

Dépistage biologique de l'alcoolisme : quelles nouveautés?

Pr Jean-Pierre Goullé,

Université de Rouen, Faculté de Médecine et de Pharmacie,

Laboratoire de Toxicologie, UNIROUEN, UR ABTE EA 4651

Alcoolisme, un modèle d'addiction

55^{èmes} Journées Médicales Havraises

Le Havre, les 25 et 26 janvier 2019



1987 : GGT un nouveau marqueur biologique

-
32 ans déjà...

Gamma-glutamyl-transférase et syndrome d'alcoolisme foetal

P. LE ROUX, B. LE LUYER, J.P.
GOULLÉ, J.P. CHABROLLE - La Presse
Médicale, 1987, 16, 444-445

Bulletin de la Société Française
d'alcoologie, 1987, 1, 48-49

GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFÉRASE ET SYNDROME D'ALCOOLISME FOETAL

B. LE LUYER*, P. LE ROUX*, J.P. GOULLE**, J.P. CHABROLLE*

INTRODUCTION

Le dosage de l'activité de la gamma-glutamyl-transférase (γ .G.T.) est devenu une épreuve de routine dans le dépistage de l'alcoolisme chronique chez l'adulte et le contrôle du sevrage (10).

La distribution tissulaire et la structure chimique de la γ .G.T. varient chez le fœtus et chez l'adulte (12).

Nous rapportons les résultats de la mesure de ce marqueur biologique chez 10 nouveau-nés de mère alcoolique, présentant un syndrome d'alcoolisme foetal (SFA) (2, 7). Ce dosage permettrait d'étayer le diagnostic clinique.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

L'étude porte sur 10 nouveau-nés de mère alcoolique hospitalisés dans le service de Néonatalogie (groupe SFA).

Il s'agit de 7 prématurés (de 33 à 37 semaines) et de 3 enfants nés entre 38 et 40 semaines.

Chez les mères l'intoxication était prouvée dans 4 cas par des valeurs élevées de la γ .G.T., dans 2 cas par une alcoolémie maternelle per partum positive et fortement suspectée par l'environnement dans 4 cas.

L'intoxication était principalement le fait d'une consommation excessive de bière.

Chez ces nouveau-nés on note :

- **une hypotrophie** : retard portant sur le poids, la taille et le périmètre crânien (7 fois sur 10 le poids est inférieur au 3^e percentile des courbes de Leroy Lefort).

*Service de Néonatalogie - Centre Hospitalier du Havre
55 bis, rue Gustave Flaubert - 76600 LE HAVRE

**Laboratoire de biochimie - Centre Hospitalier du Havre

Tirés-à-part : B. Le Luyer à l'adresse ci-dessus

- **Une dysmorphie crânio-faciale** caractéristique (microcéphalie, rétrécissement des fentes palpébrales, allongement du philtrum avec effacement des piliers, finesse et convexité de la lèvre supérieure, microgénie, écrasement de la racine du nez avec retoussement de l'extrémité).

- **Les malformations associées** :

- . cardiaque : communication inter-ventriculaire (2 cas) ; persistance du canal artériel (un cas) (le diagnostic a été confirmé par l'échocardiographie)
- . rénale : rein en fer à cheval (un cas) (vérification anatomique)
- . cryptorchidie (un cas)
- . agénésie du corps calleux (un cas)
- . thorax en carène (2 cas).

- Dans les premiers jours de vie, ces enfants ont présenté des troubles du comportement évoquant un syndrome de sevrage.

Un de nos proposants est né d'une mère épileptique traitée par phénobarbital (10 cp par jour) durant toute la grossesse.

Ces 10 enfants constituent le groupe I.

Nous comparons les valeurs obtenues des γ .G.T. avec celles d'un groupe (II) de 21 enfants eutrophiques (terme : 32 à 42 semaines dont 11 prématurés (\leq 37 semaines) (IIa) et 10 à terme (IIa)) ; et celles d'un groupe (III) fait de 10 hypotrophiés (poids \leq 10^e percentile) (terme : 34 à 42 semaines).

La cinétique des γ .G.T. de ces enfants de mère alcoolique est résumée sur la figure 1.

Le sang est prélevé au talon.

L'activité des γ .G.T. est mesurée par la méthode de Szaz à 35°C ; les résultats sont donnés en Unités (U) par litre.

RÉSULTATS

Les résultats sont regroupés dans le tableau I.

1987 : GGT un nouveau marqueur biologique - 32 ans déjà...

CONCLUSION

L'activité de la γ .G.T. est significativement élevée chez le nouveau-né de mère alcoolique. L'éthanol par son effet inducteur enzymatique semble le principal responsable.

La mesure de la γ .G.T., notamment dans le 4^e groupe selon la classification de Debaenne (4) : «enfants de mère alcoolique suspects à la naissance et dysmorphie», permet d'étayer un diagnostic avant tout clinique.

L'option zéro reste la meilleure manière de voir régresser cette embryofœtopathie (9).

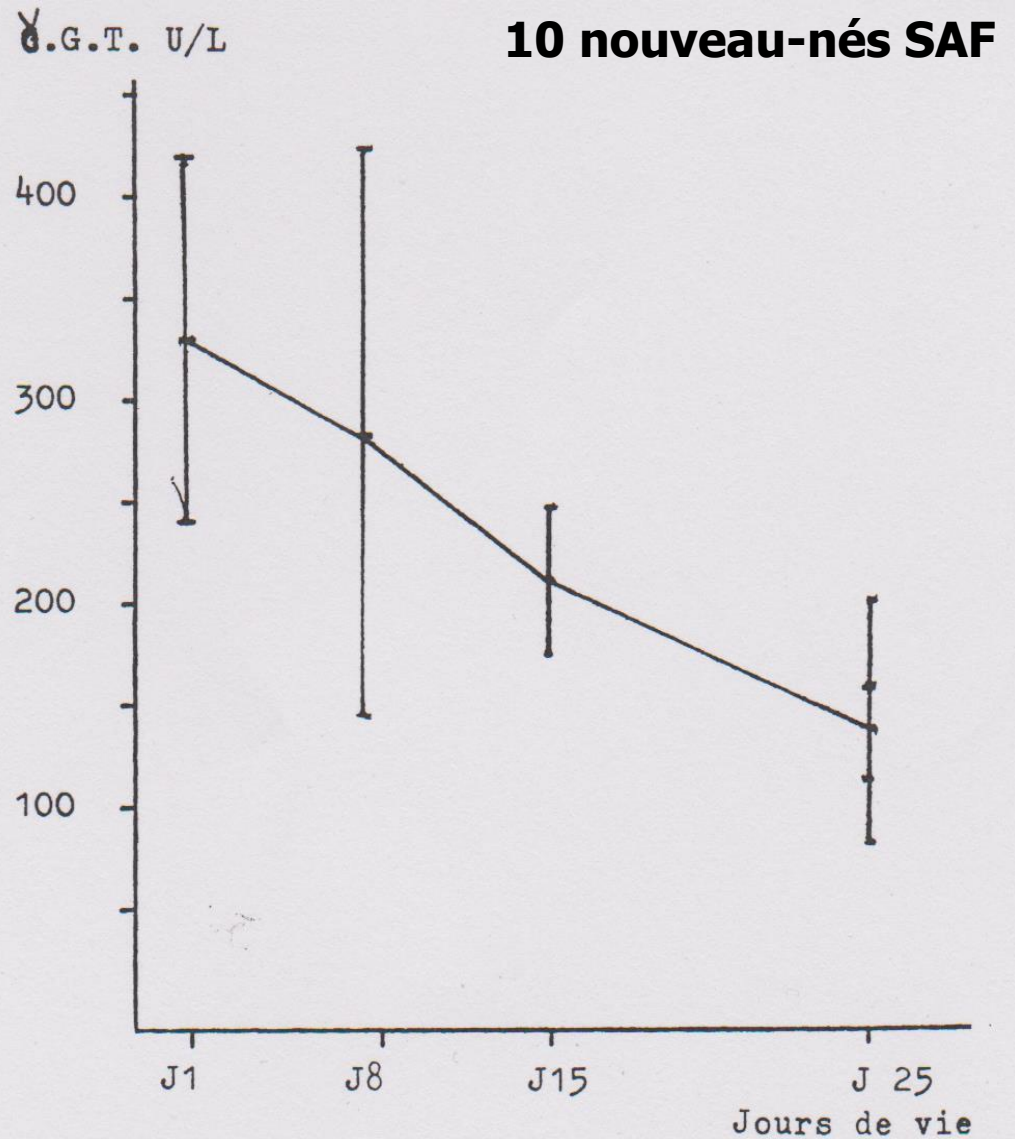


Fig. 1: Cinétique des γ .G.T. (Gamma Glutamyl Transférase) chez les enfants de mère alcoolique.

Rappel métabolique : élimination de l'éthanol

1. Voies directes : 10-15%

2. Voies métaboliques oxydatives : 85 – 90%

3. Voies métaboliques non oxydatives : <<1%

Rappel métabolique : élimination de l'éthanol

1. Voies directes d'élimination de l'éthanol : 10-15%

- **Urines, sueur, salive, lait, larmes, air expiré**
- **A l'équilibre [urines] / [sang] = $1,4 \pm 0,2$**
- **Rapport [air expiré] / [sang] = $1/2100$**

 **Dosage d'alcool dans les urines, l'air expiré...**

Rappel métabolique : élimination de l'éthanol

2. Voies métaboliques oxydatives: 85 – 90%

Principalement hépatiques +++ (90-95%)

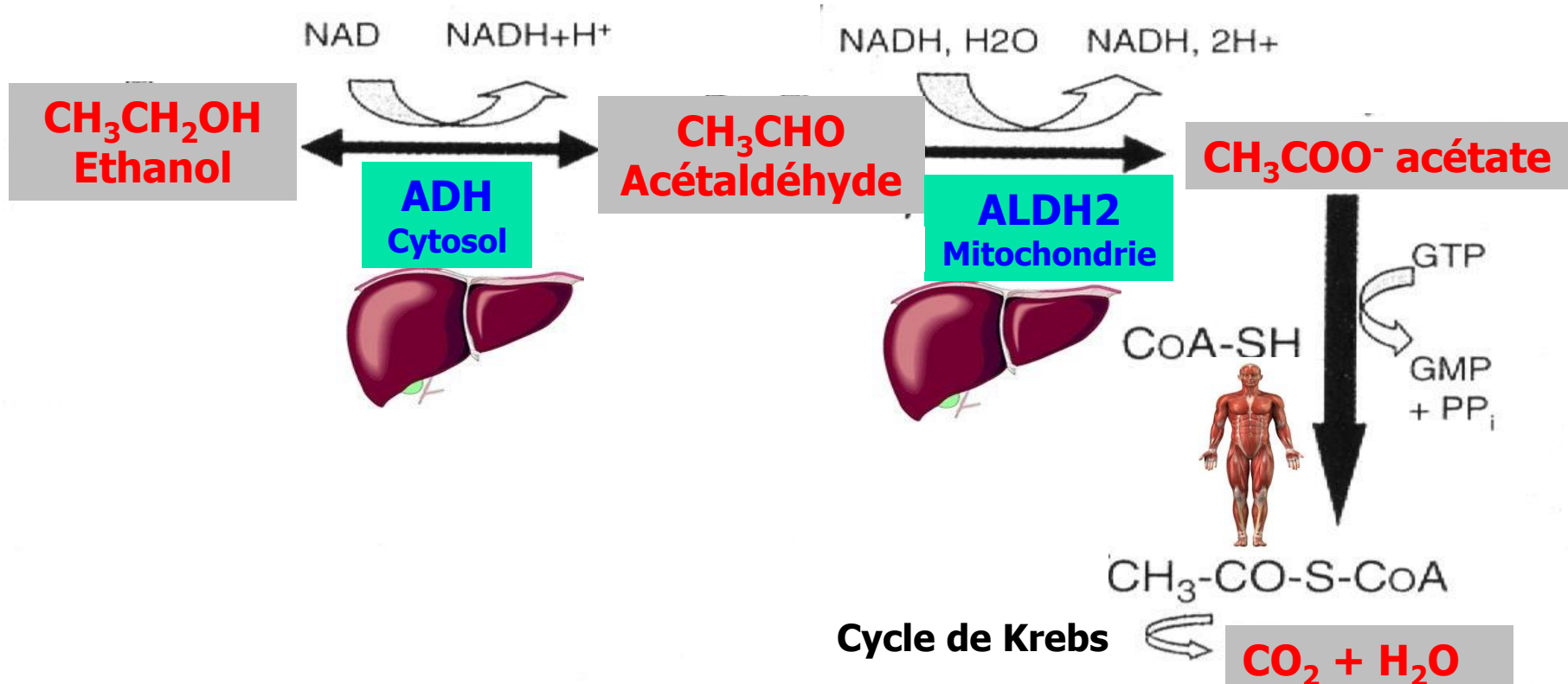
Capacités foétales réduites +++

Estomac, intestin, rein (5-10%)



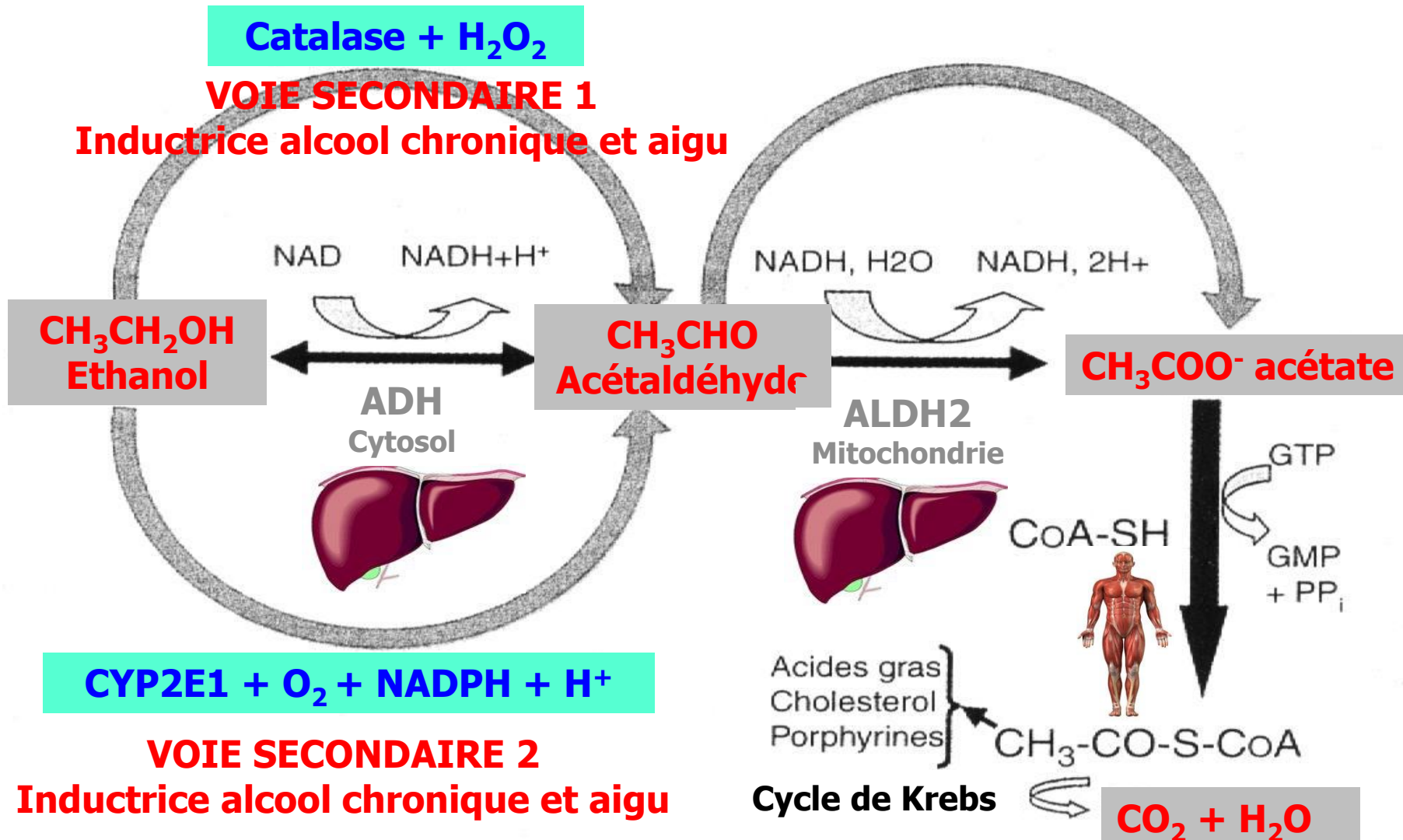
2. Voies métaboliques oxydatives 85-90%

2.1 Voie principale : essentiellement hépatique



2. Voies métaboliques oxydatives 85-90%

2.2. Voies secondaires adaptatives (alc. chronique et aigu)



2. Voies métaboliques oxydatives 85-90% : bilan

SATURABLES dès que l'alcoolémie atteint 0,10 g/L

Vitesse d'élimin. de l'éthanol (Sg) en g/L/h :

Non buveurs : 0,15-0,20 g/L/h

Buveurs : 0,25-0,30 g/L/h

Alcooliques : > 0,30 g/L/h

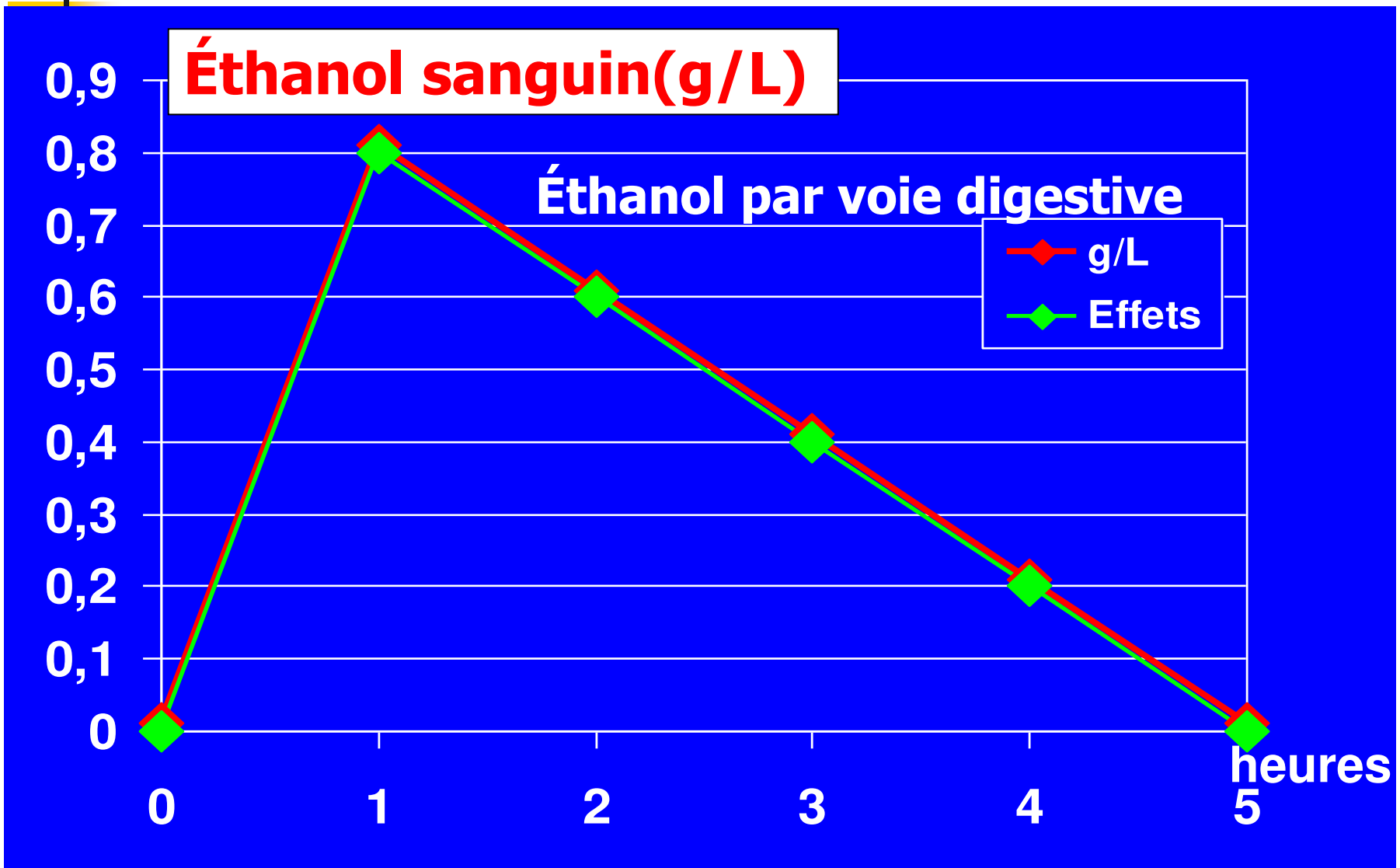
Estimation de la quantité Q d'alcool consommée

$Q = A \text{ (g/L)} \times p \text{ (kg)} \times Vd = 0,20 \times 75 \times 0,68 = \underline{\underline{10 \text{ g} = Q}}$ soit 1 unité

Estimation d'une alcoolémie A à 0,20 g/L, 5 h avant le prélèvement (Ar) :

$Ar = A \text{ (g/L)} + \text{bêta (g/L/h)} \times t \text{ (h)} = 0,20 + 0,16 \times 5 = \underline{\underline{1,0 \text{ g/L} = Ar}}$

Rappel métabolique, bilan : élimination de l'éthanol rapide par ces trois voies



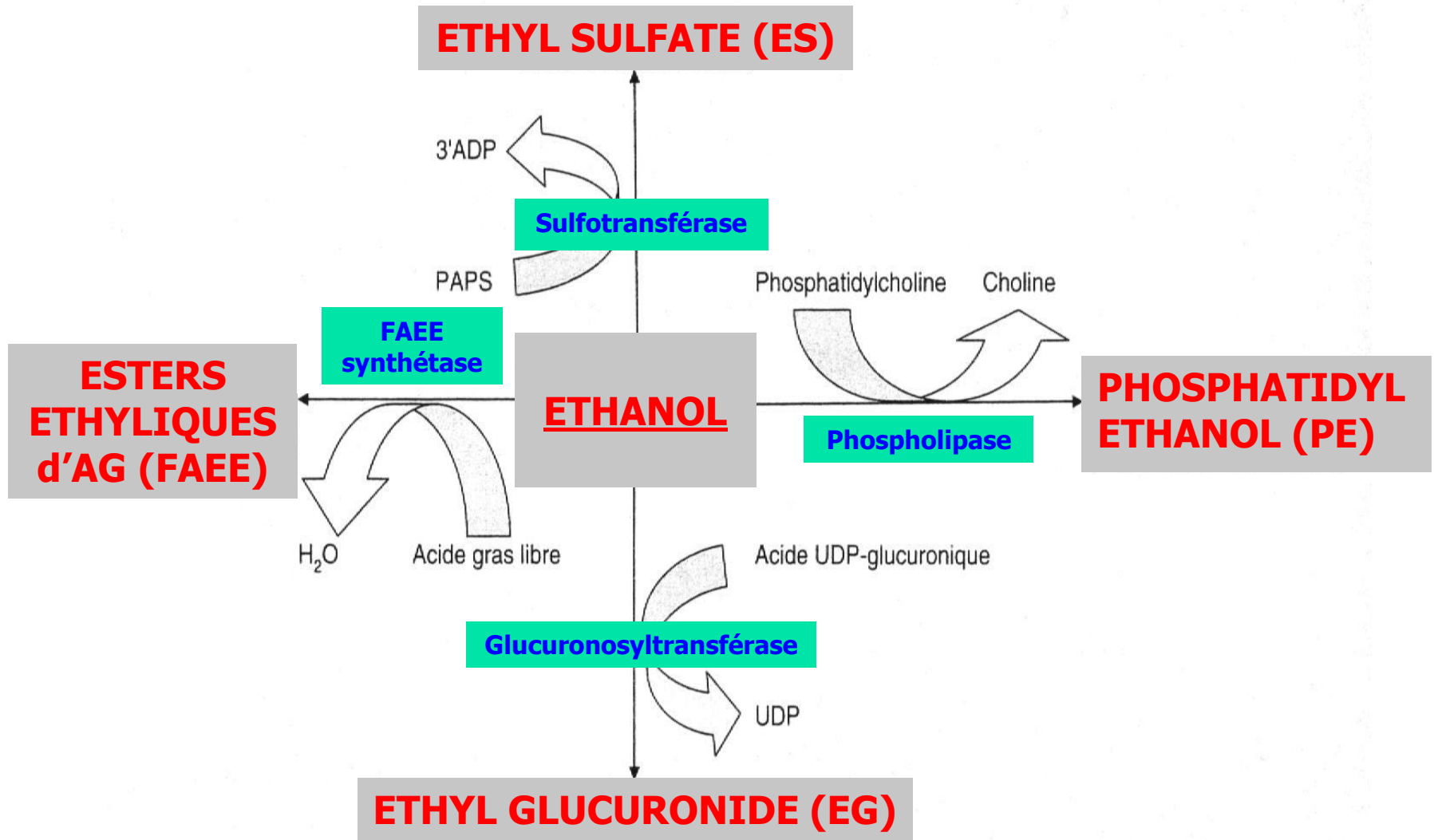
2. Voies métaboliques oxydatives 85-90%

2. Métabolisme oxydatif = marqueurs INDIRECTS

d'alcoolisation :

Examens biologiques indirects (VGM, Enz, CDT,...)

3. Voies métaboliques non oxydatives <<1% = 4 Marqueurs DIRECTS d'alcoolisation



3. Voies métaboliques non oxydatives <<1% = 4 Marqueurs DIRECTS d'alcoolisation

Tout à fait accessoires pour l'élimination de l'éthanol
Marqueurs spécifiques = grande importance biologique

Issus de la conjugaison avec l'éthanol ($\leq 1\text{‰}$) :

3.1 Ethyl glucuronide (EG)

3.2 Esters éthyliques d'acides gras (FAEE)

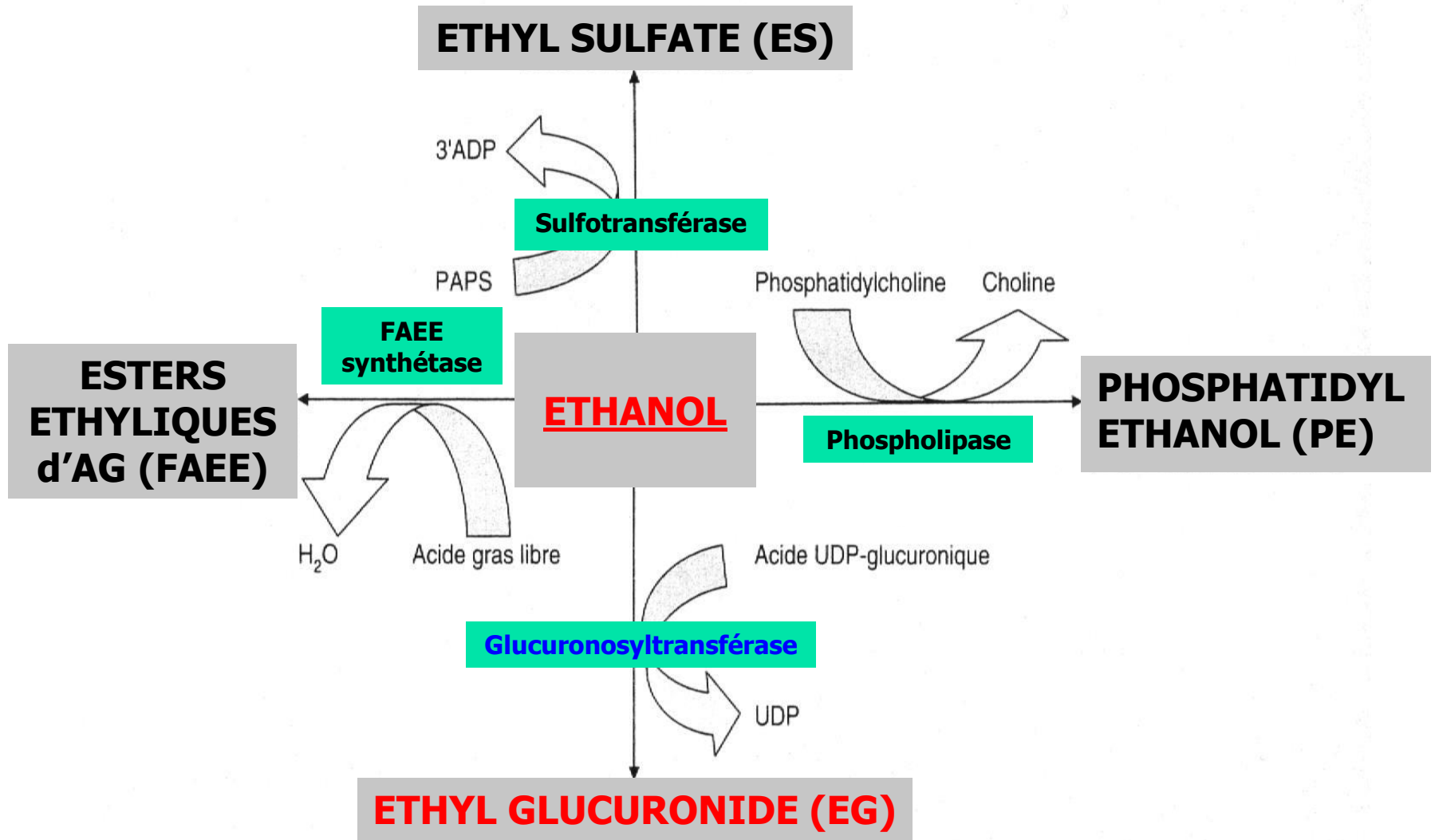
3.3 Ethyl sulfate (ES)

3.4 Phosphatidyléthanol (PE)

Nouveaux examens / sang, urines, cheveux, méconium

- **Diagnostic formel de consommation/expos. à l'éthanol**
- **Suivi consommation et du niveau de consommation**
- **Surveillance sevrage**

3.1 Ethyl Glucuronide (EG) = 1^{er} Marqueur DIRECT d'alcoolisation



3.1 Ethyl Glucuronide (EG) = 1^{er} Marqueur DIRECT d'alcoolisation

Milieux biologiques usuels : **urine + + +**, sang

- **Urine:** - milieu de choix
 - mesure rapide (IA) sur automate, utilisé en routine
 - positivité prolongée dans les milieux biologiques : **alcoolurie se négative rapidement → EG reste positif**
 - mise en évidence exposition à l'alcool, même faible¹
- Sang : - dosage par LC-MS/MS ou par GC-MS
 - importance médico-légale (prod. post-mortem alc.)
- Cheveux et méconium



3.1 Ethyl Glucuronide (EG)

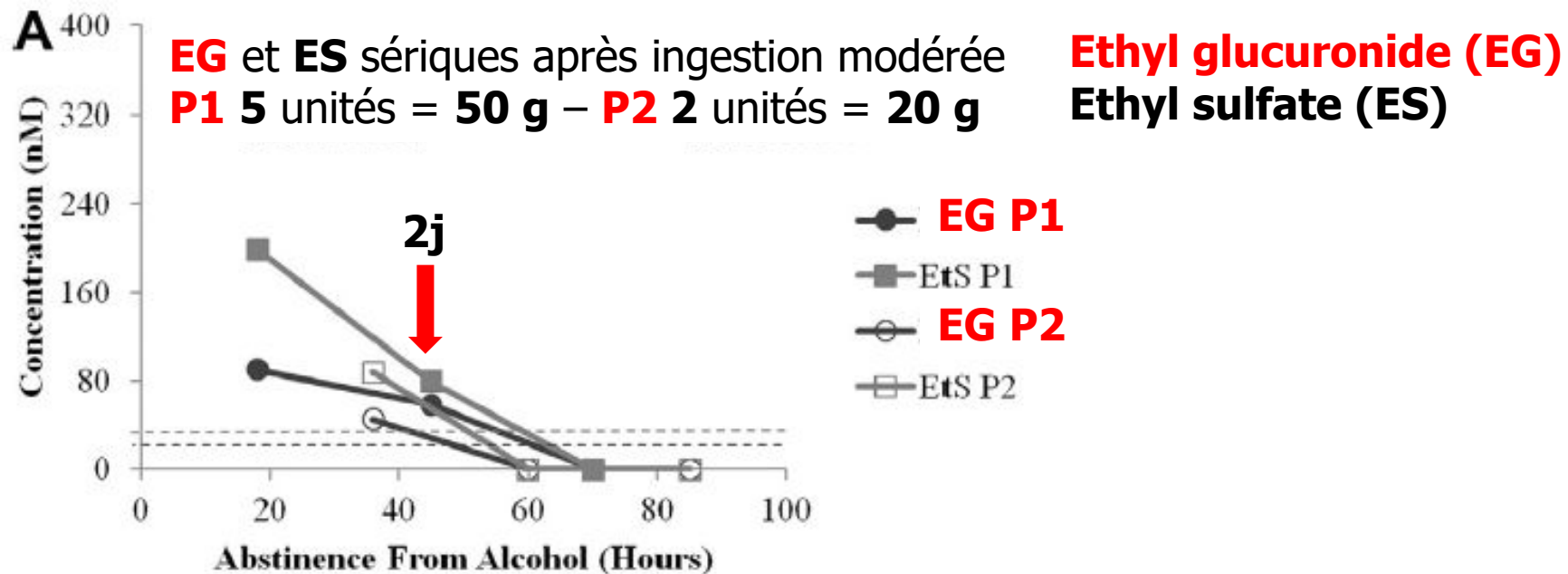
= 1^{er} Marqueur DIRECT d'alcoolisation

- Son existence a été longtemps ignorée (1 mg/L pour alc. 1 g/L)
- Formation décalée, demi-vie beaucoup plus longue que l'alcool
- Augmente la fenêtre de détection de l'éthanol (urine, X jours)
- Mise en évidence exposition à l'alcool, même si elle est faible
- Pas de faux positif, dosage urinaire en routine
- Dosage dans d'autres milieux biologiques : sang, cheveux, méconium

Milieu biologique	Fenêtre de détection
Urine	± 80 h (voire 5 j)
Sang	± 18 h (voire 2 j)
Cheveux (3 cm)	Conso. chronique
Méconium (≥ 19 s.)	Expos. chronique

Cabarcos et al. Anal Bioanal Chem, 2015, 407:4907-4925

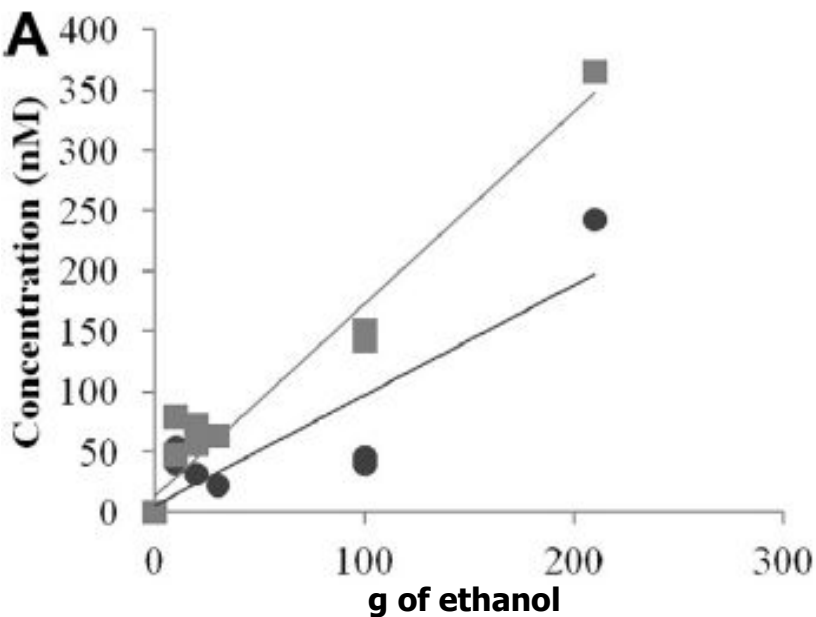
3.1 Ethyl Glucuronide (EG) = 1^{er} Marqueur DIRECT d'alcoolisation



3.1 Ethyl Glucuronide (EG) = 1^{er} Marqueur DIRECT d'alcoolisation

Corrélation entre la consommation d'alcool rapportée et l'**EG** marqueur d'alcoolisation

Total Alcohol Consumption Past
50 Hours (g of ethanol)



Ethyl glucuronide (EG)
Ethyl sulfate (ES)

● **EG**
■ **ES**
— Linear **EG**
— Linear **ES**

Le cheveu = un calendrier rétrospectif

Xénobiotiques → protéines → torrent circulatoire
→ incorporés / trame protéique du cheveu

- Pousse moyenne cheveux env. 1cm/mois
- **Chaque cm = mémoire exposition = 1 mois**
- Analyse segments de cheveux cm par cm :
suivi des variations de consommation ou d'exposition

SANG

→ quelques heures

URINES

→ quelques jours

CHEVEUX

→ semaines

→ mois (3 cm = 3 mois)



3.1 Ethyl Glucuronide (EG) : cheveux, méconium = 1^{er} Marqueur DIRECT d'alcoolisation

Dosage EG dans les cheveux = alcoolisme chronique

EG > 7 pg/mg = consommation répétée¹

EG > 30 pg/mg = consommation excessive répétée¹

Correspondant à > 60 g/j

Dosage EG dans le méconium = alcoolisme chronique

Consensus international = étalon or

EG > 30 pg/mg : signe conso. maternelle d'alcool ≥ 19 sem.

Corrélation à l'alcool déclaré consommé, n=106 (p<0,01)

Sensibilité 82%²

Spécificité 75%²

Bonne corrélation EG (cheveux mère – méconium)

expos. prénatale alcool (sens 85,7% - spec 73,7%)³



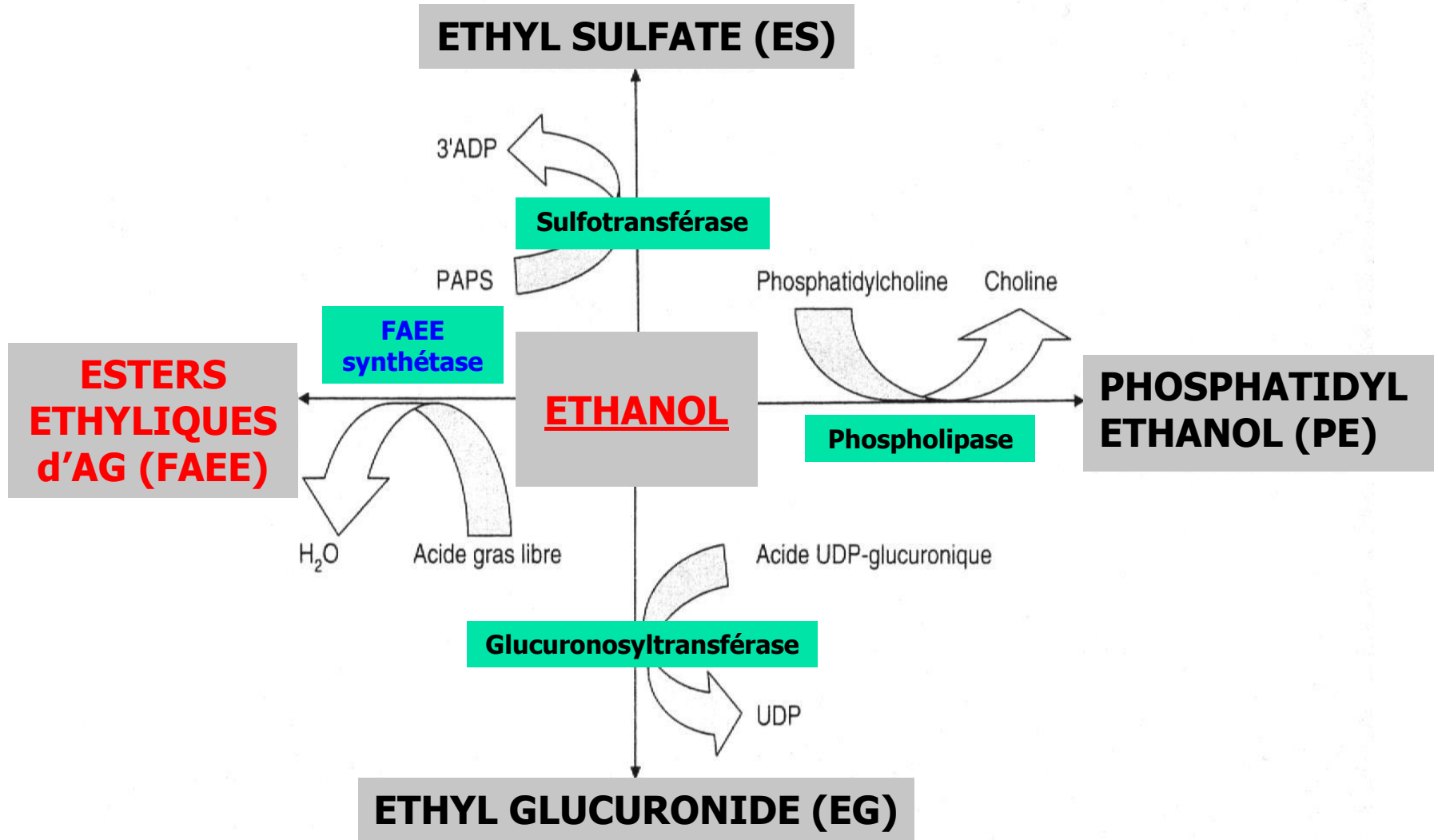
- 1- Consensus SoHT, 2016 2- Himes SK. Clin Chem, 2015
3- Joya X. Clin Chem Lab med, 2016, 54:427-35



Cheveux et sécurité routière

- **Analyse de cheveux et restitution du permis de conduire**
Réalisée ds nb pays en Europe : Allemagne, Belgique, Italie,...
Royaume-Uni: analyses capillaires = routine, comme sang/urine
- **Analyse de cheveux prévue par notre Code de la route :**
Décret 2003-93 du 31 mars 2003 :
« Le préfet soumet à des analyses ou à des examens médicaux, cliniques et biologiques notamment salivaires et capillaires... »
Décret 2012-886 du 17 juillet 2012 :
« Lors du contrôle médical, le médecin agréé ou la commission médicale peut prescrire tout examen complémentaire...»
- **Alcoolémie > 0,50 g/L dans 29% des accidents mortels**
(Statistiques ONISR, 2016)

3.2 Esters éthyliques d'acides gras (FAEE) = 2^{èmes} Marqueurs DIRECTS d'alcoolisation



3.2 Esters éthyliques d'acides gras (FAEE) = 2^{èmes} Marqueurs DIRECTS d'alcoolisation

Milieux biologique usuel : plasma

- Plusieurs esters d'acides gras sont analysés :
 - . palmitate, myristate, oléate et stéarate d'éthyle
- **Plasma**: - milieu de choix
 - dosage par LC-MS/MS ou par GC-MS
 - mise en évidence exposition à l'alcool, même faible¹
- Cheveux et méconium



1- Bager H. et al. Alcohol Clin Exp Res, 2017, 41:251-261

3.2 Esters éthyliques d'acides gras (FAEE) = 2^{èmes} Marqueurs DIRECTS d'alcoolisation

Dosage dans les cheveux = alcoolisme chronique

Ethyl palm > 0,35 ng/mg = conso. excessive répétée¹

Correspondant à > 60 g/j

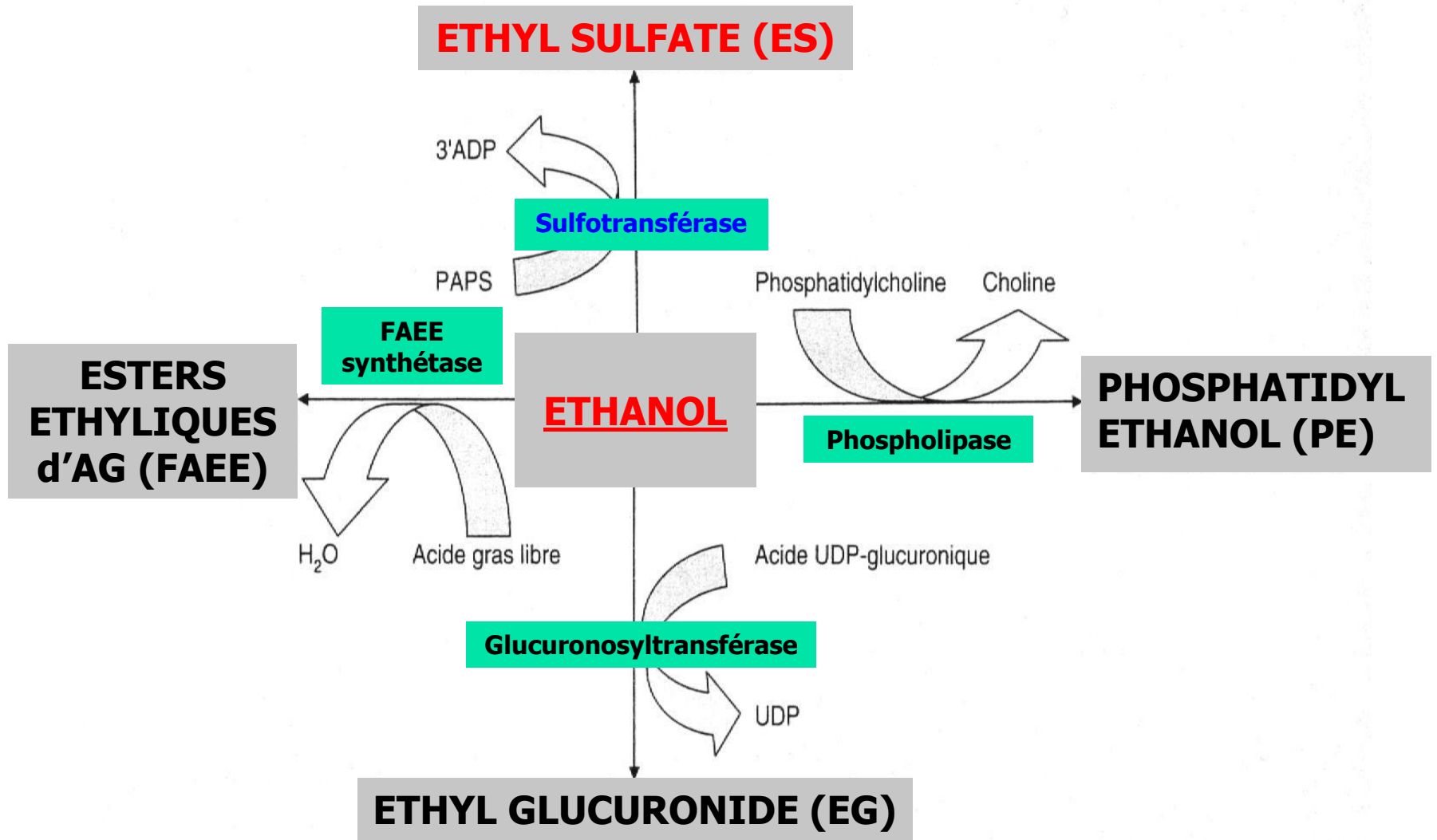


1- Consensus Society of Hair Testing, 2016



3.3 Ethyl sulfate (ES)

= 3^{ème} Marqueur DIRECT d'alcoolisation

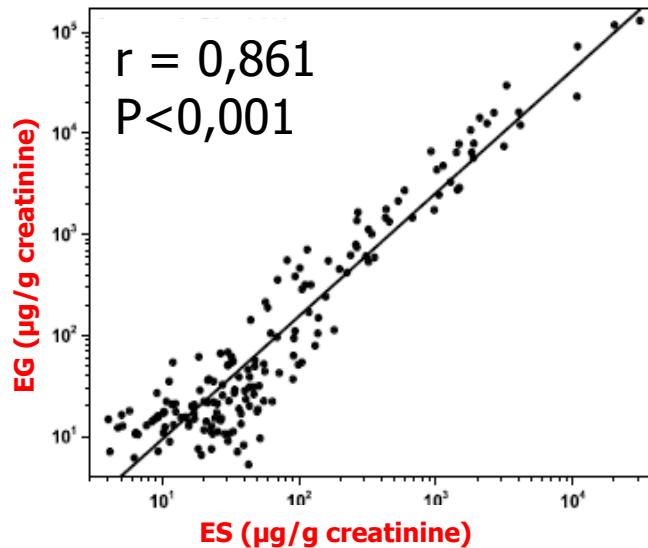


3.3 Ethyl sulfate (ES)

= 3^{ème} Marqueur DIRECT d'alcoolisation

Milieux biologique usuel : urine

- **Urine:** - milieu de choix
- dosage par LC-MS/MS ou par GC-MS
- mise en évidence exposition à l'alcool, même faible¹
- excellente corrélation avec EG urinaire²



2- Kilo S. et al. Int Arch Occup Env Health, 2016, 89: 1193-1203

- Cheveux : ES très bonne corrélation avec EG³

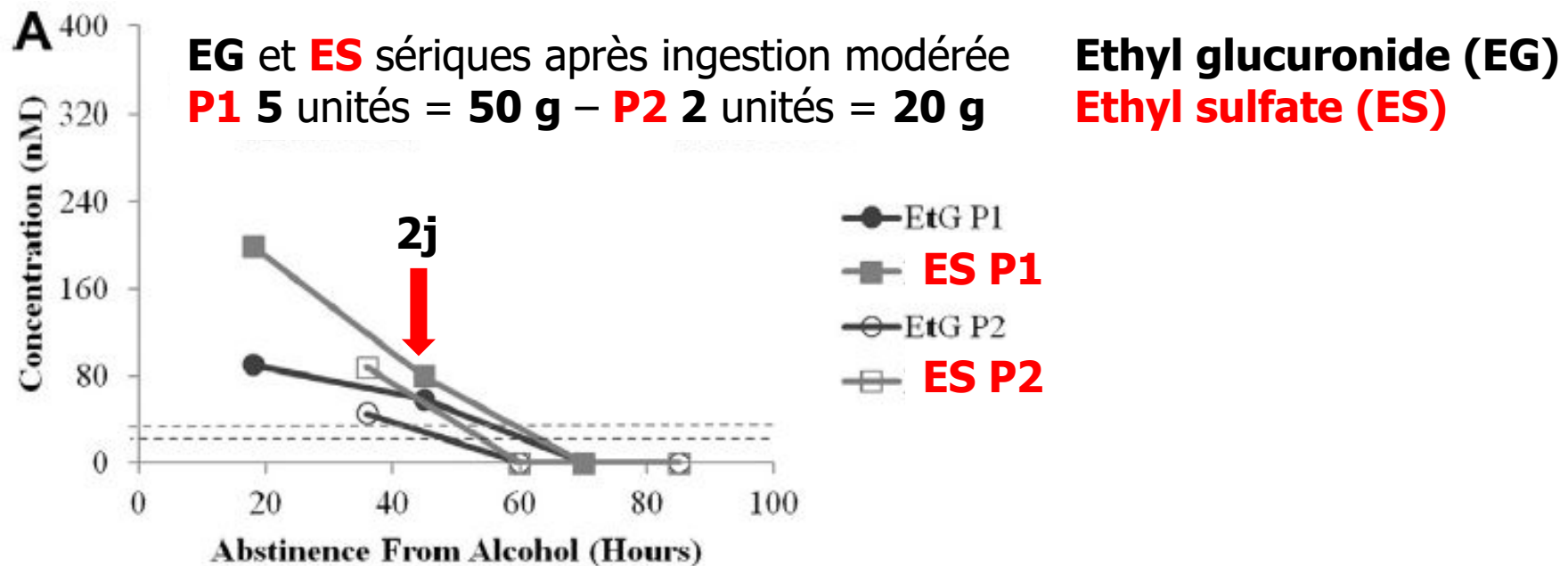
1- Bager H. et al. Alcohol Clin Exp Res, 2017, 41:251-261

3- Capelle D. et al. Drug Test Anal. 2018, 10:1566-1572



3.3 Ethyl sulfate (ES)

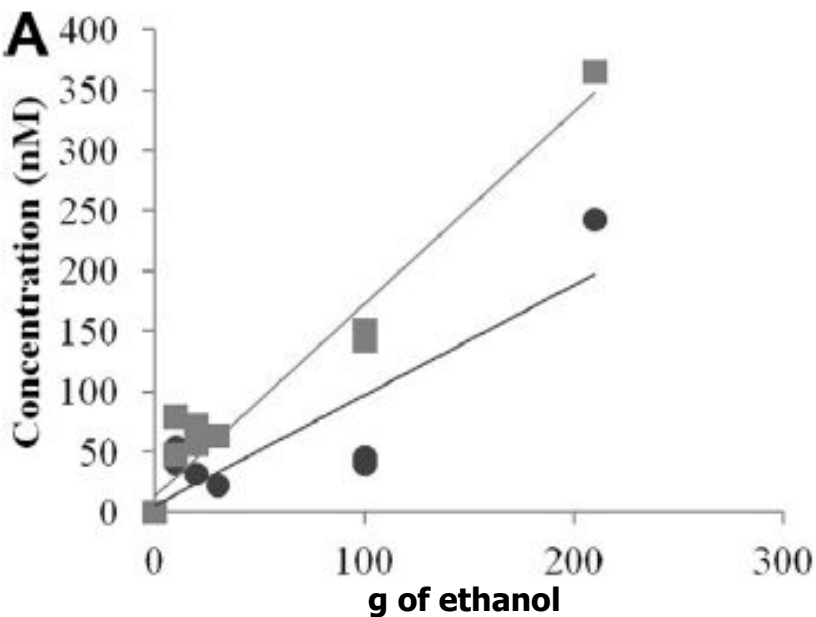
= 3^{ème} Marqueur DIRECT d'alcoolisation



3.3 Ethyl sulfate (ES) = 3^{ème} Marqueur DIRECT d'alcoolisation

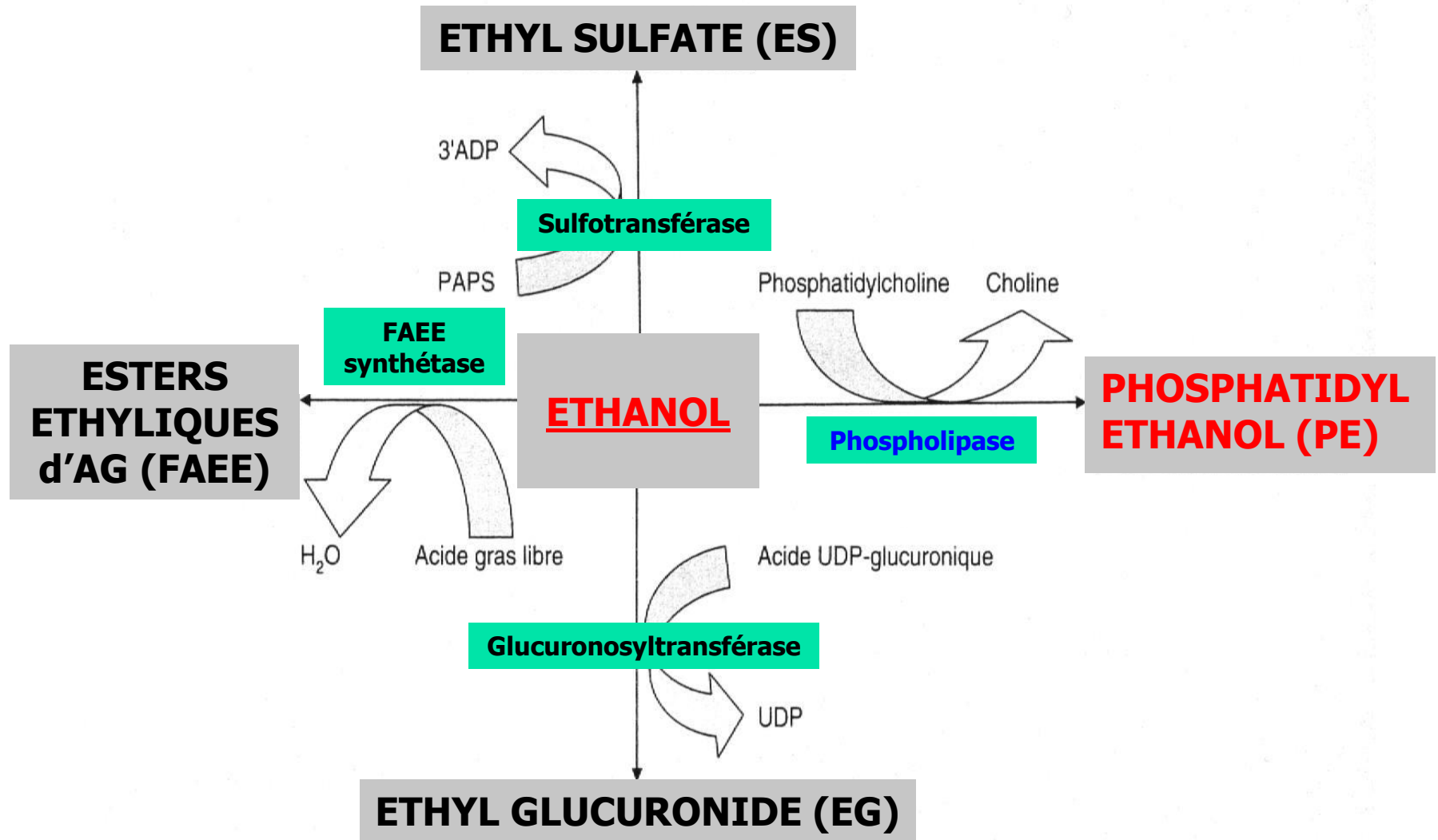
Corrélation entre la consommation d'alcool rapportée et l'**ES** marqueur d'alcoolisation

Total Alcohol Consumption Past
50 Hours (g of ethanol)



Ethyl glucuronide (EG)
Ethyl sulfate (ES)

3.4 Phosphatidyléthanol (PE) = 4^{ème} Marqueur DIRECT d'alcoolisation



3.4 Phosphatidyléthanol (PE) = 4^{ème} Marqueur DIRECT d'alcoolisation

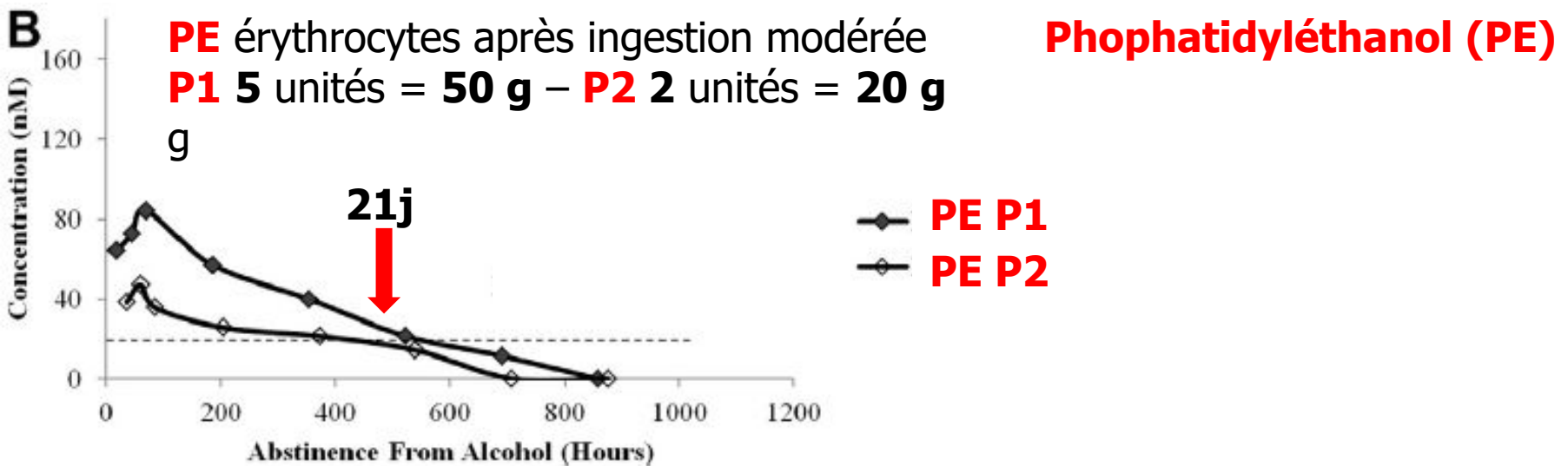
Milieux biologiques usuels : sang (spot séché DBS), urine

- Une demi-vie particulièrement longue
- **Sang** : - dosage par LC-MS/MS sur spot de sang séché (DBS)
 - comparé à l'EG et à l'ES dans l'urine, dosage PE adapté pour déceler rechute sevrage, car accumulation de PE dans le sang prolonge la positivité de l'analyse¹.
- Urine : - dosage par LC-MS/MS,
 - positivité très prolongée (alcoolurie négative)
 - sélection des patients donneurs greffe hépatique²:
PE \geq 84 ng/mL sensibilité 75%, spécificité 97%
30% des donneurs récusés selon les critères actuels UNOS (United Network for Organ Sharing)²

1- Luginbühl M. et al. Drug Test Anal, 2019, doi 10.1002/dta 2567

2- Lowery E.M. et al. Alcohol, 2018, 73:67-72

3.4 Phosphatidyléthanol (PE) = 4^{ème} Marqueur DIRECT d'alcoolisation

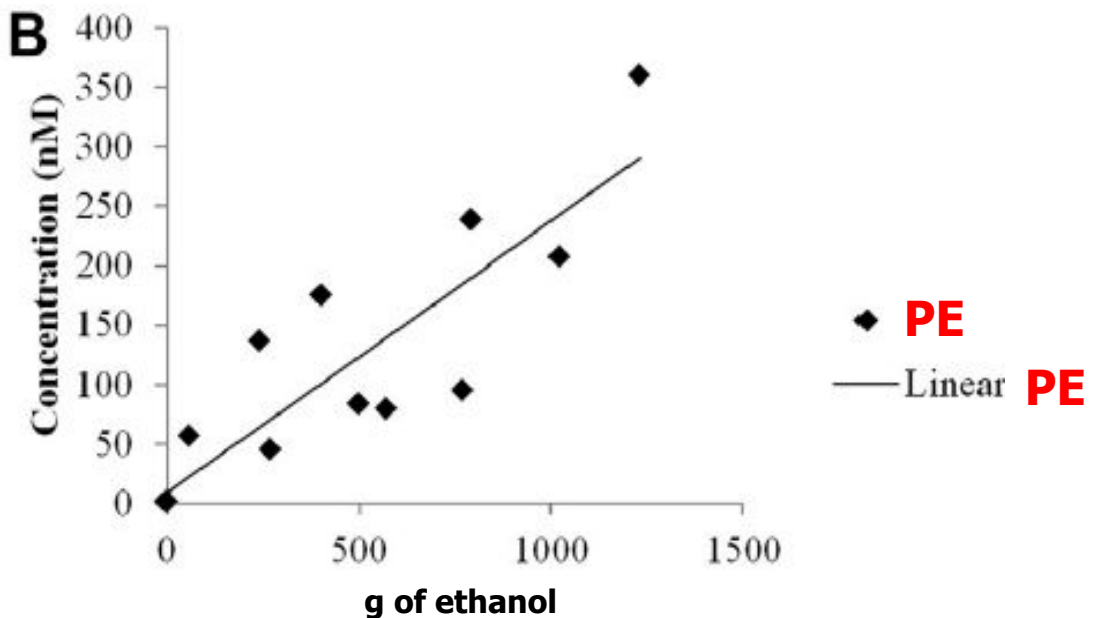


3.4 Phosphatidyléthanol (PE) = 4^{ème} Marqueur DIRECT d'alcoolisation

Corrélation entre la consommation d'alcool rapportée et le **PE** marqueur d'alcoolisation

Total Alcohol Consumption Past
30 Days (g of ethanol)

Phosphatidyléthanol (PE)



CONCLUSION

- Intérêt majeur des marqueurs biologiques **directs**, car **spécifiques** de l'exposition à l'alcool (**issus de C₂H₅OH**)
- Ils peuvent compléter selon le contexte, les marqueurs indirects
- Les applications de ces marqueurs directs sont nombreuses:
 - en pratique clinique : dépister la consommation, surveiller un sevrage, profiler la consommation, rechercher un alcoolisme fœtal,...
 - en matière de greffe hépatique : certifier un greffon
 - dans un contexte médico-légal : valider formellement une alcoolémie
 - dans le cadre de la sécurité routière: pour restituer le permis de conduire
- Intérêt de l'analyse capillaire: durée et niveau de consommation
- **L'EG urinaire occupe une place de choix: test rapide sur automate**
- Excepté l'EG, les autres dosages se heurtent encore à l'absence de dosages rapides et au coût des techniques mises en œuvre