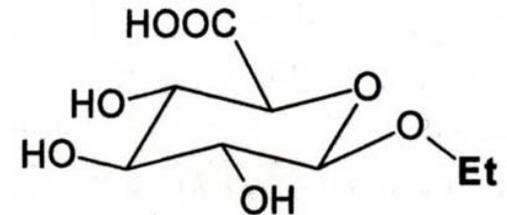
Ethylglucuronide



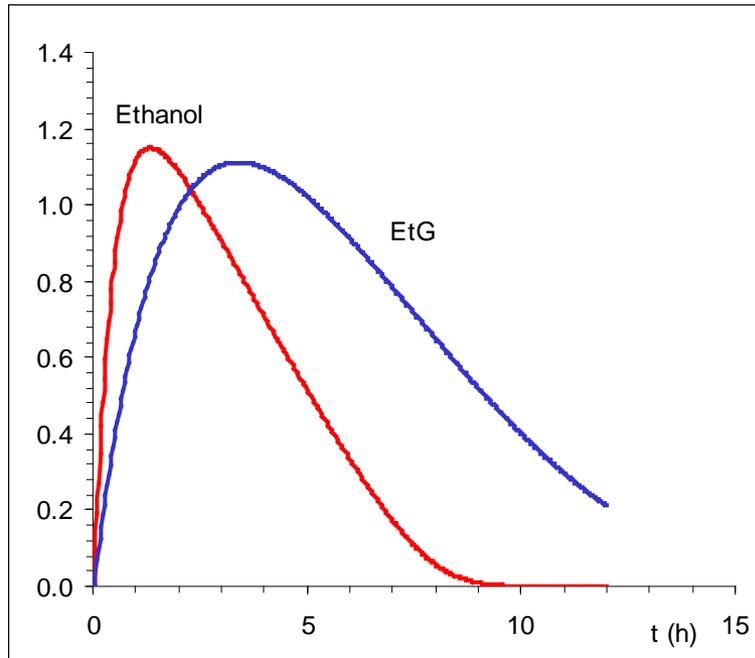
L'éthylglucuronide est une substance non volatile, soluble dans l'eau et stable.

A ce jour, sa présence dans l'organisme n'a été expliquée que par une consommation d'alcool éthylique.

A ce jour, aucune pathologie pouvant perturber ce paramètre n'a été mise en évidence.



Evolution de la concentration de l'éthanol et de l'éthylglucuronide après la consommation d'éthanol



Prise OH unique:

- OH détectable dans urine ad 24h
- EtG détectable dans urines ad 2-5 jours

Intérêt de l'éthylglucuronide :

- marqueur de la consommation récente d'éthanol
- marqueur de l'abus d'alcool

Bref historique

- 1901** Découverte du métabolisme secondaire (phase II) de l'éthanol par Neubauer
- 1952** Isolation de l'éthylglucuronide dans l'urine de lapins par Kamil et al.
- 1967** Isolation de l'éthylglucuronide dans l'urine humaine par Jaakonmaki et al., confirmé par Kozu en 1973
- 1995** Intérêt croissant de l'éthylglucuronide en toxicologie forensique (post-mortem et toxicologie comportementale)
- 2007** Mention de l'éthylglucuronide comme marqueur de l'abus l'alcool dans un arrêt d'un tribunal en Suisse, dans un contexte d'aptitude à conduire

L'éthylglucuronide dans l'urine

L'éthylglucuronide est détectable dans l'urine déjà après une faible consommation unique d'éthanol¹.

L'éthylglucuronide reste détectable dans l'urine plusieurs jours après une consommation d'éthanol, y compris après élimination de l'éthanol de l'urine².

La concentration d'éthylglucuronide dans l'urine peut être diminuée suite à une consommation importante de liquide. Le rapport EtG/créatinine permet de corriger l'effet de la dilution².

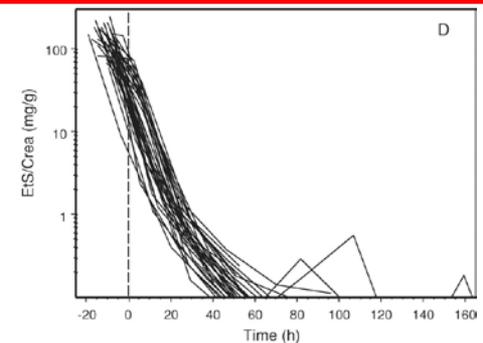
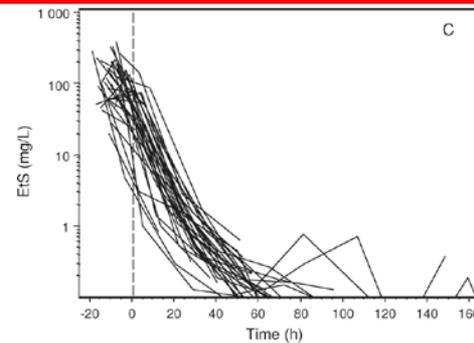
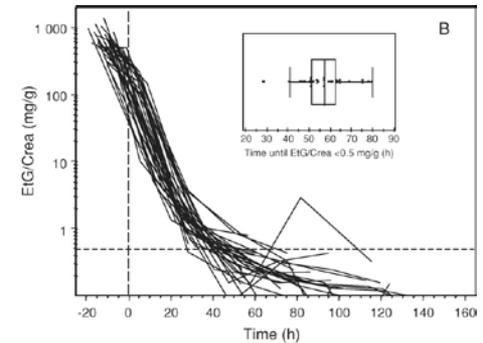
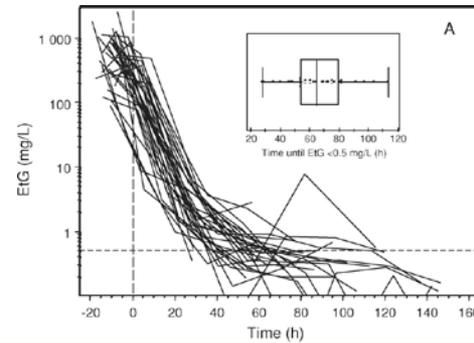
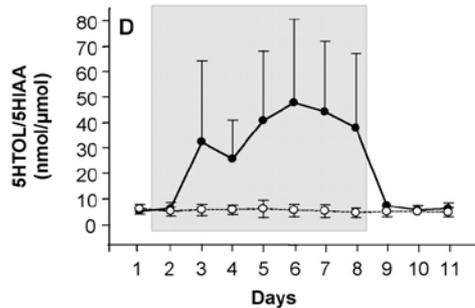
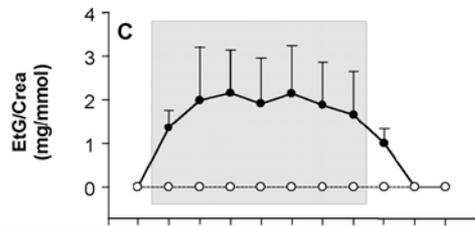
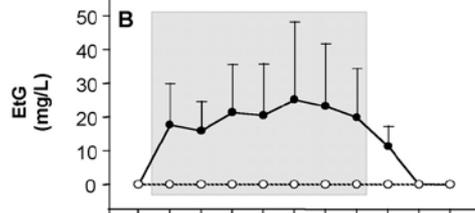
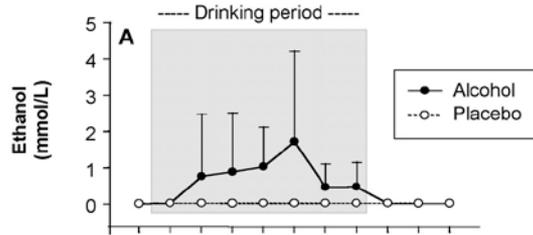
La présence d'éthanol dans l'urine est associée à une consommation récente d'alcool (< 1 jour). La présence d'éthylglucuronide dans l'urine est associée à une consommation d'éthanol lors des 5 jours avant le prélèvement³.

¹ Wurst et al., Alcohol 20 (2000) 111-116

² Dahl et al., Journal of Analytical Toxicology 26 (2002) 201-204

³ Wurst et al., Alcoholism : Clinical and Experimental Research 27 (2003) 471-476

Excrétion urinaire de l'éthylglucuronide



Sarkola T et al. Alcohol and Alcoholism 2003;38:347-351

Helander A et al. Alcohol and Alcoholism 2009;44:55-61

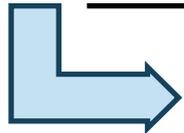
Matrices biologiques

Matrice

Dépistage de l'éthylglucuronide

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Sang/sérum	< 1 jour, mais qq heures de plus que l'éthanol
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Urine	jusqu'à 2 – 5 jours après la consommation d'éthanol
<input type="checkbox"/>		Cheveux	période allant de qq jours à qq mois

<input type="checkbox"/>		Autres matrices ¹	LCR, foie, graisse, cerveau
--------------------------	--	------------------------------	-----------------------------



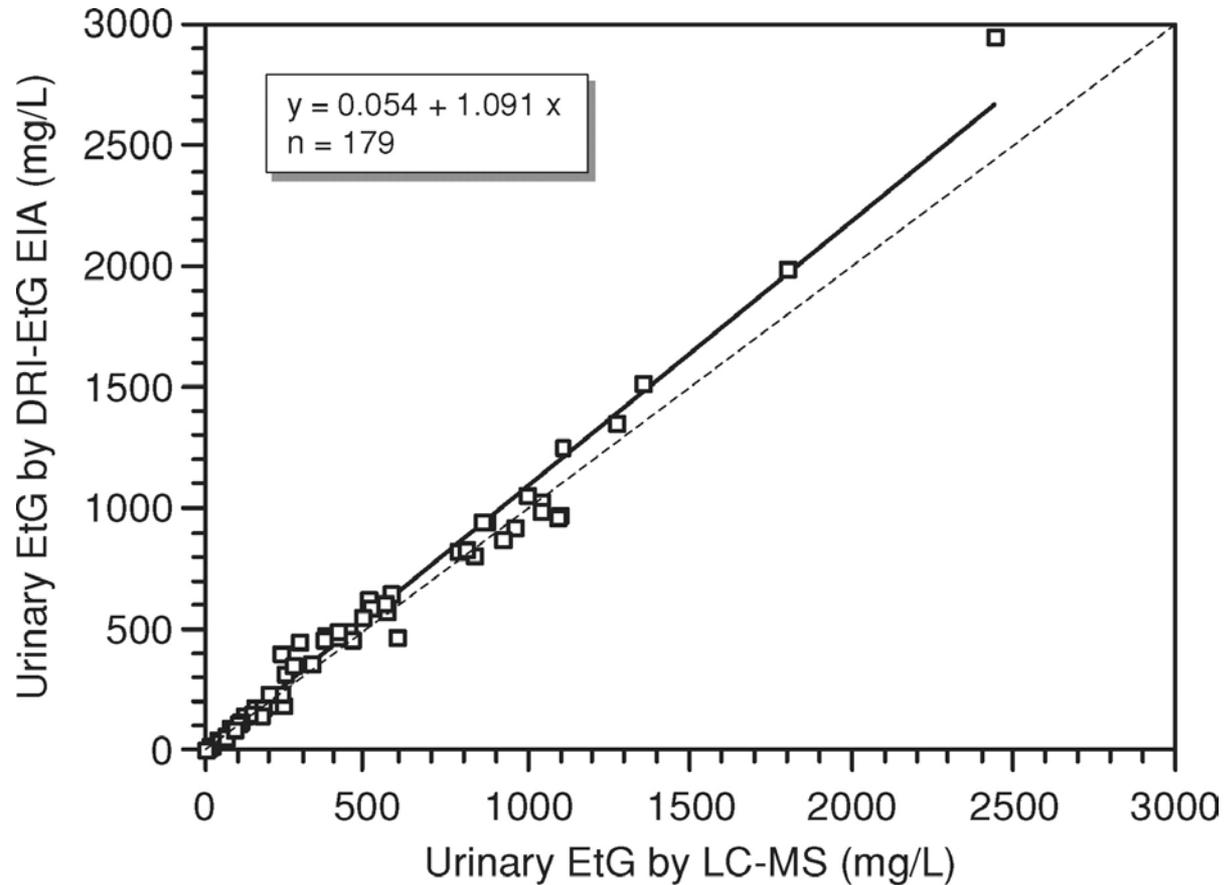
Test de dépistage (EIA, Microgenics DRI® EtG; BAT, Randox)



Chromatographie (GC; HPLC) couplée à la spectrométrie de masse simple (MS) ou en tandem (MS/MS)

¹ Wurst et al., Alcohol & Alcoholism 34 (1999) 262-263

Ethylglucuronide dans l'urine Immunotest vs LC-MS



Helander A et al. Alcohol and Alcoholism 2009;44:55-61

Accident du 24.10.2001 au tunnel du St-Gothard



Le mercredi 24 octobre 2001, vers 09h45, un accident entre deux camions est survenu à environ 1 km de l'entrée sud du tunnel routier du St-Gothard.

Après l'intervention des pompiers, 11 corps seront retirés du tunnel.

Au total, 23 véhicules, dont 13 camions, ont été retrouvés dans le tunnel.

Résultats (conducteur responsable, altération cadavérique)

Sang :	éthanol (2.40 g/kg), HbCO (57%)
Muscle squelettique :	éthanol (2.67 g/kg)
Urine :	éthanol (3.21 g/kg)
Contenu gastrique :	éthanol (2.61 g/kg)

Ethanol dans des corps putréfiés

- ☞ Mayes et al., *Toxicological findings in the USS Iowa disaster*, J. Forensic Sci., 37 (1992) 1352 - 1357

47 victimes - éthanol : 0.1 - 1.9 g/l (n = 23)

- ☞ de Lima and Midio, *Origin of blood ethanol in decomposed bodies*, Forensic Sci. Int., 106 (1999) 157 - 162

15 cas (corps putréfiés) - éthanol : 0.08 - 0.76 g/l

- ☞ Gilliland and Bost, *Alcohol in decomposed bodies : Postmortem synthesis and distribution*, J. Forensic Sci., 38 (1993) 1266 - 1274

286 cas - production endogène d'éthanol (n=55) => BAC jusqu'à 1.5 g/kg

Concentration urinaire d'éthanol

Suite à un décès, la concentration urinaire d'éthanol (UAC) est le reflet de la concentration d'éthanol dans le sang (BAC) qui a prévalu lors de la période après la dernière miction. Une étude a montré que le rapport UAC / BAC pouvait varier de 0.21 à 2.66 ⁽¹⁾.

Règles empiriques : si UAC / BAC < 1 phase de résorption
 si UAC / BAC > 1.3 phase d'élimination

Victime n°10 : UAC / BAC = 3.21 / 2.40 = 1.33 phase d'élimination

Urine : 70 mg éthyl glucuronide / l
14 mg créatinine / dl

(1) Majchrowicz and Mendelson, Blood methanol concentrations during experimentally induced ethanol intoxication in alcoholics. J Pharmacol Exp Ther 179 (1971) 293

Intérêt de l'éthylglucuronide en toxicologie forensique

La mort de l'étudiante chinoise bientôt élucidée.

Un ancien sommelier sera jugé demain pour homicide par négligence. En 2005, sur une route de Blonay, il avait renversé de nuit une étudiante chinoise qui avait perdu la vie.

L'histoire avait provoqué un grand émoi dans la région. A tel point que des interventions dans les conseils communaux de Blonay et de Saint-Légier, ou encore des pétitions, demandaient à ce que l'on sécurise la route de Châtel-Saint-Denis, étroite, sans trottoir et très faiblement éclairée. Le 9 juin 2005, il y a donc déjà plus de deux ans et demi (!), une jeune femme de 23 ans y perdait la vie.

Alors qu'elle rentrait chez elle dans une chambre qu'elle louait depuis un an, cette jeune violoniste chinoise, étudiante en classe de perfectionnement à l'Académie internationale de musique Menuhin, était heurtée par le conducteur d'une voiture. Ce dernier poursuivait sa route, alors que la victime était retrouvée morte quelques heures plus tard.

Dès le corps découvert, d'importants moyens étaient mis en oeuvre pour retrouver le chauffard. Unissant leurs efforts, la police cantonale et les polices municipales de l'arc lémanique et du Chablais vaudois identifiaient le véhicule incriminé dans la matinée qui suivit le drame. Les traces retrouvées sur l'automobile ne laissaient aucun doute quant à son implication dans l'accident.

Perte de connaissance évoquée

Interpellé, le suspect est un sommelier âgé de 63 ans à l'époque des faits. Il rentrait chez lui à Blonay après son service dans un café de la commune. Dès le début de l'enquête, l'homme a déclaré ne plus se souvenir de rien. Atteint d'un diabète profond, il aurait pu avoir perdu connaissance suite à un coma diabétique. Ce qui lui était déjà arrivé par le passé, selon des proches.

Des examens toxicologiques très poussés ont été menés par l'Institut universitaire de médecine légale (IUML) à Lausanne. Le délai de plusieurs heures entre l'accident et l'arrestation de l'automobiliste a semble-t-il compliqué le travail des scientifiques.

Quoi qu'il en soit, le juge chargé de l'instruction le renvoyait devant les tribunaux avec l'homicide par négligence pour chef d'accusation. L'affaire sera jugée demain matin dès 9 h à Vevey.

CHRISTOPHE BOILLAT | 14 Janvier 2008

24heures

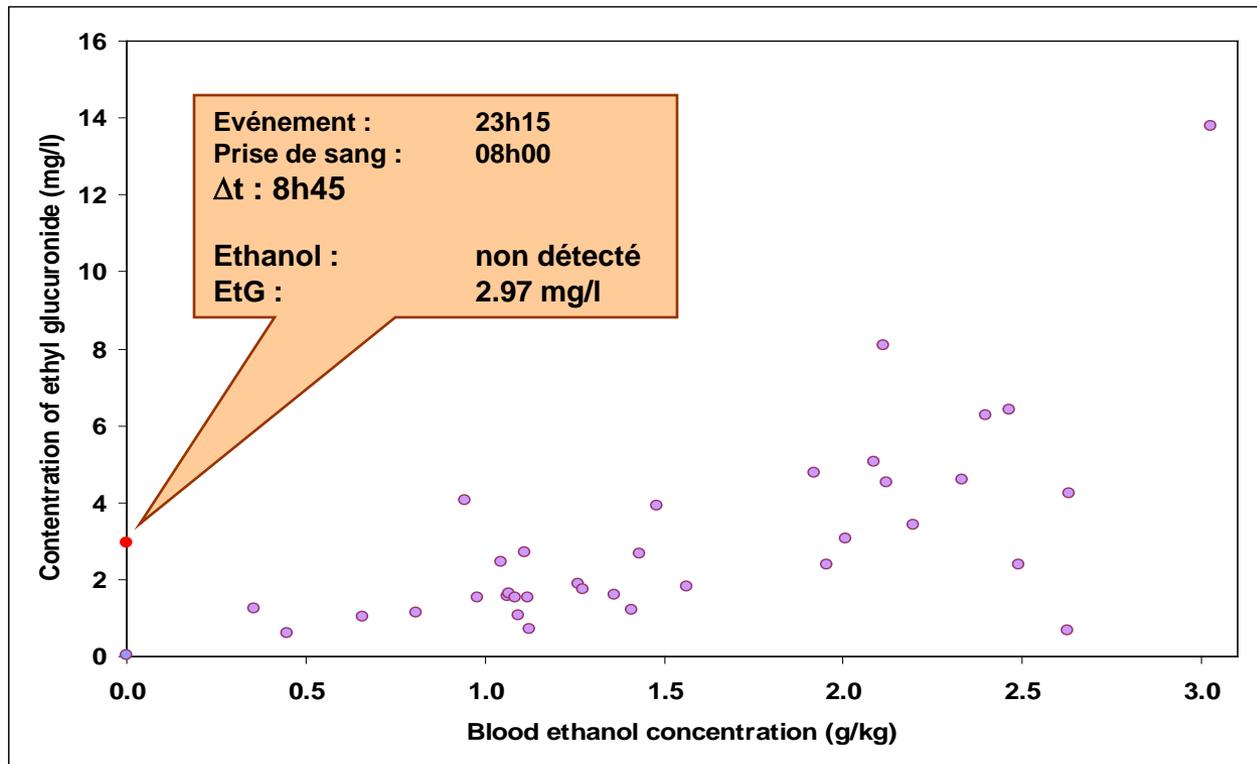
» Délits de fuite ou omissions en 2006

1183 C'est le nombre total de délits de fuite ou omissions de la déclaration obligatoire référencés par la police cantonale vaudoise en 2006 (les chiffres 2007 seront communiqués en février). A noter que le nombre de ces délits et omissions était supérieur en 2005: 1212.



Détermination de l'éthylglucuronide

Concentration d'éthanol et d'éthylglucuronide dans le sang de conducteurs suspectés de conduire sous influence d'éthanol



(n = 37)

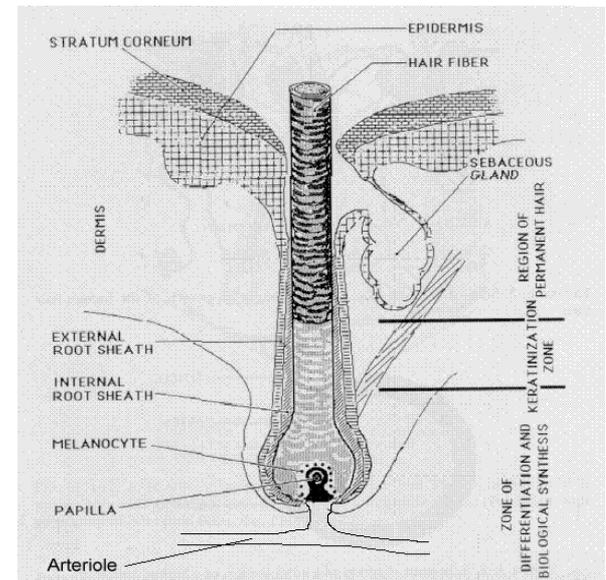
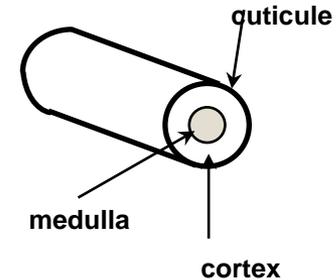
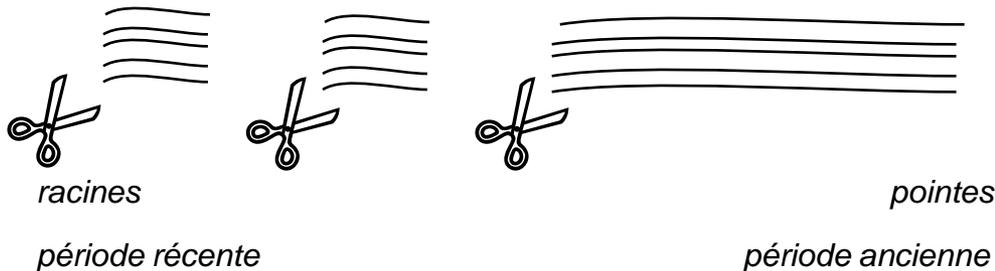
Les cheveux

Matrice permettant de remonter de plusieurs semaines, voire mois dans le passé toxicologique du patient.

Les cheveux sont coupés au ras du scalp.

Les échantillons peuvent être segmentés.

En cas d'absence de cheveux, les poils axillaires ou pubiens peuvent être utilisés.



Adapted from Robbins, C. R. Chemical and Physical Behavior of Human Hair. 3rd ed. Springer-Verlag, New York (1994).

Détermination de la concentration d'EtG dans les cheveux :

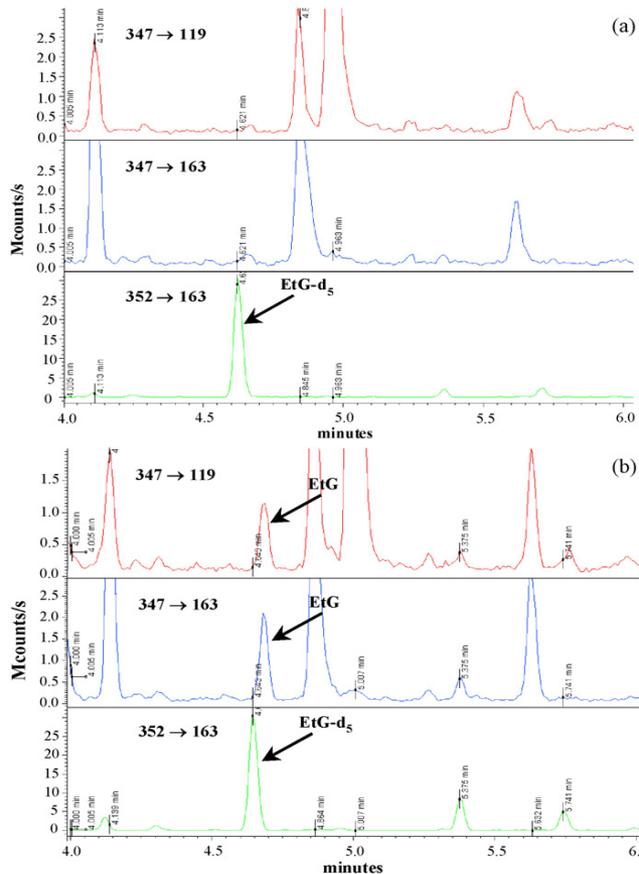
1. Intérêt en toxicologie forensique

Dosage effectué par GC-NCI-MS	cas positifs (LOQ : 65 pg/mg)	valeur la plus faible (pg / mg)	valeur la plus élevée (pg / mg)
Personnes dépendantes à l'alcool (n=14)	13	347	8710
Buveurs d'alcool normaux (sans abus) (n=9)	2	139	172
Personnes abstinentes (0 verre) (n=4)	0	-	-

Messerli U., Travail de diplôme de pharmacie effectué au CURML, EPGL, 2005

Détermination de la concentration d'EtG dans les cheveux :

2. Développement d'une méthode



Instrument : GC-NCI-MS/MS

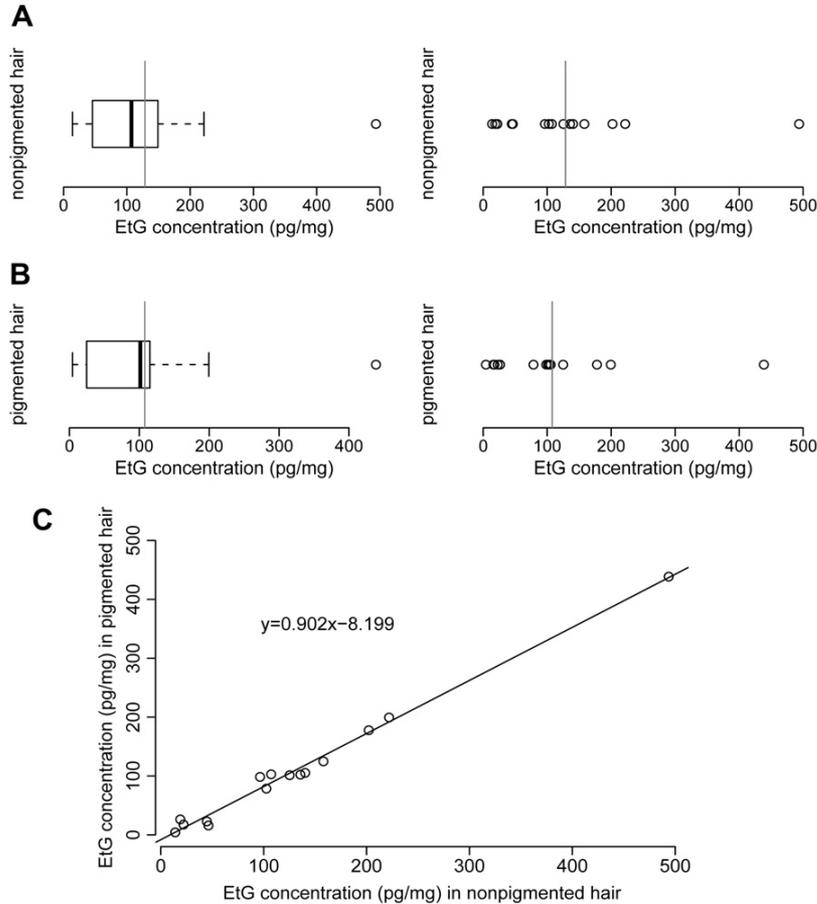
Linéarité : 8 – 260 pg/mg

LOD : 3.0 pg/mg

LLOQ : 8.4 pg/mg

Détermination de la concentration d'EtG dans les cheveux :

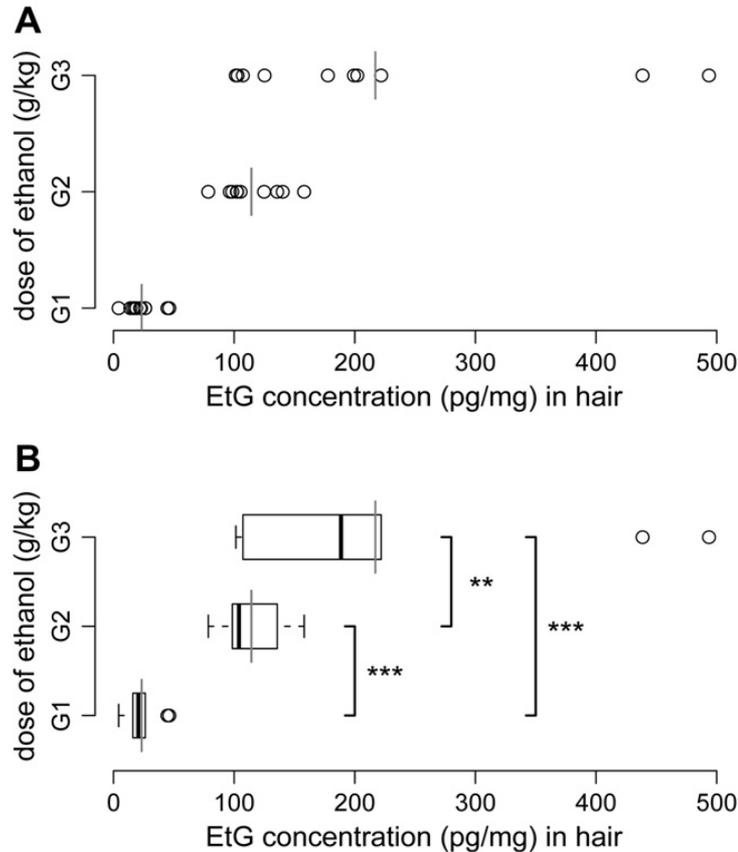
3. Expérimentation animale – Influence de la couleur ?



Pas d'influence de la couleur des poils sur l'incorporation de l'éthylglucuronide dans cette matrice.

Détermination de la concentration d'EtG dans les cheveux :

4. Expérimentation animale – Relation dose-réponse ?



**Relation de proportionnalité
entre la dose administrée et la
concentration d'éthylglucuronide
dans les poils.**

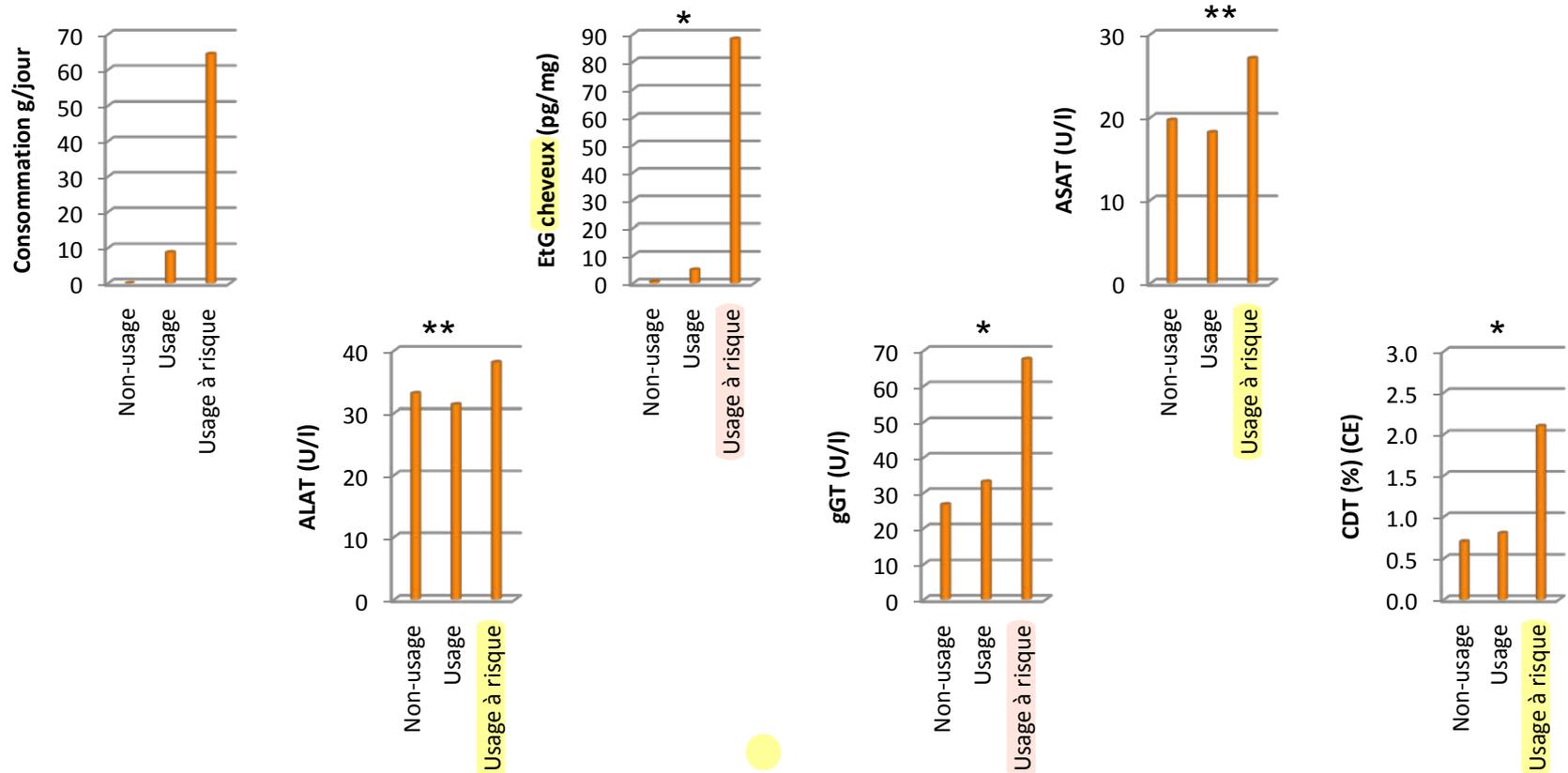
Détermination de la concentration d'EtG dans les cheveux :

5. Etude chez l'Homme



Détermination de la concentration d'EtG dans les cheveux :

5. Etude chez l'Homme



* p-value < 0.001

** p-value < 0.05

Kharbouche, Travail de thèse, UNIL (2010)

Pièges pour l'interprétation des résultats de la détermination de l'éthylglucuronide

- Le concentration urinaire d'éthylglucuronide est sensible à l'hydrolyse bactérienne (en particulier en présence d'*E. coli*)¹
- La consommation d'hydrate de chloral peut induire une réaction croisée avec les tests immunologiques de dépistage²
- Un produit utilisé comme fortifiant des cheveux contient de l'éthylglucuronide, qui peut être incorporé dans les cheveux en cas d'utilisation prolongée³

¹ Helander et al, Clinical chemistry 53 (2007) 1855-1857

² Arndt et al, Forensic Science International 184 (2009) E27-E29

³ Sporkert et al, SOHT meeting 2010

A retenir

- Il existe de nombreux marqueurs directs ou indirects de la consommation et de l'abus d'alcool pouvant être utilisés en fonction de la question clinique ou forensique
- L'éthylglucuronide est un métabolite mineur de l'éthanol, qui peut être mesuré dans le sang et l'urine, plus longtemps que l'éthanol, ainsi que dans les cheveux, voire d'autres matrices biologiques
- La mesure de l'éthylglucuronide dans le sang ou l'urine est indiquée pour la mise en évidence d'une consommation récente d'éthanol (de 1 jour pour le sang à 2-5 jours pour l'urine)
- La mesure de l'éthylglucuronide dans les cheveux est indiquée pour la mise en évidence d'une consommation abusive d'éthanol pendant plusieurs mois



Merci de votre attention

Remerciements à l'équipe de l'UTCF :

Angélique Chevalley, Magali Dovat Sabatella, Marie Fabritius, Cinzia Forney, Christian Giroud, Annette Jordan, Hicham Kharbouche, Catherine Meylan Bohnenblust, Joëlle Müller, Sara Petter, Filomena Rocha Cunha, Sophie Seydoux, Frank Sporkert, Joël Stauber, Vincent Varlet, Julien Déglon, Melek Donmez-Altun, Françoise Iatropoulos Jollien, Estelle Lauer, Olivier Plaut, Christian Staub, Aurélien Thomas, François Versace, Max Villa, Christèle Widmer, Federica Zbinden.