

Effets à long terme et surveillance biologique des expositions professionnelles aux alcools et aux glycols

Long-term health effects and biological monitoring of occupational exposure to aliphatic alcohols and glycols

J.-P. ANGER

Laboratoire de Toxicologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques,
2, Avenue du Professeur Léon Bernard - 35043 RENNES Cedex - Tél : 02 99 33 69 36 - Fax : 02 99 33 62 42

RÉSUMÉ

Les alcools et les glycols sont des solvants couramment utilisés aussi bien dans l'industrie que dans les foyers domestiques. Ils peuvent être à l'origine d'intoxications aiguës accidentelles ou volontaires parfois gravissimes. A terme, l'exposition répétée par voie pulmonaire ou contact cutané peut être à l'origine d'effets toxiques systémiques variés. Au début des années 80, plusieurs publications font état de la toxicité à terme de certains dérivés du méthyl et de l'éthylglycol qui induisent tant chez l'animal que chez l'homme des effets testiculaires, tératogènes et hématologiques tandis que les homologues supérieurs, dérivés du butylglycol, s'avèrent responsables d'un effet hémolytique. A l'opposé, les dérivés du propylène glycol ne présentent aucun risque sur les plans testiculaire, embryotoxique ou hématologique. Cette différence de toxicité est essentiellement liée à des différences de métabolisme. Une surveillance biologique spécifique a donc été mise en place en milieu professionnel. Elle permet d'évaluer sur un prélèvement biologique (sang, urine, air expiré) provenant d'un sujet exposé, la concentration du polluant ou de l'un de ses métabolites caractéristiques. Le risque toxique pourra ainsi être apprécié en sus du contrôle d'ambiance et permettra au médecin du travail d'assurer, dans l'entreprise, une prévention adéquate.

MOTS-CLÉS

Alcools, glycols, exposition à terme, surveillance biologique.

SUMMARY

Alcohols and glycols are widely used solvents for industrial as well as domestic purposes. They can be the cause of accidental or intentional acute cases of poisoning which may sometimes be very serious. In the eighties, it was demonstrated that repeated inhalation or skin contact can be at the origin of various systemic toxic effects. Some methyl and ethyl glycol derivatives induce both in animals and men testicular atrophy, teratological and haematological effects while butylglycols are responsible for haemolysis. Compounds of the propylene glycol family are without health hazard. This toxicity difference is mainly due to differences in their metabolism. A specific biological monitoring has been set up in work places. It permits an evaluation of the pollutant or one of its characteristic metabolites from a biological sample (blood, urine, expired air) of an exposed worker. It will thus be possible to assess the toxic hazard which will enable the occupational physician to set up an adequate prevention in the firm.

KEY-WORDS

Alcohols, glycols, long term exposure, biological monitoring.

Introduction

Dans le Guide BIOTOX (1) regroupant les polluants le plus souvent rencontrés en milieu professionnel ainsi que les biomarqueurs correspondants utilisés pour mesurer l'imprégnation chez les sujets professionnellement exposés, on trouve cités parmi les alcools et les glycols, les composés suivants (Tableau I) :

Ces solvants sont couramment utilisés aussi bien dans l'industrie qu'à la maison. Ils peuvent être à l'origine d'intoxications aiguës accidentelles parfois gravissimes mais aussi d'effets toxiques à long terme nécessitant de ce fait une surveillance biologique pertinente dont l'interprétation permettra au médecin du travail de réaliser pleinement sa mission de prévention.

Nous n'envisagerons ici que les risques liés à une exposition professionnelle à long terme puisque les effets résultant d'une intoxication aiguë seront présentés ailleurs.

Effets toxiques liés à l'exposition à long terme aux alcools aliphatiques et aux glycols.

Alcools aliphatiques

Lorsqu'ils se trouvent à l'état de vapeurs, les alcools volatils pénètrent facilement dans l'organisme. Par contre ils ne semblent pas traverser facilement la peau,

mais quelques exceptions (méthanol, isopropanol, n-butanol) incitent à une certaine prudence. L'intoxication par ingestion n'est pas rare, certains alcools (méthanol, isopropanol) pouvant être utilisés comme substituts de l'éthanol dans des boissons alcoolisées.

Sur un plan toxicologique très général, les alcools sont considérés comme des solvants peu dangereux. Certains d'entre eux présentent cependant une toxicité systémique aiguë particulière : lésions du nerf optique avec le méthanol, atteinte rénale avec l'éthylène glycol et ses dérivés (cellosolves). Les alcools sont surtout des toxiques du système nerveux qui entraînent d'abord une excitation plus ou moins intense (ébrioité) avec des troubles neuro-sensoriels suivis d'un état dépressif (ivresse) qui peut évoluer parfois jusqu'au coma. En cas d'ingestion massive, on observe une acidose métabolique à l'origine de défaillances respiratoires et cardiaques. Ce sont aussi des irritants de la peau (dermatoses) et des muqueuses (yeux, voies respiratoires). Globalement la toxicité nerveuse des alcools croît avec l'augmentation de leur poids moléculaire.

Méthanol (CH₃OH)

Solvant industriel très apprécié des laques, vernis, celluloses et matières plastiques, très souvent utilisé en synthèse organique et pour la fabrication des liquides antigels, le méthanol est aussi d'un usage courant en laboratoire (cristallisation, chromatographie, etc.). En milieu professionnel, les voies d'absorption sont essentiellement respiratoires (58 % du méthanol inhalé sont

Tableau I : Alcools et glycols faisant l'objet d'une surveillance biologique en milieu professionnel et répertoriés dans le Guide BIOTOX.

Solvants	Nom usuel	Nom officiel	Abréviation usuelle	N° CAS
Alcools aliphatiques	Alcool méthylique	Méthanol	MeOH	67-56-1
	Alcool éthylique	Ethanol	EtOH	64-17-5
	Alcool isopropylique	-2Propanol	2-PrOH	67-63-0
	Alcool isobutylique	2-Butanol	2-BuOH	78-92-2
Glycols	Acétate d'éthyl glycol	Acétate de 2-éthoxyéthyle	A E G	111-15-9
	Acétate de butyl glycol	Acétate de 2-(2 butoxyéthoxy)éthyle	A B di G	124-17-4
	Acétate de méthyl glycol	Acétate de 2 méthoxyéthyle	A M G	110-49-6
	Butyl glycol	2-(2 butoxyéthoxy)éthanol	B di G	112-34-5
	Diéthylène glycol	dihydroxy-2-2'-diéthylether	di G	111-46-6
	Ethyl glycol	2-éthoxyéthanol	E G	110-80-5
	Ethylène glycol	éthanediol		107-21-1
	Méthyl glycol	2-méthoxyéthanol	M G	109-86-4
	Méthylpropylène glycol	1-méthoxy-2-propanol	M P G	107-98-2

absorbés), cutanée (équivalente ou supérieure à l'absorption pulmonaire) et accessoirement digestive. Après absorption, le méthanol diffuse rapidement et complètement dans l'eau totale de l'organisme. Cette forte affinité pour l'eau est responsable de sa lente élimination et aboutit à un phénomène cumulatif. Le méthanol est métabolisé en aldéhyde formique (HCHO) et en acide formique (HCOOH), tous deux responsables de son action toxique, notamment au niveau du tissu rétinien. Ces deux facteurs (lente élimination et métabolisme toxifiant) font du méthanol, à dose égale, un produit plus dangereux pour l'homme que l'éthanol.

En dehors de l'intoxication aiguë qui se produit essentiellement par ingestion et qui est très grave, il faut souligner qu'à long terme, l'exposition pulmonaire répétée à ce solvant se manifeste essentiellement par de la conjonctivite, des troubles nerveux légers (céphalées, insomnies, etc.), une baisse de l'acuité visuelle (amaurose méthanolique) aboutissant souvent à une cécité plus ou moins complète. Le pronostic de cette intoxication est grave car son évolution peut parfois être brutale et aboutir au coma. Le contact cutané répété avec le méthanol entraîne des signes d'irritation cutanée : dermite, érythèmes (2).

La surveillance en hygiène industrielle de l'exposition par voie pulmonaire au méthanol est réalisée grâce à des prélèvements d'ambiance ou individuels (badges) à hauteur des voies respiratoires des salariés et vérifie que la valeur moyenne d'exposition (V M E) calculée sur 8 heures de travail, ne dépasse pas 200 ppm (260 mg/m³) en France.

Ethanol (C₂H₅OH)

En raison de sa faible toxicité, l'éthanol est un excellent solvant industriel (vernis, peinture, parfums, produits pharmaceutiques...) et présente des usages multiples en laboratoire (milieux réactionnels, extractions, cristallisation, etc.)

L'intoxication par inhalation de vapeurs d'éthanol ou par absorption percutanée est possible, mais c'est l'absorption exagérée de boissons alcoolisées qui est la cause essentielle de la toxicité de ce produit. Pour cette raison, en milieu industriel, on le considère comme un solvant assez inoffensif (3).

Diffusant dans tout l'organisme, l'éthanol est oxydé à raison de 80 à 90 % au niveau du foie en aldéhyde acétique (acétaldéhyde) et en acide acétique ultérieurement oxydé en gaz carbonique et eau au niveau du cycle de Krebs. Environ 5 à 10 % de l'éthanol sont éliminés par l'air expiré, les urines et la sueur.

L'exposition à des concentrations élevées de vapeur

peut néanmoins entraîner une irritation des muqueuses des voies respiratoires et des yeux, des céphalées, des vertiges, un état d'ébriété et de somnolence.

La V M E est actuellement fixée à 1000 ppm (1900 mg/m³).

Isopropanol (C₃H₇OH)

Cet alcool est essentiellement utilisé comme solvant. Rapidement absorbé par les voies respiratoire et digestive, l'alcool isopropylique se distribue dans tout l'organisme avec une demi-vie sanguine variant de 2 à 6 heures. L'isopropanol est en partie éliminé sous forme inchangée par voie respiratoire et en partie métabolisé : il est essentiellement oxydé en acétone dont la demi-vie est beaucoup plus longue que celle de l'isopropanol.

L'isopropanol est un produit irritant pour la peau et les muqueuses. A long terme sa cancérogénécité a été suspectée. En fait les données expérimentales montrant un excès de cancers des sinus maxillaires concernent les expositions aux huiles isopropyliques et, chez l'homme, c'est le procédé de fabrication de l'isopropanol qui est considéré comme cancérogène, ce qui n'est pas le cas de l'utilisation professionnelle de l'isopropanol lui-même (2).

En France, la valeur limite d'exposition (V L E) a été fixée à 400 ppm (980 mg/m³).

Butanol et isobutanol (C₄H₉OH)

Ces deux solvants sont facilement absorbés par voie pulmonaire (vapeurs) et par voie cutanée (contact direct).

Le n-butanol est modérément irritant pour la peau mais peut entraîner, après exposition pulmonaire, une irritation oculaire et nasale, des céphalées et des vertiges. Des études expérimentales ont démontré après expositions répétées, une atteinte hépatique et rénale. Chez l'homme cependant une surveillance biologique, hépatique, hémato-logique et rénale d'une population exposée professionnellement pendant 10 ans, à des concentrations pouvant atteindre 200 ppm, n'a rien permis de déceler. Par contre cette population a présenté une pathologie oculaire à type d'oedème cornéen et d'oedème conjonctival se traduisant par des brûlures oculaires (2).

Glycols et dérivés.

Les glycols sont des hydrocarbures aliphatiques qui possèdent une double fonction hydroxyle. En dehors de leur utilisation générale comme fluides caloporteurs, liquides antigels, fluides hydrauliques ou intermédiaires chimiques, les glycols ont également quelques utilisations spécifiques en tant que solvants industriels

de la nitrocellulose et de l'acétate de cellulose ainsi que dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique.

En raison de leur faible volatilité, les glycols ne présentent généralement pas de risque d'inhalation de vapeurs à la température ordinaire. Cependant, lors de leur utilisation dans des mélanges antigels ou comme fluides caloporteurs, on peut les retrouver à l'état de vapeur, notamment lorsque la température est élevée. En l'absence de protection particulière, le passage cutané est loin d'être négligeable.

Ethylène glycol (CH₂OH-CH₂OH)

C'est essentiellement l'intoxication aiguë par ingestion qui est le plus souvent rapportée : elle est très rare en milieu professionnel. Moins connue, l'exposition répétée à de faibles concentrations atmosphériques d'éthylène glycol, est responsable d'une irritation des muqueuses oculaires et respiratoires. Un nystagmus, une somnolence et une hyperleucocytose ont également été rapportés. L'éthylène glycol passe la barrière placentaire ; il est foetotoxique et tératogène (4)

Autres glycols

Les di-, tri- et tétraéthylène glycols ainsi que le propylène glycol ne présentent pas, sur le plan professionnel, de risques particuliers, lors d'expositions à long terme.

Éthers et esters de glycol

Les éthers et esters de glycol forment une classe de substances chimiques largement utilisées dans la formulation de produits à usage industriel et domestique : peintures, encres, vernis, cosmétiques, produits d'entretien, produits pour la métallurgie et la mécanique. L'appellation générique "éthers de glycol" recouvre en fait deux familles de composés : les dérivés de l'éthylène glycol et les dérivés du propylène glycol (1, 2 propanediol).

L'utilisation industrielle des éthers éthyléniques remonte aux années 30 mais c'est surtout dans les années 70 que leur emploi va s'amplifier. Les plus utilisés sont l'éthyl glycol (EG), l'acétate d'éthyl glycol (AEG) et le butyl glycol (BG). Au début des années 80, de nombreuses publications soulignent la toxicité de certains dérivés éthyléniques : méthyl glycol (MG), acétate de méthyl glycol (AMG) et AEG qui induisent des effets testiculaires, tératogènes et hématologiques tant en expérimentation sur l'animal que chez l'homme. Leur toxicité est étroitement liée à leur métabolisme qui aboutit chez l'homme à la formation d'acides alcoxyacétiques (acides méthoxy-, éthoxy- et butoxyacétiques). Ils sont également doués d'un fort pouvoir de

pénétration cutanée et ce mode d'exposition peut jouer un rôle prépondérant quant à leur toxicité (5).

Aujourd'hui, sur la base des connaissances acquises, les éthers de glycols sont classés, selon leur toxicité, en trois groupes :

Groupe I : MG, AMG, EG et AEG

Groupe II : BG et ABG

Groupe III : MP, AMP et Butyl di glycol (BdiG)

Toxicité expérimentale à long terme des éthers de glycols

Si les éthers de glycol ont en général une toxicité aiguë faible chez différentes espèces animales (rat, souris, lapin, cobaye), il n'en est pas de même de leurs effets à plus ou moins long terme (6, 7).

Groupe I : ils présentent les mêmes types d'effets mis en évidence sur plusieurs espèces animales et selon plusieurs voies d'exposition. Les testicules, l'embryon, la moelle osseuse et le thymus sont les principales cibles de leur action. Cela se traduit par des effets :

- testiculaires : atrophie testiculaire, dégénérescence de l'épithélium germinale des tubes séminifères. On assiste à une diminution du nombre habituel des spermatozoïdes (oligospermie) voire à une disparition complète (azoospermie);

- sur le développement, notamment tératogènes. Les malformations constatées sont très variées : elles affectent le squelette, le système cardio-vasculaire, les reins et dans une moindre mesure, les doigts et membres. Des effets neurologiques sur la descendance sont également notés.

Ces deux types d'effets s'observent pour des expositions à des doses non toxiques pour les mères ou les femelles gestantes.

- hématologiques, de type hypoplasiant. Les globules blancs sont touchés principalement, mais les globules rouges sont atteints également à dose plus élevée. Cette lymphopénie apparaît liée à une sévère atrophie du thymus et à la déplétion presque totale des lymphocytes dans le cortex thymique.

Dans ces trois types d'effets, MG et AMG apparaissent agir à des doses plus faibles que EG et AEG.

Groupe II : l'effet majeur de ces substances est l'effet hémolytique : diminution des globules rouges et du taux d'hémoglobine, augmentation des réticulocytes (par suite d'une réaction proliférative de la moelle osseuse pour compenser la destruction des globules rouges dans le sang périphérique par effet hémolytique), hématurie et hémoglobinurie. Ces effets surviennent à des doses relativement faibles en exposition prolongée chez le rat.

Le foie et les reins sont décrits par plusieurs auteurs comme étant les organes cibles.

L'effet embryotoxique du BG n'est pas de type tératogène. Les résultats obtenus sur des cultures d'embryons de rat semblent montrer que la toxicité maternelle n'est pas la seule en cause dans cette embryotoxicité.

Groupe III : à l'exception des isomères β du PM et de son acétate (PMA) dont les effets toxiques se rapprocheraient de ceux du Groupe I, tous les composés de ce groupe ne présentent aucun effet testiculaire, embryotoxique et/ou hématologique. A ce groupe, on peut, au plan risque toxique, adjoindre un dérivé très utilisé industriellement, le BdiG. Ce dernier ne peut être classé dans le même groupe que le BG du fait de l'absence de toxicité hématologique et d'embryotoxicité.

La différence de toxicité entre le premier et le second groupe d'une part, et le troisième groupe d'autre part, est liée principalement à leurs schémas métaboliques différents : dans le premier cas, la voie majeure est celle du système enzymatique utilisant une alcoolaldéhyde déshydrogénase (ADH) puis une aldéhyde déshydrogénase (ALDH) aboutissant à la formation d'un acide alcoxyacétique. Dans le second cas, la métabolisation est une O-déalcylation. En effet, le pyrazole, inhibiteur de l'ADH protège les animaux des effets toxiques sur la reproduction, sur le développement ainsi que les effets hématologiques des glycols des deux premiers groupes.

Toxicité *in vitro*

Les différents tests *in vitro* ont montré :

- une toxicité médullaire sévère pour les substances des deux premiers groupes mais la réponse, qui est dose-dépendante, varie fortement selon le produit;
- une perturbation des mécanismes de la division cellulaire qui pourrait être le point de départ d'un processus de transformation néoplasique, sur différents modèles cellulaires, chez la souris ;
- une activité probablement de type épigénétique : les essais réalisés sur la plupart des composants commercialisés sont presque tous négatifs. Toutefois dans le test d'Ames, le BG et l'aldéhyde méthoxyacétique du MG révèlent un pouvoir mutagène vis à vis de la souche TA 97a. Cette dernière molécule provoque également une mutation ponctuelle sur les cellules ovariennes de hamster chinois ainsi que des aberrations chromosomiques sur lymphocytes humains et *in vivo*, dans le test du micro noyau. Une étude globale sur les effets génétiques effectuée sur les composés des trois groupes et leurs métabolites a montré que seul le BG à forte dose et l'aldéhyde du MG provoquaient des mutations géniques. Les alcoxyaldéhydes et les acides alcoxyacétiques se révèlent clastogènes et certains

composés induisent des échanges de chromatides sœurs (8).

L'ensemble de ces essais indique donc une action sur la reproduction cellulaire et la réplication de l'A D N par effet génotoxique et/ou épigénétique pour certains éthers de l'éthylène et du propylène glycol. Cette action est particulièrement importante pour les aldéhydes (métabolites intermédiaires).

Toxicité pour l'homme

Les données humaines sont nettement moins nombreuses que les données expérimentales (9).

Effets sur la spermatogénèse

Chez l'homme, c'est l'exposition à l'EG qui a été incriminée comme facteur d'azoospermie dans plusieurs études réalisées aux États Unis ou en Belgique. Aucune conséquence sur la fertilité de personnes travaillant dans la fabrication de semi-conducteurs n'a pu actuellement être mise en évidence. Si le MG ne provoque pas d'anomalie du spermogramme ou de la fertilité, il entraîne une diminution de la taille des testicules.

Effets tératogènes

Quelques cas de malformations congénitales de l'enfant ont été signalés après exposition de la mère à l'EG et au MG. Une augmentation du nombre d'avortements spontanés chez des femmes travaillant à la fabrication de semi-conducteurs a été constatée. Il est cependant particulièrement difficile d'incriminer les seuls éthers de glycol dans la genèse de ces anomalies car, dans ce secteur professionnel, on emploie de nombreux produits chimiques dont les métaux et certains solvants.

Effets hématologiques

La recherche d'une action aplasiant à partir d'une étude rétrospective de cas de benzolisme déclarés en Ile de France, a permis notamment, dans le cas de neutropénies, d'exclure l'exposition au benzène et de suspecter, par contre, une exposition aux éthers du glycol contenus dans des peintures, des nettoyeurs, des révélateurs photos et des encres. Malheureusement la fréquence de ces anomalies et leur réversibilité n'ont pu être appréciées dans cette étude. D'autres études réalisées dans plusieurs régions de France n'ont pas permis de mettre en évidence d'anomalie hématologique, ni de risque leucémogène lié à l'exposition aux éthers de glycol.

Si l'hémolyse peut être observée expérimentalement, elle n'apparaît chez l'homme qu'à des doses élevées car les globules rouges humains sont plus résistants que ceux du rat et la formation du métabolite actif est moindre chez l'homme.

Pour conclure, MG et EG provoquent des effets sur la reproduction et on ne peut exclure pour l'instant le

risque de leucémie. Ces deux produits devraient voir leur utilisation restreinte pour n'être employés que dans les procédés où les expositions peuvent être maîtrisées.

Surveillance biologique de l'exposition professionnelle aux alcools et glycols

La surveillance biologique constitue une démarche complémentaire à la surveillance atmosphérique pour apprécier l'exposition des travailleurs aux substances chimiques. Cette méthode intègre à la fois toutes les voies d'absorption et toutes les sources d'exposition qu'elles soient professionnelles ou extra-professionnelles. L'interprétation des données doit tenir compte de nombreux facteurs susceptibles d'influencer le métabolisme de la substance (absorption, biotransformations, élimination) dont la charge physique de travail, le statut physiologique du sujet, l'hygiène personnelle, les habitudes tabagiques, la consommation d'alcool et/ou de médicaments, l'exposition simultanée à plusieurs substances, etc.

En France, on a défini pour un certain nombre de substances chimiques, des indicateurs biologiques d'exposition (I B E) avec des valeurs-guides établies selon les données techniques, toxicologiques et épidémiologiques développées sur le territoire ou tirées de la littérature internationale. Classiquement la mesure d'un ou plusieurs I B E estime, sur un prélèvement biologique (sang, urine, air expiré) provenant d'un sujet exposé, la concentration du polluant ou de l'un de ses métabolites spécifiques. Ce type de mesure peut fournir un "reflet" de la "dose interne" c'est à dire celle existant au niveau de l'organe cible, donc celle susceptible d'une action toxique pour l'organe.

Cas des alcools aliphatiques

Méthanol

La surveillance biologique de l'exposition globale au méthanol permet de mieux évaluer, pour chaque salarié, la dose interne reçue. Plusieurs paramètres ont été proposés : le méthanol dans le sang, l'urine ou l'air expiré et le formiate urinaire. Bien qu'il existe une bonne corrélation entre les concentrations atmosphériques, les taux urinaires et les taux sanguins de méthanol en fin de poste de travail, il a été clairement établi que le dosage du méthanol inchangé dans l'urine, représente aujourd'hui le meilleur moyen de surveillance.

Le taux de méthanol sanguin est multiplié par 4 chez des volontaires exposés à 200 ppm de méthanol, par

voie respiratoire, pendant 4 heures. La méthanolémie décroît ensuite selon un mode monoexponentiel avec une demi-vie moyenne de 2,2 heures.

En pratique, la méthanolurie est préférée car moins invasive; d'autre part, ce dosage reflète l'exposition du jour même mais aussi l'imprégnation globale de tout l'organisme. Les urines sont recueillies en fin de poste.

Le dosage de l'acide formique urinaire en début de poste et en fin de semaine de travail avait été proposé comme I B E par l'Association américaine des hygiénistes industriels (ACGIH) mais la corrélation avec les concentrations atmosphériques n'est pas toujours bonne, ceci en raison de la pénétration cutanée associée, du manque de sensibilité et de spécificité de ce dosage car l'acide formique est non seulement un produit du métabolisme endogène mais aussi du métabolisme du formol et de l'oxyde d'éthylène.

Ethanol

Le dosage de l'éthanol sanguin en cours ou en fin d'exposition a été proposé pour la surveillance biologique de l'exposition à ce solvant. Il n'est interprétable que si l'on connaît précisément l'absorption d'alcool d'origine alimentaire du sujet.

En milieu professionnel, ce dosage est d'une utilité limitée puisqu'une étude expérimentale réalisée sur un sujet volontaire exposé durant 3 heures à des vapeurs d'éthanol à la concentration de 1000 ppm, n'a pas montré la présence de quantités détectables de ce solvant dans le sang (moins de 2 mg/litre). Rappelons que le taux légal d'alcoolémie en France est actuellement de 0,50 g/l (circulation routière).

Isopropanol

Les dosages de l'acétone dans le sang et dans l'air expiré en fin de poste de travail ont été proposés pour la surveillance biologique de l'exposition à ce solvant. Les taux sanguins d'acétone, bien corrélés aux taux d'acétone de l'air expiré sont très influencés par toutes les situations où l'oxydation des acides gras est accrue (jeûne, consommation d'alcool, exercice prolongé, exposition au froid) mais aussi par certaines pathologies (diabète).

Le dosage de l'acétone dans les urines en fin de poste de travail a été proposé pour la surveillance biologique. Ce dosage est non spécifique car ce paramètre peut être retrouvé chez des sujets non exposés.

Le dosage de l'isopropanol dans le sang et dans les urines en fin de poste de travail a pu être proposé mais pour des expositions de l'ordre de 200 ppm (1/2 de la VLE), les concentrations sanguines étaient inférieures

au seuil de détection (1 mg/l). Ce dosage est donc d'une utilité limitée.

Le dosage de l'isopropanol dans l'air expiré apparaît bien corrélé à l'intensité de l'exposition de la journée et aux concentrations d'acétone dans le sang et dans l'air expiré. Pour une exposition à la VLE (400 ppm), les concentrations dans l'air expiré sont d'environ 200 ppm.

Butanol et isobutanol

Le dosage du butanol éliminé par l'urine peut être utilisé comme moyen de surveillance biologique de l'exposition à ce solvant, en hygiène industrielle (10).

L'isobutanol est rapidement métabolisé en aldéhyde puis en acide isobutyrique. D'autres métabolites comme l'acide isovalérique, l'aldéhyde et l'acide acétique sont également présents dans l'urine. Le dosage de l'isobutanol sanguin et urinaire, en fin de poste de travail, a été proposé pour la surveillance biologique de sujets exposés professionnellement à ce solvant, mais il existe peu de données dans la littérature (1).

Cas des glycols

La surveillance biologique de l'exposition aux glycols fait appel à la fois au dosage du solvant lui-même dans le sang et/ou de son principal métabolite urinaire : acide oxalique pour l'éthylène glycol et le diéthylène glycol, acides alcoxyacétiques pour les esters et éthers de l'EG.

Ethylène glycol et diéthylène glycol

Il existe une bonne corrélation entre la concentration en acide oxalique urinaire, en fin de poste et l'exposition mais ce dosage n'est pas spécifique car l'alimentation peut apporter des oxalates.

Les dosages sanguins de l'EG sont utiles lors d'intoxications aiguës. Ils ont été proposés pour la surveillance biologique de l'exposition professionnelle mais aucune valeur de référence n'a été précisée.

On peut éventuellement faire appel au dosage urinaire de l'EG, mais il y a très peu de données disponibles (11).

Les valeurs trouvées dans la population générale sont les suivantes :

- Acide oxalique urinaire : inférieur à 50 mg/g créatinine
- Ethylène glycol urinaire : inférieur à 1 µg/litre.

Éthers et esters de glycol

Le dosage des alkylglycols dans le sang, en fin de poste de travail, a été proposé. Peu de données sont disponibles sur le sujet.

Le dosage des acides alcoxyacétiques est beaucoup plus souvent réalisé. Ainsi la détermination de l'acide 2-méthoxyacétique en fin de poste et en début de semaine de travail, constitue un bon reflet de l'exposition au MG, durant la semaine précédente. C'est un paramètre spécifique et il existe une bonne corrélation avec l'exposition.

Il en est de même avec l'acide 2-éthoxyacétique pour l'exposition à l'EG. On a même proposé pour l'I B E une valeur guide utilisable en France : elle est de 100 mg/g de créatinine. Le résultat reste cependant difficile à interpréter car il dépend de la charge de travail, de la pénétration cutanée, de la consommation concomitante d'alcool qui diminue l'élimination urinaire du métabolite mesuré.

Enfin l'acide 2-butoxyacétique permet également de surveiller l'exposition au BG. Comme sa demi-vie d'élimination (4 à 6 heures) est beaucoup plus courte que celle de ses homologues inférieurs (77 heures pour l'acide 2-méthoxyacétique et 42 heures pour l'acide éthoxyacétique), ce paramètre biologique spécifique est le reflet de l'exposition du jour même au BG. Cependant, là encore, il existe des variations individuelles très importantes liées à une pathologie hépatique ou rénale, à l'alimentation, à l'exercice physique, la charge de travail, etc. Il n'y a pas de valeur guide utilisable actuellement en France.

Le dosage de l'acide D-glucarique urinaire est actuellement proposé pour la surveillance des sujets exposés professionnellement aux vapeurs de BG (12).

Récemment le dosage des glycosaminoglycanes et la mesure de l'activité de la β N-acétylglycosaminidase urinaire ont été recommandés pour la surveillance de l'exposition aux éthers et éthers de glycol (13).

Éther monométhyle du propylène glycol (MPG)

Les dosages du MPG dans le sang et les urines en fin de poste et en fin de semaine de travail ont été proposés. Leur utilité est discutable en raison de l'absence de corrélation significative entre les concentrations atmosphériques, sanguine et urinaire du MP (14).

Les méthodes modernes de détection des alcools, des glycols et de leurs métabolites dans le sang et/ou l'urine font essentiellement appel aux techniques chromatographiques :

- en phase gazeuse après éventuellement dérivatisation et détection par ionisation de flamme ou spectrométrie de masse;
- liquide haute performance, couplée à une détection ultra violette;
- ionique et détection par conductimétrie.

Conclusion

Si les alcools, excepté le méthanol, ne semblent pas poser trop de problèmes lors de l'exposition professionnelle à long terme, les éthers de glycol, en revanche, présentent un risque probable pour la santé reproductive de l'espèce humaine. Même si un certain nombre d'incertitudes subsistent encore, une politique de substitution des éthers de glycol toxiques par d'autres composés moins toxiques comme les dérivés du propylène glycol ou ceux de l'acide lactique, apparaît fortement souhaitable.

Remerciements

L'auteur tient à remercier le Docteur Anne DELEPINNE (I.N.R.S., Paris) pour sa précieuse collaboration dans la rédaction de cet article.

Références

1. Pilière F., Conso F. BIOTOX, Guide biotoxicologique pour les médecins du travail. ED 791. I.N.R.S., 30 Rue Olivier Noyer, 75680 Paris Cedex 14 (2^{ème} édition), 1997, 157p.
2. Conso F., Mignée C. Monoalcools autres que l'alcool éthylique. Encycl. Méd. Chir (Elsevier, Paris), Toxicologie-Pathologie Professionnelle 16-047-25, 1997, 9p.
3. Lauwerys R. Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles, Masson Ed (3^{ème} édition), 1990 ; 341-47.
4. Bismuth C. Toxicologie Clinique. Médecine-Sciences-Flammarion, Paris (4^{ème} édition), 1987, 850p.
5. Vincent R. Éthers de glycol : Matrice emplois-exposition. Cahiers de Notes Documentaires, I.N.R.S., 1996, N° 162, 5-17.
6. Cicoella A. Les éthers de glycol. État actuel des connaissances; Perspectives de recherche. Cahiers de Notes Documentaires, I.N.R.S., 1992, N° 148, 359-77.
7. Cicoella A. Évaluation des risques pour la reproduction liés aux éthers de glycol. Santé Publique, 1997, N°2, 157-183.
8. Arashidani K., Kawamoto T., Kodama Y. Induction of sister-chromatid exchange by ethylene glycol monomethylether and its metabolite. Ind. Health, 1998 ; 36(1) : 27-31.
9. Falcy M. Symposium international sur les risques pour la santé liés aux éthers de glycol. Pont-à-Mousson, 19-21 avril 1994. Documents pour le médecin du travail, I.N.R.S., 1994, N° 59, 295-97.
10. Kawai T., Okada Y., Odachi T., Horiguchi S., Zhang Z. W., Moon C. S., Furuki K., Ukai H., Inui S., Ikeda M. Monitoring of occupational exposure to 1-butanol by diffusive sampling and urinalysis. Int. Arch. Occup. Environ. Health, 1997 ; 69(4) : 266-72.
11. Gerin M., Patrice S., Begin D., Goldberg M. S., Vyskocil A., Adib G., Drolet D., Vian C. A study of ethylene glycol exposure and kidney function of aircraft de-icing workers. Int. Arch. Occup. Environ. Health, 1997 ; 69(4) : 255-65.
12. Collinot J. P., Collinot J. C., Deschamps F., Decolin D., Siest G., Galteau M.M. Evaluation of urinary D-glucaric acid excretion in workers exposed to butyl glycol. J. Toxicol. Environ. Health, 1996 ; 48(4) : 349-58.
13. Laitinen J., Liesivuori J., Savolainen H. Exposure to glycols and their renal effects in motor servicing workers. Occup. Med.(Lond), 1995 ; 45(5) : 259-62.
14. Laitinen J., Liesivuori J., Savolainen H. Biological monitoring of occupational exposure to 1-methoxy-2-propanol. J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., 1997 ; 694(1) : 93-8.

Rôle du laboratoire dans les intoxications aiguës par un alcool ou un glycol

The laboratory and the management of alcohol and glycol acute poisonings

H. MALANDAIN, Y. CANO

Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier P. Chubert - 56017 VANNES

RÉSUMÉ

Une enquête récente auprès des hôpitaux français a montré que peu de laboratoires étaient en mesure de confirmer en urgence une intoxication par le méthanol ou l'éthylène glycol. Des critères indirects sont souvent utilisés lorsque les dosages de ces molécules ne sont pas effectués : trou anionique, trou osmolaire, cristallurie,... Ces critères manquent de sensibilité et de spécificité. Ils devraient être abandonnés car des techniques de dosage, adaptables par tout laboratoire, sont à présent disponibles, y compris pour la mesure de métabolites comme l'acide formique ou l'acide glycolique. De plus, le rôle du laboratoire ne doit plus se résumer au seul dosage de l'alcool ou du glycol suspecté : une approche plus globale, intégrant la mesure systématique des métabolites, permet d'affiner le diagnostic, d'expliquer (et suivre) l'éventuelle acidose métabolique et donne au clinicien des critères quantitatifs indispensables à ses options thérapeutiques.

MOTS-CLÉS

Alcools, glycols, intoxication aiguë, diagnostic, acidose métabolique, méthanol, éthylène glycol, acide formique, acide glycolique, trou anionique, trou osmolaire.

SUMMARY

A national survey recently disclosed that few laboratories in French hospitals were able to confirm a methanol or ethylene glycol poisoning on an emergency basis. Where quantitative measurements are unavailable indirect criteria are often in use : anion gap, osmolal gap, crystalluria,... These criteria lack sensitivity and specificity. They should be abandoned owing to the development of new techniques allowing any laboratory to measure these molecules and their metabolites (e.g. formic acid, glycolic acid). In addition, laboratory function must not consist in only alcohol or glycol measurement : a more comprehensive approach, including metabolite measurement, can improve the diagnostic accuracy, account for (and follow) any metabolic acidosis, and give the quantitative data the physician needs to adapt therapy.

KEY-WORDS

Alcohols, glycols, poisoning, osmolal gap, anion gap, formic acid, glycolic acid.

Introduction

Par la multitude des produits professionnels et domestiques qui en contiennent, par la diversité de leurs molécules, par leur métabolisme commun au départ et par leurs conséquences physio-pathologiques en partie similaires, les alcools et les glycols sont un classique du diagnostic différentiel des acidoses métaboliques et des urgences toxiques. Les intoxications aiguës les plus courantes et les mieux décrites ont pour origine le méthanol et l'éthylène glycol.

Le rôle du laboratoire dans le diagnostic et la prise en charge de ces intoxications est l'objet de cet article qui se propose d'examiner successivement :

- 1- les capacités actuelles des laboratoires hospitaliers dans ce domaine de l'analyse toxicologique
- 2- l'intérêt et les limites des classiques critères indirects d'intoxication par un alcool ou un glycol
- 3- la valeur qu'aurait une démarche clinico-biologique mieux globalisée et intégrant le dosage des métabolites en plus de celui des produits parents

A titre d'exemple, une série de cas cliniques est exposée en fin de cet article afin de souligner l'intérêt de cette démarche globale.

Situation en France

Si le dosage de l'éthanol sanguin est pratiqué en routine dans tous les hôpitaux, qu'en est-il pour d'autres alcools ou glycols en France ?

Pour le savoir nous avons mené en février 1998 une enquête nationale centrée sur les deux molécules les plus fréquemment rencontrées et qui posait la question suivante: "Comment votre Laboratoire peut répondre en urgence à une suspicion d'intoxication aiguë par le méthanol ou par l'éthylène glycol (EG) ?".

Un peu plus de 40 % des 286 laboratoires interrogés ont répondu (Tableau 1). Les résultats méritent quelques commentaires :

- les laboratoires de toxicologie et/ou d'urgence, la plupart situés en C.H.U., sont pour la plupart en mesure de doser le méthanol (86 % d'entre eux) et l'EG (77 %) ; ce qui n'est pas le cas des laboratoires de biochimie ou polyvalents (16 % et 10 %, respectivement)
- ces dosages ne sont possibles 24h/24 que dans 74 % des cas pour le méthanol et dans 72 % des cas pour l'EG.
- le dosage d'un des métabolites (formiate, glycolate, oxalate) reste l'exception dans les hôpitaux français
- il est fréquemment fait appel à des critères indirects d'intoxication comme le trou anionique, le trou osmolaire et la cristallurie.

Une situation similaire est décrite aux Etats-Unis, au Canada et en Suède [1-3]. La gravité d'une intoxication par le méthanol ou l'EG impose cependant une décision fondée et rapide de l'urgentiste/réanimateur [1]: peut-il se satisfaire de critères indirects d'intoxication quand le dosage de l'alcool ou du glycol n'est pas possible ou trop long à obtenir ?

Intérêt et limites des critères indirects d'intoxication

La nécessité d'une attitude thérapeutique rapide et l'offre restreinte de nombreux laboratoires pour confirmer une intoxication aiguë par un alcool ou un glycol expliquent qu'il soit fait souvent appel à des critères diagnostics indirects, cliniques (contexte, signes vitaux, état neurologique,...) ou biologiques.

Tableau I : Résultat d'une enquête nationale sur la prise en charge d'une suspicion d'intoxication par le méthanol ou l'éthylène glycol en milieu hospitalier en 1998. Dosages disponibles (en urgence ou non) :

Laboratoire	Interrogés	Répondu	Méthanol	Formiate	Ethylène glycol	Glycolate	Oxalate sérique
Biochimie	159	56	12	1	8	2	6
Biochimie-Toxico	5	3	3		3		1
Polyvalent	74	33	2		1		
Pharmacologie	11	1					
Pharmacie	9	9	6	1	3	2	1
Urgences-réa	3	2	1		1		
Pharmaco-toxico	25	17	15	1	13	2	2
TOTAL	286	122	39 (32 %)	3 (2 %)	29 (24 %)	6 (5 %)	10 (8 %)

C'est le cas des bilans biochimique et acido-basique dont les résultats peuvent être obtenus très vite.

Le trou anionique est déduit de l'ionogramme sanguin. Un trou anionique augmenté peut orienter vers des hypothèses toxiques (méthanol, EG,...). Le trou osmolaire est utilisé aussi : augmenté, il étaye la piste d'une intoxication par un composé non ionique (méthanol, EG, isopropanol,...). Par ailleurs, la recherche d'une cristallurie ou l'observation d'une hypocalcémie sont souvent utilisés en faveur d'une intoxication par l'EG.

Bien que recommandés dans la plupart des ouvrages de biochimie ou de toxicologie, ces critères indirects sont loin d'être exempts de défauts. Et le développement récent de méthodes simples pour le dosage du méthanol, de glycols ou de leurs métabolites [4,5] pose la question de leur utilité.

Le trou anionique [6]

Du fait de l'électro-neutralité du plasma, il n'y a pas, dans la réalité, de "trou anionique", c'est-à-dire d'excédent de cations. Le trou anionique (TA) n'est donc qu'une rapide approximation servant à compléter l'interprétation du pH et des bicarbonates (HCO_3^-) :

$$\text{TA} = \text{Na}^+ - \text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$$

Les valeurs de référence diffèrent selon les techniques de dosage [7,8]. Elles se sont abaissées avec l'usage des électrodes "sélectives" au lieu de la photométrie de flamme [9]. La plage actuellement observée n'est plus de 10 à 18 mais plutôt de 4 à 12 [7,10]. Chaque laboratoire devrait établir ses propres normes [11].

Le trou osmolaire [12,13]

L'osmolalité est une grandeur physique liée au nombre des molécules ou ions présents, indépendamment de leur masse.

Le trou osmolaire (TO) représente l'écart entre l'osmolalité mesurée (OsmM) et l'osmolalité calculée (OsmC) :

$$\text{TO} = \text{OsmM} - \text{OsmC}$$

La mesure de l'osmolalité fait appel à un principe d'abaissement de température ; la technologie utilisant la pression de vapeur doit être évitée car elle est insensible aux composés volatils [14].

L'osmolalité est exprimée en milli-osmoles/kg d'eau plasmatique (mOsmol/kg). Elle n'est pas équivalente à l'osmolarité (mOsmol/l) et le terme français de "trou osmolaire" est, de ce point de vue, équivoque : les anglo-saxons parlent d'"osmolal gap", ce qui souligne mieux que l'on doit tenir compte de l'eau plasmatique dans l'osmolalité calculée.

Il existe de très nombreuses formules pour calculer OsmC [cf 15] : certaines cherchent surtout à être faciles

(ex. : $\text{OsmC} = 2\text{Na} + \text{urée} + \text{glucose}$) ; d'autres veulent traduire au mieux la réalité in vivo et ont été déduites d'études sur des populations de sujets. Par exemple :

- formule de Dorwart et Chalmers :

$$\text{OsmC} = 1,86\text{Na} + \text{urée} + \text{glucose} + 9$$

- formule de Bhagat :

$$\text{OsmC} = 1,89\text{Na} + 1,38\text{K} + 1,03 \text{urée} + 1,08 \text{glucose} + 7,45$$

Les valeurs de référence du trou osmolaire sont différentes selon les auteurs et les formules [11,12,16]. Une valeur maximale de 10 mOsmol/kg est souvent employée mais rarement justifiée. Chaque laboratoire devrait établir ses propres normes avec son propre appareillage d'analyse [8,16].

Variations des trous anionique et osmolaire

Le tableau 2 donne un aperçu des principales causes de variation du TA et du TO.

Plusieurs constatations :

- malgré la richesse de la pharmacopée, un nombre infime de molécules dépasse 1 mmol/l dans le plasma : carbénicilline, éthosuximide, ibuprofène, isoniazide, méprobamate, paracétamol, paraldéhyde, phénacétine, tolbutamide et valproate. Seul l'isoniazide pourrait affecter légèrement le TO. Le cas des produits comme le mannitol, le sorbitol ou le diatrizoate est à part car leur présence est normalement connue du médecin. Seul le mannitol peut créer un TO très significatif.

- Les élévations de TA et de TO sont assez souvent dissociées, le TA se creusant à mesure que le TO se normalise

- Il est difficile d'apprécier un TA ou un TO diminué. Cependant, un TA négatif avec hyperchlorémie fait suspecter une interférence par un halogène, l'iode [17] et surtout le brome [18,19].

Les limites d'interprétation des trous anionique et osmolaire

Le trou anionique

- Le TA a une faible sensibilité diagnostique car la plage des valeurs de référence est trop grande. Une acidose lactique non négligeable (5 mmol/l) passera inaperçue si la valeur basale du TA pour ce patient est à 5 ou 7 [20].

- Le résultat du TA est, par nature, multifactoriel : une acidose métabolique pure est rarement rencontrée (chute d' HCO_3^- = élévation du TA) et beaucoup de situations complexes tendent à normaliser le TA [21] (cf. Tableau 2) :

• Acidose hyperchlorémique superposée : diarrhées, dérivations urétérales, acétazolamide, néphrotoxicité tubulaire,...

Tableau II : Principales causes de modification du trou anionique et du trou osmolaire.
 Les augmentations du trou osmolaire sont proportionnelles au grisé dans les cadres.

		TROU ANIONIQUE				
		abaissé	normal bas	normal haut	élevé	
I N T O X I C A T I O N S				au début ou si éthanol	METHANOL	après qqs h (acide formique)
					ETHANOL	
				au début	ACIDO-CETOSE ALCOOLIQUE	si hypovolémie
					ISOPROPANOL / ACETONE	
				au début ou si éthanol	ETHYLENE GLYCOL	après qqs h (acide glycolique)
					PROPYLENE GLYCOL METHYL/ETHYL/BUTYL GLYCOL DIETHYLENE GLYCOL	-----> (ac. lactique) -----> (ac. alcoxy-acétique)
				au début (alc. resp) -----SALICYLES ----- par la suite		
BROME, IODE (pseudo-hyper Cl)		LITHIUM		TOLUENE	FORMALDEHDE	
			Ether éthylique		Intox. Fe ³⁺ , intoxic. PO ₄ PARALDEHYDE (acétate) ACIDE FORMIQUE Acide oxalique Acide fluorhydrique Acide monochloracétique	
C O N T E X T E				HbCO VALPROATE	CYANURE(et nitriles) METFORMINE	
				ISONIAZIDE		
				si <10 ----- ACIDOSES LACTIQUES ----- si >10 (choc, convulsions, hypoxies, infections,...)		
T H E R A P E U T I Q U E		Expansion volémique Hémodilution	Acétazolamide Arginine, HCl	Lactate, Na Citrate, Na Acétate, Na	(transitoire)	
		Polymyxine	Sulfate de Mg	Carbenicilline IV Transfusions		
			DIATRIZOATE			
			SORBITOL GLYCEROL			
P A T H O L O G I E S			Acidose tubulaire	Rhabdomyolyse		
		HYPO-ALBUMINEMIE	Insuff. polyorganique		ACIDOSE D-LACTIQUE	
		Hypercalcémie Hyperkaliémie		----- INSUFFISANCE RENALE CHRONIQUE -----		-----si < 10 ml/min
			Volémie conservée ou corrigée	ACIDO-CETOSE DIABETIQUE		hypovolémie ou GFR bas
			HYPERLIPEMIE (pseudo-hypo Na + glycérol)			
		HYPERPROTEINEMIE(pseudo-hypo Na) IgA ou IgM			IgG	

- Alcalose respiratoire : hyperpnée des salicylés ou de l'acido-cétose alcoolique, par exemple
- Alcalose métabolique : vomissements, alcalinisation thérapeutique
- HCO_3^- n'est pas le seul tampon d'une charge acide : selon le délai et le sujet, il peut y avoir un "obscurcissement" du TA par l'apport des tampons cellulaire et osseux
- De nombreuses observations d'acido-cétose avec TA normal ont montré que l'hydratation et le maintien de la fonction rénale jouaient un rôle important : ainsi, tant chez le diabétique que l'alcoolique, les cétoacides ne s'accumulent que si la volémie chute, empêchant leur échange rénal avec un Cl^-
- Cette complexité est, enfin, soulignée par la difficulté d'expliquer parfois le TA malgré le dosage extensif des anions (iso-tachophorèse, GC-MS) [22]

- Un TA normal n'exclut pas une intoxication grave (ex. méthanol ou EG), soit parce qu'elle est récente, les métabolites acides étant encore en quantité faibles, soit parce que le métabolisme est retardé par la présence simultanée d'éthanol [23,24].

Au total, un TA très anormal (négatif ou >25) peut servir d'alerte. Mais dans la plupart des situations où une intoxication est suspectée, le TA peut être trompeur [25,26]. Il n'économise pas la mise en œuvre des dosages du toxique et de son métabolite.

Le trou osmolaire

- Le TO manque de sensibilité :

- Les valeurs de référence sont trop larges et, comme pour le TA, une intoxication grave peut rester inaperçue [27-29] : par exemple, 0,5 g/l d'EG fait passer à +10 un TO basal à +2 mOsmol/kg. Près de la moitié des sujets avec une alcoolisation légère (éthanolémie jusqu'à 12 mmol/l) ont un TO normal [30]
- A mesure que la masse moléculaire s'élève, il faut une concentration de plus en plus forte de l'intoxicant pour le même écart de TO [31] (figure 1) ; même le méthanol est en concentration toxique avant d'élever le TO de 10 mOsmol/kg [32].
- Le métabolisme convertit les alcools et glycols en composés ionisés qui n'affectent pas le TO : selon le délai de prise en charge de l'intoxication, le TO pourra être normal ou non [15]. Pour un malade vu tardivement, le diagnostic nécessite la mesure d'un métabolite : le formiate pour le méthanol, le glycolate ou l'oxalate pour l'EG, etc..

- Le TO est imprécis :

- Il n'y a pas de bonne formule pour le calcul du TO : les études comparatives ont abouti à des résultats contradictoires [16,33,34]

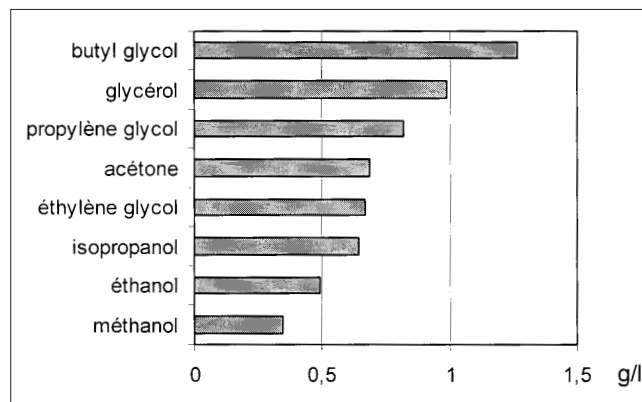


Figure 1 : Influence de la masse moléculaire sur le trou osmolaire : concentrations (théoriques) pour correspondre à une dérive de 10 mOsmol/kg.

- le TO cumule les CV analytiques de ses composants et a une imprécision proche de 10 % [11]
 - la relation théorique entre la concentration d'un toxique et le creusement du TO n'est pas toujours confirmée sur des échantillons de patients : la pente de $\text{TO} = f(\text{Toxique})$ est plutôt de 0,8 pour méthanol et EG [35] mais de 1,1-1,2 pour l'éthanol [36-38] ; et les corrélations sont médiocres [32,38-40], un même TO de 50 mOsmol/kg pouvant correspondre à 2 ± 1 g/l d'éthanol, par exemple [34]
 - le TO souffre d'insuffisances méthodologiques : comme pour le TA, le TO reste souvent inexplicable malgré une étude approfondie : on parle alors d'"excès de TO". De tels cas ont été décrits dans le cadre d'une acido-lactique [41] ou d'une acido-cétose diabétique ou alcoolique [41-44], d'une intoxication par le méthanol ou l'EG, ainsi que dans les syndromes polyorganiques [45,46] : mais ces excès de TO ont aussi été contestés, par la suite [46-48], montrant là les limites du concept. L'inclusion dans le calcul du TO d'un composé ionisé (le glycolate) a même été publiée pour pouvoir expliquer les TO observés ! [49].
 - le TO manque de clarté :
 - du fait de toutes ces imprécisions, un TO non expliqué par l'éthanolémie du patient répond difficilement à la question: y a-t-il ou non un autre composé ?
 - malgré le peu de molécules exogènes augmentant le TO, une attitude thérapeutique unique ne peut être décidée en présence d'un résultat élevé : l'éthanol, l'isopropanol, ou le propylène glycol ne nécessitent pas les mesures qui s'imposent en présence de méthanol ou d'EG. Seul le dosage de l'intoxicant peut guider la thérapie.
- Au total : l'usage du TO est contestable dans le cadre des urgences toxicologiques [26,29,50]. Et même si la

mesure de l'osmolalité est simple, un osmomètre n'est pas disponible dans tous les laboratoires.

Cristallurie [51]

La présence de cristaux d'oxalate de calcium (OxCa) dans l'urine est classiquement citée comme critère d'intoxication aiguë par l'EG [28,52,53,...]. La cristallisation a pour origine la synthèse d'ions oxalate à partir de l'EG, la liaison de ceux-ci avec les ions Ca^{++} et, finalement, le dépassement de la solubilité de l'OxCa formé avec précipitation de formations cristallines qui sont retrouvées dans divers organes dont les reins.

Tant qu'une anurie n'est pas apparue, il peut être recherché la présence de ces cristaux dans un échantillon urinaire. Cet examen nécessite la microscopie en lumière polarisée et requiert une formation simple mais néanmoins spécifique [54].

La cristallurie d'OxCa rencontrée dans l'intoxication par l'EG se distingue de celle vue chez les lithiasiques: le rapport des concentrations ambiantes en oxalate et en Ca^{++} est très élevé et favorise la formation de cristaux d'OxCa monohydraté (whewellite) plutôt que d'OxCa dihydraté (weddellite: figure 2a). Il est même si élevé par l'apport massif d'oxalate que la cristallisation prend une forme particulière (figure 2b), différente des cristaux vus chez le lithiasique (figure 2c). Ces cristaux sont de la whewellite [55,56] bien qu'ils ressemblent à ceux d'acide hippurique. Au cours du phénomène de cristallisation, les formes évoluent et des cristaux de weddellite peuvent être rencontrés au tout début de l'intoxication concurremment avec ceux de whewellite [27,57].

Si la cristallurie est un bon élément d'appréciation des lithiases urinaires, son utilisation comme critère d'une intoxication par l'EG est sujette à de nombreuses critiques:

- méconnaissance des formes cristallines: confusion avec l'acide urique (matériel souvent inadapté); cristaux qui sont en fait de banals cristaux de weddellite [58]; confusion avec l'acide hippurique [59,60]; impasse sur les cristaux normaux de whewellite dans la littérature [28,52]

- la cristallurie est absente dans 50 % des cas, notamment au moment de l'admission [27,51,61]

- une cristallurie d'OxCa peut aussi être rencontrée après des apports importants en oxalate d'origine alimentaire ou vitaminique [62,63]

- le recueil des urines est souvent perturbé (oligo-anurie) et l'irrigation vésicale [64] est peu recommandable.

Par ailleurs, la cristallurie ne renseigne en rien sur la gravité de l'intoxication et le rôle pathogénique des

Figure 2 : Cristaux d'oxalate de calcium.

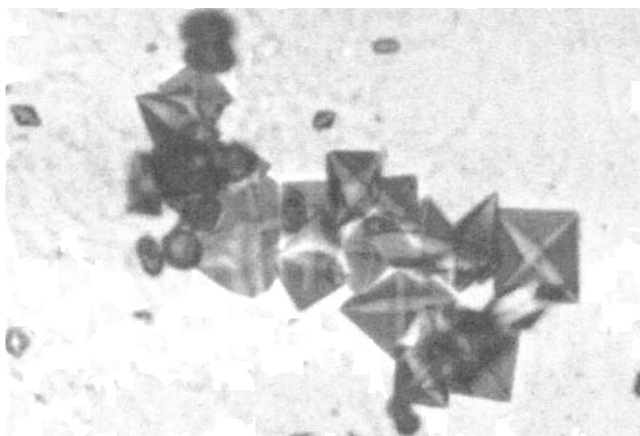


Figure 2a : Cristaux de weddellite (oxalate de calcium dihydraté).

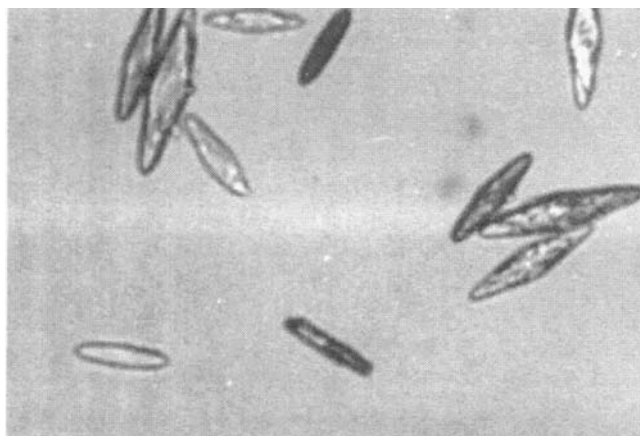


Figure 2b : Intoxication par l'éthylène glycol : cristaux de whewellite (oxalate de calcium monohydraté).

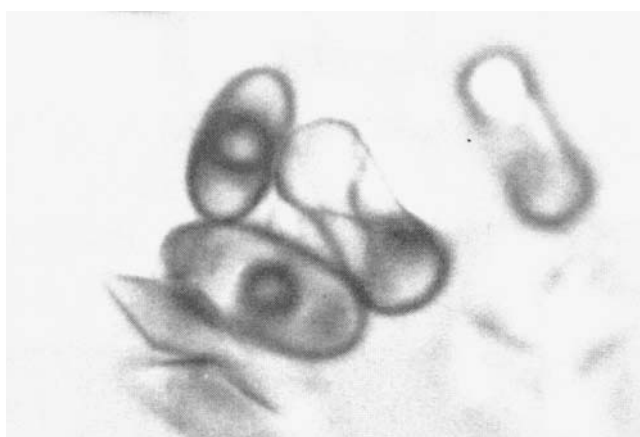


Figure 2c : Cristaux de whewellite (oxalate de calcium monohydraté).

cristaux d'OxCa dans l'atteinte rénale est mineur en regard de l'effet propre de l'acidose glycolique sur le néphron [9].

Autres critères

La liaison intra-vasculaire du Ca⁺⁺ avec les ions oxalates contribue à empêcher la réabsorption tubulaire de calcium et provoque une tendance à l'hypocalcémie. Cette baisse de la calcémie a été rapportée par de nombreux auteurs comme un critère supplémentaire en faveur d'une intoxication par l'EG. Cependant, l'hypocalcémie est très inconstante. Ceci s'explique aisément par la disparité entre la faible variabilité intra-individuelle et la forte dispersion inter-individuelle de la calcémie [65] : les valeurs "de référence", trop larges, rendent très incertaine l'observation d'une franche hypocalcémie.

La détection d'une fluorescence lors de l'observation des urines sous lumière UV ("lampe de Wood") est enfin classiquement citée comme critère d'intoxication par un antigel [9] : certains antigels contiennent parfois de la fluorescéine pour mieux repérer des fuites dans les circuits où ils sont utilisés. Cet indice est, bien sûr, très inconstant.

L'utilisation des critères indirects

La place des trous anionique et osmolaire devrait être réduite à un appoint et seulement en cas de franche anomalie. Il faut particulièrement veiller à ne pas utiliser ces indices comme critère d'exclusion d'une intoxication ; la même remarque pouvant être faite pour la cristallurie et l'hypocalcémie dans le cadre d'une suspicion d'intoxication par l'EG.

Afin de porter un diagnostic précis et d'être en mesure d'évaluer l'intoxication il est indispensable de doser l'alcool ou le glycol suspecté ainsi que son métabolite principal [66].

Approche globale de l'intoxication :

Selon les techniques disponibles (24h/24) dans les laboratoires, le clinicien verra ses questions plus ou moins bien résolues : y a-t-il intoxication ? par quel produit ? est-elle récente ? est-elle sévère ?

Lorsque les critères indirects sont ses seuls indices, il lui restera à fonder son diagnostic sur une suspicion et son traitement sur une hypothèse...

Cependant, quand des dosages précis sont possibles mais réalisés dans des laboratoires distincts, de toxicologie et de biochimie par exemple, il est à craindre qu'une approche biologique globale fasse défaut et retarde (voire empêche) un diagnostic et/ou un traitement corrects : la figure 3 schématise la démarche de l'urgentiste/réanimateur en fonction des données qu'il possède et les questions non résolues faute d'une approche biologique globale.

Il est clair que ces questions en suspens trouveraient leurs réponses dans une démarche plus complète (ou mieux coordonnée entre laboratoires) :

- dosage du métabolite toxique principal (même sans acidose avérée)

- recherche étiologique de l'acidose métabolique éventuelle : acidose lactique, acido-cétose alcoolique, acidose mixte (toxique et lactique), etc..

- toxicocinétique du produit parent et des métabolites, notamment en présence d'éthanol

Doser les métabolites

Il est maintenant bien établi que le dosage des métabolites est important, tant pour le diagnostic que pour la conduite thérapeutique ou le pronostic. L'acide glycolique et l'acide formique ont été les plus étudiés :

- les taux sériques de glycolate ou formiate sont à l'origine du creusement du trou anionique [67-69]

- ils évaluent mieux la sévérité de l'intoxication que le méthanol ou l'EG [62,69-72] et, en plus du coma et des convulsions [2,73] font partie des éléments du pronostic

- leur mesure est justifiée par le métabolisme rapide des produits parents de sorte que des taux encore faibles mais déjà toxiques (ex. : 5 mmol/l de formiate) n'altèrent pas significativement le trou anionique [27,74]

A moins de pouvoir quantifier dans le même temps les divers métabolites (ex. : HPLC, électrophorèse capillaire,...), il est préférable de doser le métabolite le plus significatif : ainsi, dans l'intoxication par l'EG il vaut mieux mesurer le glycolate que l'oxalate :

- l'oxalémie n'explique pas l'acidose et est plus difficile à doser en urgence

- c'est le glycolate et/ou l'acidose qu'il provoque qui est la cause principale de l'atteinte rénale [9]

Documenter l'acidose métabolique

Toute acidose métabolique devrait être explorée : le dosage des métabolites doit inclure au minimum le glycolate et/ou le formiate ; si cela ne suffit pas pour expliquer le trou anionique, il faut rechercher une acidose lactique ou une cétose (acides acéto-acétique et béta hydroxy-butyrique), etc... Un trou anionique resté ainsi en grande partie inexplicé peut orienter vers une

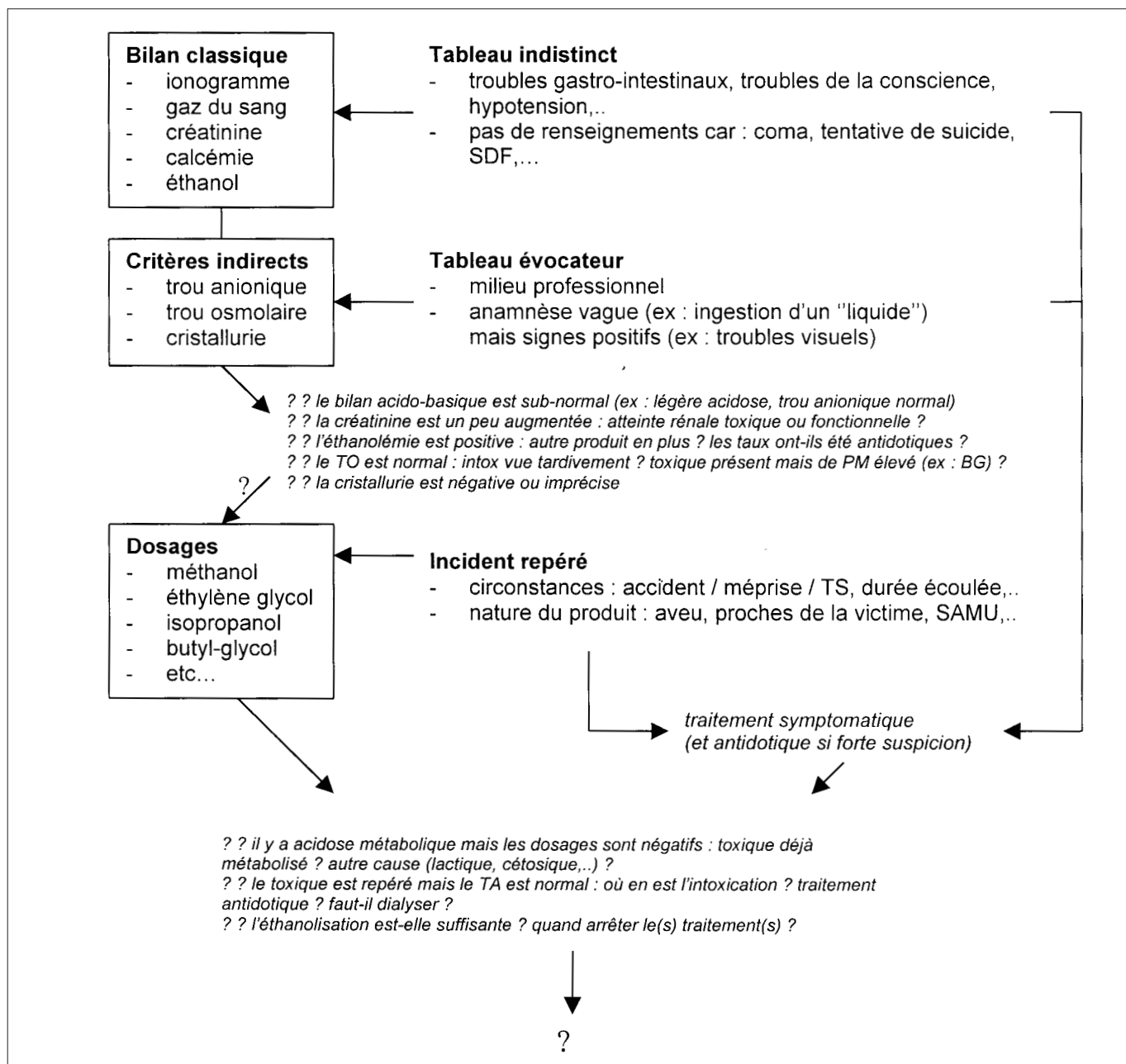


Figure 3 : Démarche diagnostique classique : questions restant posées faute d'une approche globale.

intoxication par un éther de glycol et l'accumulation d'acide alcoxy-acétique, etc... (Tableau 2)

En cas d'acidose lactique isolée une intoxication par le propylène glycol peut être envisagée sur des critères anamnestiques précis (ex. : origine iatrogène [75]) car les causes d'acidose lactique sont très variées. A noter que dans les intoxications par le méthanol ou l'EG, l'acidose lactique éventuellement surajoutée a une origine secondaire (ex. : hypoperfusion) [68,71,76].

L'exploration de l'acidose métabolique permet d'éviter des erreurs :

- de diagnostic: intoxication double [77], intoxication

par le formol [78] ou l'acide formique [79], "pseudo-intoxication" dans l'acido-cétoose alcoolique [80],...

- de thérapeutique [81]

Intégrer les paramètres cinétiques [82]

Selon le délai entre l'intoxication et l'admission à l'hôpital les concentrations du produit parent et des métabolites vont évoluer en sens inverse. L'ingestion d'éthanol modifie le métabolisme des alcools (sauf l'isopropanol) et des glycols et dérivés. Il est donc indispensable d'établir une vue intégrative de la situation. Par exemple :

- concentrations très élevées de méthanol mais pas d'acidose [83] : suivre l'efficacité de la thérapeutique en dosant aussi l'acide formique régulièrement
- le taux d'éthanol observé à l'admission a-t-il été antidotique ? : L'absence de trou anionique [23,24,84-86] ne permet pas de conclure : il faudra doser un métabolite pour s'en assurer, suivre l'éthanolémie pour décider de l'opportunité d'un traitement
- l'absence de trou anionique peut aussi inciter à chercher une autre cause : exemple présence de bromure [87]
- la mesure des concentrations du produit parent et du métabolite principal permet d'opter pour le recours à la dialyse et ces dosages doivent être poursuivis afin de pouvoir décider de l'efficacité et de la fin du traitement
- le suivi biologique doit intégrer les phénomènes intercurrents comme une crise convulsive ou un choc circulatoire (acide lactique),...
etc...

Conclusion

Le rôle du laboratoire dans la prise en charge d'une intoxication par un alcool ou un glycol ne doit plus se borner à fournir au clinicien des données imprécises, comme le trou osmolaire, ou incomplètes, comme le seul dosage du produit parent : tant au moment du diagnostic que pendant tout le suivi thérapeutique du patient, le laboratoire doit mettre en œuvre tous les moyens dont il dispose pour documenter les paramètres acido-basiques et cinétiques de l'intoxication. Le dosage des métabolites acides des alcools et glycols est, de ce fait, incontournable [66] et doit s'intégrer dans une démarche globale de collaboration entre l'analyste et le clinicien. Des techniques, chromatographiques ou non, sont à présent disponibles pour atteindre ce but [4,5]. Il est probable que leur diffusion, tout en améliorant la prise en charge des intoxications actuellement repérées, permettra de mieux cerner l'importance et la prévalence d'autres intoxications jusqu'alors peut-être sous-évaluées, comme celles dues à l'isopropanol ou aux éthers de glycol.

Cas Cliniques

Les descriptions qui suivent ont été inspirées par des cas réels décrits dans la littérature médicale.

On admettra que les valeurs de référence sont : T.A. (trou anionique) = 3 à 12 mEq/l (ou mmol/l)

T.O. (trou osmolaire) < 10 mOsmol/kg

Cristaux : détection de la cristallurie sur échantillon frais (microscopie avec polarisation)

Unités : mmHg (pCO₂), mmol/l (HCO₃⁻, Na⁺, Cl⁻), g/l (éthanol)

Cas n°1

Un adolescent de 17 ans est retrouvé léthargique à côté d'un bidon bricolé pour "sniffer". A l'admission, l'examen clinique est sans particularités. Le labo renvoie :

pH	PCO ₂	HCO ₃ ⁻	T.A.	T.O.	Ethanol		Cristaux	HbCO
7,36	33	18	12		<0,1		"allongés"	3 %

Quelle suspicion toxique ?

Quel(s) dosage(s) serai(en)t utile(s) ?

Quelle thérapeutique par défaut ?

Cas n°2

Dans un but suicidaire, un homme de 40 ans avale une quantité inconnue d'un liquide antigél. Son geste est découvert rapidement et il est admis aux urgences une heure plus tard. Il refuse de coopérer et le lavage gastrique ramène un liquide qui fluoresce sous lampe de Wood. Une éthanolisation est mise en place.

A +4h, la biologie est la suivante :

pH	PCO ₂	HCO ₃ ⁻	T.A.	T.O.	Ethanol		Cristaux	
7,39	40	22	8		1,1		non	

Faut-il dialyser le patient ?

Quel(s) dosage(s) serai(en)t utile(s) pour décider ?

Cas n°3

Un alcoolique chronique (Mr A) rentre à l'hôpital psychiatrique après une permission de sortie. Il rencontre un autre pensionnaire (Mr B) et lui passe une bouteille qu'il vient de boire en partie. Il se présente à la visite : l'état physique de Mr A incite le médecin à vérifier sa biologie :

pH	PCO2	HCO3-	T.A.	T.O.	Ethanol	Cétones		
		22	7	42	1,1	++		

Le lendemain, Mr B est trouvé nauséux, respirant avec difficulté. A l'admission dans le service de Médecine, il est trouvé :

pH	PCO2	HCO3-	T.A.	T.O.	Ethanol	Cétones		
6,96	18	2	29	12	<0,1	non		

*Comment expliquer les réactions différentes de Mr A et de Mr B ?
Quel(s) dosage(s) serai(en)t utile(s) ?*

Cas n°4

Une fillette de 2 mois, en bonne santé, est gardée par son cousin de 11 ans. Les parents reviennent peu après un biberon préparé et donné par le cousin et libèrent celui-ci. Leur fille devient irritable et vomit ; puis une léthargie avec hypotonie incite les parents à se rendre rapidement (moins d'une 1/2 h) à l'hôpital. L'examen physique ne révèle rien de particulier, hormis une haleine acétonique. La biologie : pas d'acidose, glycémie normale. L'alcoolémie donne un résultat peu probant (0,25 g/l). L'enfant est surveillée et hydratée. Pas de séquelles.

*Est-ce une intoxication ?
Quel(s) dosage(s) serai(en)t utile(s) ?*

Cas n°5

Un patient est admis avec une forte suspicion d'intoxication au méthanol. Il a des troubles visuels et une acidose sans cétose ni hyperlactatémie. Salicylés : négatif. Trou anionique = 13. Malgré un trou osmolaire normal, il est décidé de commencer une éthanolisation. Le résultat de la méthanolémie revient le lendemain matin : 2 g/l soit 64 mmol/l. Le patient est alors dialysé.

*Pourquoi un trou osmolaire normal ?
Quel(s) autres dosage(s) serai(en)t utile(s) ?*

Cas n°6

Un professeur de 52 ans, alcoolique connu, est admis après 24h de douleurs abdominales et vomissements. A la suite d'une fête où il a, dit-il, pas mal bu, il n'a plus d'appétit. A l'examen on note une tachypnée et un abdomen douloureux (pancréatite ?). La biologie confirme l'hépatopathie (bilirubine 62 μ mol/l, gGT 891 U/l) et montre :

pH	PCO2	HCO3-	T.A.	T.O.	Ethanol	Cétones		Glycémie
7,29	17	3	35		0,10	±		8,4 mmol/l

Le lactate est normal. Les salicylés aussi.

*Quel diagnostic est vraisemblable ?
Quel(s) autres dosage(s) serai(en)t utile(s) ?*

Cas n°7

Un homme de 34 ans est admis en état de choc avec une insuffisance respiratoire. Le patient, alcoolique connu, présente des lésions oro-pharyngées et, à l'endoscopie, une érosion bas oesophagienne et un estomac sanglant. Le bilan biologique revient avec une acidose métabolique marquée par un trou anionique à 23 mmol/l et une formatémie à 4,6 mmol/l. Pas d'autre anomalie pour expliquer l'acidose. Une dialyse est entreprise pour faire face à une insuffisance rénale profonde.

Quel diagnostic envisager pour cette intoxication ?

Cas n°8

Une femme de 57 ans est trouvée hébétée chez elle par un parent. Atteinte par une pathologie chronique (myélome à IgG), elle est dépressive depuis quelque temps. L'examen neurologique est sans particularité, de même que l'état général, hormis une certaine maigreur. Le bilan biologique signale des paramètres normaux plus une recherche positive de benzodiazépines et une alcoolémie à 2,56 g/l. Pour s'assurer de l'absence d'un intoxicant comme l'isopropanol ou le méthanol, l'interne demande une osmolalité plasmatique : celle-ci revient à 370 mOsmol/kg. La natrémie est à 135 mmol/l, l'urée à 4,7 mmol/l et la glycémie à 5,2 mmol/l. l'interne demande de surveiller l'alcoolémie et de le réveiller pour instaurer une éthanolisation de la patiente dès que le taux sera vers 1,5 g/l et si les corps cétoniques restent négatifs.

Quel trou osmolaire a trouvé l'interne ?

Qu'en a-t-il déduit ?

Quel(s) dosage(s) lui aurai(en)t permis de ne pas être réveillé par l'infirmière à 04h30 ?

Cas n°9

Une femme de 37 ans, SDF, est amenée par la police à 19h40 pour ivresse sur la voie publique. De fait, l'éthanolémie est téléphonée à 3,11 g/l par le labo. Gardée au service porte, elle est admise à quitter l'hôpital le lendemain matin au vu de son éthanol retombé à 0,45 g/l sur un prélèvement de 09h50.

Une autre équipe de police la retrouve prostrée, le même jour, à 18h. Réadmise aux urgences elle évoque des douleurs abdominales sévères. La biologie est la suivante :

pH	PCO2	HCO3-	T.A.	T.O.	Ethanol	Cétones		Lactate
7,30	33	18	12	8	<0,1	non		2,7 mmol/l

Un abdomen chirurgical est envisagé ; puis la patiente convulse plusieurs fois et reçoit du Valium* IV.

Un second bilan donne :

pH	PCO2	HCO3-	T.A.	T.O.	Ethanol		Cristaux	Lactate
7,06	29	3	29	25	<0,1		non	7,5 mmol/l

La méthanolémie est de 1,5 mmol/l (soit 45 mg/l). Dosage de l'éthylène glycol : possible le lendemain.

Que s'est-il passé ?

Quel(s) autres dosage(s) serai(en)t utile(s) ?

Cas n°10

Une femme de 42 ans est hospitalisée devant l'apparition d'un syndrome confusionnel. La patiente est connue pour sa personnalité fragile et a déjà consulté plusieurs fois les urgences. L'examen clinique montre une altération de l'état général, et des macules cutanées. Un bilan est fait :

pH	PCO2	HCO3-	T.A.	T.O.	Ethanol		Na+	Cl-
7,46	39	23	-18	5	<0,1		125	120

Pas de cause toxique détectée (psychotropes, lithium, alcool ou glycol, etc...)

L'interne conclut à une erreur de labo. Il demande un scanner.

Y a-t-il une autre hypothèse à envisager avant l'imagerie ?

Quel(s) autres dosage(s) serai(en)t utile(s) ?

Les réponses sont données à la fin de ce recueil.

Références

1. Church A.S., Witting M.D. Laboratory testing in ethanol, methanol, ethylene glycol, and isopropanol toxicities. *J. Emerg. Med.* 1997 ; 15 : 687-92
2. Hylander B., Kjellstrand C.M. Pronostic factors and treatment of severe ethylene glycol intoxication. *Intens. Care Med.* 1996 ; 22 : 546-52
3. Kearney J., Rees S., Chiang W. Availability of serum methanol and ethylene glycol levels : a national survey. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1997 ; 35 : 509
4. Esseyric H., Vincent F., Bessard G., Barret L. Les méthodes physiques de dosage des alcools et des glycols: avantages et inconvénients. *Journée Scientifique "Alcools et glycols"*, Paris, 8 décembre 1999, pp. ----
5. Malandain H., Cano Y. Place des techniques enzymatiques dans le diagnostic et le suivi des intoxications par un alcool ou un glycol. *Journée Scientifique "Alcools et glycols"*, Paris, 8 décembre 1999, pp. ----
6. Ishihara K., Szerlip H.M. Anion gap acidosis. *Semin. Nephrol.* 1998 ; 18 : 83-97
7. Roberts W.L., Johnson R.D. The serum anion gap: has the reference interval really fallen ? *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1997 ; 121 : 568-72
8. Roberts W.L., Paulson W.D. Method-specific reference intervals for serum anion gap and osmolality. *Clin. Chem.* 1998 ; 44 : 1582
9. Wine H., Savitt D., Abuelo G. Ethylene glycol intoxication. *Semin. Dialysis* 1994 ; 7 : 338-45
10. Winter S.D., Pearson J.R., Gabow P.A., Schultz A.L., Lepoff, R.B. The fall of the serum anion gap. *Arch. Intern. Med.* 1990 ; 150 : 311-3
11. Aabakken L., Johansen K.S., Rydningen E.B., Bredesen J.E., Ovrebo S., Jacobsen D. Osmolal and anion gaps in patients admitted to an emergency medical department. *Hum. Exp. Toxicol.* 1994 ; 13 : 131-4
12. Kruse J.A., Cadnapaphornchai P. The serum osmole gap. *J. Crit. Care* 1994 ; 9 : 185-97
13. Chabali R. Diagnostic use of anion and osmolal gaps in pediatric emergency medicine. *Pediatr. Emerg. Med.* 1997 ; 13 : 204-10
14. Walker J.A., Schwartzbard A., Krauss E.A., Sherman R.A., Eisinger R.P. The missing gap: a pitfall in the diagnosis of alcohol intoxication by osmometry. *Arch. Intern. Med.* 1986 ; 146 : 1843-4
15. Darchy B., Abruzzese L., Pitiot O., Figueredo B., Domart Y. Delayed admission for ethylene glycol poisoning: lack of elevated serum osmolal gap. *Intens. Care Med.* 1999 ; 25 : 859-61
16. Glaser D.S. Utility of the serum osmolal gap in the diagnosis of methanol or ethylene glycol ingestion. *Ann. Emerg. Med.* 1996 ; 27 : 343-6
17. Abdel-Wareth L.O., Lirenman D.S., Halstead A.C., McLellan D., Carleton B.C. Spurious rise in total carbon dioxide and chloride with negative anion gap after cystogram. *Pediatr. Nephrol.* 1995 ; 9 : 348-50
18. Vasuyattakul S., Lertpattanasuwan N., Vareesangthip K., Nimmannit S., Nilwarangkur S. A negative anion gap as a clue to diagnose bromide intoxication. *Nephron* 1995 ; 69 : 311-3
19. Bernaert P., Vogelaers D., Verstraete A., Lameire N. Hyperchloremia and a negative anion gap in a stuporous woman. *Acta Clin. Belg.* 1994 ; 49 : 36-41
20. Levraut J., Bounatirou T., Ichai C., Ciais J.F., Jambou P., Hechema R., Grimaud D. Reliability of anion gap as an indicator of blood lactate in critically ill patients. *Intens. Care Med.* 1997 ; 23 : 417-22
21. Sabatini S., Morris R., Kurtzman N., Newsom G. Severe metabolic acidosis in an intoxicated patient. *Am. J. Nephrol.* 1988 ; 8 : 323-33
22. Mecher C., Rackow E.C., Astiz M.E., Weil M.H. Unaccounted for anion in metabolic acidosis during severe sepsis in humans. *Crit. Care Med.* 1991 ; 19 : 705-11
23. Palmisano J., Gruver C., Adams N.D. Absence of anion gap metabolic acidosis in severe methanol poisoning. *Am. J. Kidney Dis.* 1987 ; 9 : 441-4
24. Ammar K.A., Heckerling P.S. Ethylene glycol poisoning with a normal anion gap caused by concurrent ethanol ingestion: importance of the osmolal gap. *Am. J. Kidney Dis.* 1996 ; 27 : 130-3
25. DiNubile M.J. The increment in the anion gap: overextension of a concept. *Lancet* 1988 ; 2 : 951-3
26. Goldfrank L. A perspective on the IPCS methanol and ethylene glycol document. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1997 ; 35 : 145-6
27. Jacobsen D., McMartin K.E. Antidotes for methanol and ethylene glycol poisoning. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1997 ; 35 : 127-43
28. Eder A.F., McGrath C.M., Dowdy Y.G., Tomaszewski J.E., Rosenberg F.M., Wilson R.B., Wolf B.A., Shaw L.M. Ethylene glycol poisoning: toxicokinetic and analytical factors affecting laboratory diagnosis. *Clin. Chem.* 1998 ; 44 : 168-77
29. Hoffman R.S., Smilkstein M.J., Howland M.A., Goldfrank L.R. Osmolal gaps revisited: normal values and limitations. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1993 ; 31 : 81-93
30. Demedts P., Wauters A., Daelemans R., Van Boeckel E., Neels H. Osmol gap vs. Residual osmolality or excess osmolal gap. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1994 ; 32 : 89-91

31. Browning R.G., Curry S.C. Effect of glycol ethers on plasma osmolality. *Hum. Exp. Toxicol.* 1992 ; 11 : 488-90
32. Lund M.E., Banner W. Jr, Finley P.R., Burnham L., Dye J.A. Effect of alcohols and selected solvents on serum osmolality measurements. . *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1983 ; 20 : 115-32
33. Osypiw J.C., Watson I.D., Gill G. What is the best formula for predicting osmolar gap ?. *Ann. Clin. Biochem.* 1997 ; 34 : 551-2
34. Osterloh J.D., Kelly T.J., Khayambashi H., Romeo R. Discrepancies in osmolal gaps and calculated alcohol concentrations. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1996 ; 120 : 637-41
35. Jacobsen D., Bredesen J.E., Eide I., Ostborg J. Anion and osmolal gaps in the diagnosis of methanol and ethylene glycol poisoning. . *Acta Med. Scand.* 1982 ; 212 : 17-20
36. Geller R.J., Spyker D.A., Herold D.A., Bruns D.E. Serum osmolal gap and ethanol concentration: a simple and accurate formula. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1986 ; 24 : 77-84
37. Pappas A., Gadsden R.H., Taylor E.H. Serum osmolality in acute intoxication: a prospective clinical study. *Am. J. Clin. Pathol.* 1985 ; 84 : 74-9
38. Galvan L.A. Generation of an osmolality gap-ethanol nomogram from routine laboratory data. *Ann. Emerg. Med.* 1992 ; 21 : 1343-8
39. Bhagat C.I., Beilby J.P., Garcia-Webb P., Dusci L.J. Errors in estimating ethanol concentration in plasma by using the osmolal gap. *Clin. Chem.* 1985 ; 31 : 647-8
40. Monaghan M.S., Ackerman B.H., Olsen K.M., Farmer C., Pappas A.A. The use of delta osmolality to predict serum isopropanol and acetone concentrations. *Pharmacotherapy* 1993 ; 13 : 60-3
41. Schelling J.R., Howard R.L., Winter S.D., Linas S.L. Increased osmolal gap in alcoholic ketoacidosis and lactic acidosis. *Ann. Intern. Med.* 1990 ; 113 : 580-2
42. Meatherhall R., Krahn J. Excess serum osmolality gap after ingestion of methanol. *Clin. Chem.* 1990 ; 36 : 2004-7
43. Braden G.L., Strayhorn C.H. Germain M.J., Mulhern J.G., Skutches C.L. Increased Osmolal Gap in Alcoholic Acidosis. *Arch. Intern. Med.* 1993 ; 153 : 2377-80
44. Almaghamsi A.M., Yeung C.K. Osmolal gap in alcoholic ketoacidosis.. *Clin. Nephrol.* 1997 ; 48 : 52-3
45. Inaba H., Hirasawa H., Mizugushi T. Serum osmolality gap in postoperative patients in intensive care. *Lancet* 1987 ; 1 : 1331-4
46. Le Gatt D.F., Audette R.J., Blackney G., Vaughan, D. Excess serum osmolality gap after ingestion of methanol: the exception, not the rule. *Clin. Chem.* 1991 ; 37 : 1802-3
47. Davidson D.F. Excess osmolal gap in diabetic ketoacidosis explained. *Clin. Chem.* 1992 ; 38 : 755-7
48. Demedts P., Theunis L., Wauters A., Franck F., Daelemans R., Neels H. Excess serum osmolality gap after ingestion of methanol : a methodology-associated phenomenon ?. *Clin. Chem.* 1994 ; 40 : 1587-90
49. Skinner S.L., Butch A.W., Porter W.H., Pappas A.A. Delta-osmolality in acute ethylene glycol intoxication. *Clin. Chem.* 1997 ; 43 : S208
50. Buckley N.A., Whyte I.M., Dawson A.H. Osmolal gap. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1994 ; 32 : 93-5
51. Fogazzi G.B. Crystalluria: a neglected aspect of urinary sediment analysis. . *Nephrol. Dial. Transplant.* 1996 ; 11 : 379-87
52. Ellenhorn M.J., Schonwald S., Ordog G., Wasserberger J., Ellenhorn S.S. Alcohols and glycols. in Elenhorn's medical toxicology: diagnosis and treatment of human poisoning, 2nd edition. Baltimore: Williams and Wilkins, 1997: 1127-65
53. Trummel J., Ford M., Austin P. Ingestion of an unknown alcohol. *Ann. Emerg. Med.* 1996 ; 27 : 368-74
54. Daudon M. Mécanismes de cristallisation dans l'urine. *Néphrologie* 1995 ; 16 : 313-5
55. Terlinsky A.S., Grochowski J., Geoly K.L., Stauch B.S., Hefter L. Identification of atypical calcium oxalate crystalluria following ethylene glycol ingestion. . *Am. J. Clin. Pathol.* 1981 ; 76 : 223-6
56. Jacobsen D., Akesson I., Shefter E. Urinary calcium oxalate monohydrate crystals in ethylene glycol poisoning. *Scand. J. Clin Lab. Invest.* 1982 ; 42 : 231-4
57. Jacobsen D., Hewlett T.P., Webb R., Brown S.T., Ordinario A.T., McMartin K.E. Ethylene glycol intoxication: evaluation of kinetics and crystalluria. *Am. J. Med.* 1988 ; 84 : 145-52
58. Anonymous A 36-year-old comatose woman exhibiting decerebrate posturing. *Chest* 1996 ; 109 : 557-8
59. Cadnapaphornchai P., Taher S., Bhathena D., McDonald F.D. Ethylene glycol poisoning: diagnosis based on high osmolal and anion gaps and crystalluria. . *Ann. Emerg. Med.* 1981 ; 10 : 94-7
60. Gabow P.A. Organic acids in ethylene glycol intoxication. *Ann. Intern. Med.* 1986 ; 105 : 16-20
61. Haupt M.C., Zull D.N., Adams S.L. Massive ethylene glycol poisoning without evidence of crystalluria: a case for early intervention. . *J. Emerg. Med.* 1988 ; 6 : 295-300
62. Burkhart K.K., Kulig K.W. The other alcohols: methanol, ethylene glycol, and isopropanol. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 1990 ; 8 : 913-28
63. Lawton J.M., Conway L.T., Crosson J.T., Smith C.L., Abraham P.A. Acute oxalate nephropathy after massive ascorbic acid administration. . *Arch. Intern. Med.* 1985 ; 145 : 950-1

64. Goodkin D.A. Ethylene glycol poisoning. *Am. J. Med.* 1990 ; 88 : 201
65. Fraser C.G. Biological variation in clinical chemistry: an update. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1992 ; 116 : 916-23
66. Capolaghi B., Charlier C., Feuillu A., Gruson A., Houdret N., Kergueris M.F., Lachâtre G., Lacroix C., Lamiable D., Plomteux G. Toxiques et analyses biologiques en toxicologie hospitalière. *Toxicorama* 1998 ; 10 : 128-31
67. Moreau C.L., Kerns W. 2nd, Tomaszewski C.A., McMartin K.E., Rose S.R. Ford M.D., Brent J. Glycolate kinetics and hemodialysis clearance in ethylene glycol poisoning. META Study Group.. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1998 ; 36 : 659-66
68. Jacobsen D., Ovrebo S., Ostborg J., Sejersted O.M. Glycolate causes the acidosis in ethylene glycol poisoning and is effectively removed by hemodialysis. *Acta Med. Scand.* 1984 ; 216 : 409-19
69. Fraser A.D., MacNeil W. Gas chromatographic analysis of methyl formate and application in methanol poisoning cases. *J. Anal. Toxicol.* 1989 ; 13 : 73-6
70. Hewlett T.P., McMartin K.E., Lauro A.J., Ragan F.A. Jr Ethylene glycol poisoning: the value of glycolic acid determinations for diagnosis and treatment. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1986 ; 24 : 389-402
71. Mahieu P., Hassoun A., Lauwerys R. Predictors of methanol intoxication with unfavorable outcome. *Hum. Toxicol.* 1989 ; 8 : 135-7
72. Osterloh J.D., Pond S.M., Grady S., Becker C.E. Serum formate concentration in methanol intoxication as a criterion for hemodialysis. *Ann. Intern. Med.* 1986 ; 104 : 200-3
73. Liu J.J., Daya M.R., Carrasquillo O., Kales S.N. Prognostic factors in patients with methanol poisoning.. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1998 ; 36 : 175-81
74. Fraser A.D. Importance of glycolic acid analysis in ethylene glycol poisoning. *Clin. Chem.* 1998 ; 44 : 1769-70
75. Malandain H., Cano Y. An enzymatic assay for the emergency diagnosis of propylene glycol intoxication. *Clin. Chem.* 1996 ; 42 : 213
76. Dominiczak M.H. Case of methanol poisoning. *Clin. Chem.* 1986 ; 32 : 1423
77. Arai H., Ikeda H., Ichiki M., Iino M., Kumai M., Ikeda M. A case of poisoning by a mixture of methanol and ethylene glycol. . *Tohoku J. Exp. Med.* 1983 ; 141 : 473-80
78. Jacques D., Bohe J., Thouret J.M., Berny C., Manchon M., Fournier G. Une cause rare de coma et d'acidose métabolique. *Toxicorama* 1997 ; 9 : 372
79. Chan T.C., Williams S.R., Clark R.F. Formic acid skin burns resulting in systemic toxicity. *Ann. Emerg. Med.* 1995 ; 26 : 383-6
80. Feeney C., Muller M., Bryzman S., Nakada T. Reversible blindness associated with alcoholic ketoacidosis: pseudomethanol intoxication.. *J. Emerg. Med.* 1998 ; 16 : 597-9
81. Yu F.C., Lin S.H., Lin Y.F., Lu K.C., Shyu W.C., Tsao W.L. Double gaps metabolic acidosis and bilateral basal ganglion lesions in methanol intoxication. *Am. J. Emerg. Med.* 1995 ; 13 : 369-71
82. Baud F.J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships: how are they useful in human toxicology ?. *Toxicol. Lett.* 1998 ; 102-103 : 643-8
83. Price E.A., d'Alessandro A., Kearney T., Olson K.R., Blanc P.D. Osmolar gap with minimal acidosis in combined methanol and methyl ethyl ketone ingestion. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1994 ; 32 : 79-84
84. Prabhakaran V., Ettler H., Mills A. Methanol poisoning: two cases with similar plasma methanol concentrations but different outcomes. *Can. Med. Assoc. J.* 1993 ; 148 : 981-4
85. Haviv YS., Rubinger D., Zamir E., Safadi R. Pseudo-normal osmolal and anion gaps following simultaneous ethanol and methanol ingestion.. *Am. J. Nephrol.* 1998 ; 18 : 436-8
86. Fox A.W. Combined ethanol and glycol poisoning. *Am. J. Kidney Dis.* 1996 ; 28 : 307
87. Heckerling P.S. Ethylene glycol poisoning with a normal anion gap due to occult bromide intoxication. *Ann. Emerg. Med.* 1987 ; 16 : 1384-6

Les méthodes physiques de dosage des alcools et des glycols : avantages et inconvénients

Physical methods for alcohols and glycols dosage : interests and draw-backs

H. EYSSERIC*, F. VINCENT, G. BESSARD, L. BARRET

Fédération de Toxicologie Clinique et Biologique, CHU de Grenoble - BP 217 - 38043 GRENOBLE Cedex 09

*Auteur à qui adresser la correspondance : Laboratoire de Médecine Légale, UFR de Médecine, Domaine de la Merci - 38700 LA TRONCHE - FRANCE - Tél : +33 04 76 63 71 07 - Fax : +33 04 76 63 74 23
e-mail : Helene.Eysseric@ujf-grenoble.fr

RÉSUMÉ

Une revue bibliographique relative aux méthodes physiques de dosage des alcools et glycols ainsi que de leurs métabolites, nous a permis de dégager quelques observations.

Celle-ci très abondante, traite principalement des chefs de file "éthanol et éthylène glycol".

Le sang demeure le prélèvement de choix, associé aux urines pour une confirmation ou une recherche de métabolites.

Le panel des méthodes proposées aux toxicologues est vaste, mais la chromatographie en phase gazeuse (CPG) reste largement prédominante. En ce qui concerne les alcools, il faut choisir entre une injection directe qui présente les avantages d'être rapide et économique pour de petites séries de dosages, et de nécessiter une faible prise d'essai, et une injection par espace de tête qui permet de mieux protéger la colonne et d'être automatisable en cas de grosses séries de dosages. L'analyse des glycols par CPG quant à elle, implique de privilégier la spécificité et d'être vigilant par rapport à plusieurs pièges associés tels que le choix du standard interne, de la technique de dérivatisation et du type de colonne.

En pratique, du fait du manque d'homogénéité des caractères physico-chimiques des molécules à doser, il semble difficile de trouver la méthode unique qui permettrait, sur un même échantillon, de doser le produit parent et ses métabolites. A fortiori il apparaît encore plus complexe de coupler sur un même système, l'analyse des deux familles de molécules alcools et glycols.

C'est la raison pour laquelle très peu de laboratoires, même spécialisés en toxicologie analytique, réalisent actuellement, en dépit de leurs intérêts diagnostique et thérapeutique, le dosage de ces métabolites.

MOTS-CLÉS

Alcools, glycols, analyse, méthodes physiques, chromatographie.

SUMMARY

A literature review related to physical methods for dosage of alcohols and glycols as well as their metabolites was conducted in our laboratory and led us to some observations.

The literature of this topic is very wide and is mainly related to the head lines "ethanol" and "ethylene-glycol".

Blood, together with urine for dosage confirmation or detection of metabolites, remain the main biological samples.

The panel of methods proposed to toxicologists is large, but Gas Chromatography (GC) appears amply predominant. With regards to alcohols, the choice is between :

- direct injection, which has the advantage of being fast and cheap for small dosage series, and of requiring only a small amount of analytical sample,

- Head Space injection which enables a better protection of the column and which can be automated in the case of large dosage series.

On the other hand, analysis of glycols using GC implies stressing on specificity and remaining careful towards several related pitfalls found in the selection of the internal standard, in the derivatization procedure or in the type of column to be used.

In practice, due to the lack of homogeneity in the physico-chemical properties of the molecules to be analysed, it appears difficult to find a single method which would enable the dosage of the parent product and of its metabolites, on the same sample. Furthermore, it seems even more difficult to couple the analysis of the two families of molecules : alcohols and glycols, in the same system.

This is the main reason why very few laboratories, even if specialised in analytical toxicology, actually perform the dosage of metabolites, despite their diagnostic and therapeutic interest.

KEY-WORDS

Alcohols, glycols, analysis, physical methods, CPG.

Introduction

En cas d'absorption accidentelle ou volontaire d'alcools ou de glycols, un diagnostic rapide et précis de la nature de l'intoxication, et par conséquent une prise en charge thérapeutique précoce de la personne intoxiquée augmentera considérablement ses chances de survie.

Pour confirmer ce diagnostic, le toxicologue dispose de divers moyens analytiques : méthodes enzymatiques, méthodes colorimétriques, chromatographiques, RMN...

Seules les méthodes physiques seront étudiées dans cet article.

Revue bibliographique de la littérature

Les méthodes publiées dans la littérature font référence à un répertoire très varié de molécules

- l'éthanol (1 - 17),
- l'acétaldéhyde (1, 2),
- le méthanol (1, 7, 8, 10, 12, 17 - 20),
- l'acide formique (18, 19, 21 - 23),
- l'isopropanol (7, 8, 10, 12, 17, 24, 25),
- le butanol 2 (12),
- le n propanol (12, 15),
- le tertiobutanol (15),
- l'éthylène glycol et/ou ses métabolites : l'acide glycolique, l'acide glyoxylique, l'acide oxalique (23, 26 - 52),
- les propylènes glycols (34, 35, 40, 46, 52, 53),
- les butylènes glycols et un de leur métabolite : l'acide butoxyacétique (27, 34, 35, 40, 52, 54 - 56),
- les éthers de glycols, leurs acétates et leurs métabolites : les acides alcoxy-acétiques (acide méthoxy, éthoxy, et butoxyacétique) (57, 58).

La grande majorité des publications concerne l'analyse de prélèvements sanguins que ce soient le sang total, le sérum ou le plasma ; mais certains auteurs s'intéressent également aux urines, aux fécès, à la salive, aux tissus, à l'humeur vitrée ou à la bile.

La méthode physique la plus couramment utilisée pour le dosage des alcools et des glycols est la chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Le mode d'injection dépend de la configuration du matériel et du type de colonne utilisée. L'injection directe s'applique aux colonnes remplies et aux colonnes macrobores, les modes split (avec un split

ratio variant entre 1:10 et 1:30) et splitless sont indifféremment utilisés lorsqu'on injecte dans une colonne capillaire. Le système d'espace de tête trouve de nombreuses applications pour le dosage des alcools du fait de la volatilité de ces molécules.

Les colonnes utilisées en CPG sont très variées, tant par leur diamètre intérieur (colonnes remplies, colonnes macrobores ou colonnes capillaires), que par la nature des phases choisies. Leur choix dépend de nombreux critères, tels que le temps d'analyse, le coût, la possibilité de doser plusieurs molécules sur la même colonne.

Ces différents paramètres sont largement évoqués pour les alcools dans la revue bibliographique de Tagliaro en 1992 (59) et par Deveaux dans le livre de Kintz (60).

Il faut signaler également les travaux très intéressants publiés par O Neal (4), qui compare deux colonnes dans le cadre de l'analyse de sang post-mortem en CPG couplée à l'espèce de tête et encore ceux de Livesey (7) qui, dans le cadre d'une analyse simultanée de différents alcools et de l'éthylène glycol, teste les performances de quatre phases très classiquement utilisées pour doser les alcools et glycols, de polarité très différente : une phase non polaire type diméthyl polysiloxane, deux phases moyennement polaires type 6 % cyanopropylphenyl / 94 % diméthyl polysiloxane ou 50 % trifluoropropyl / 50 % méthyl et enfin une phase très polaire type polyéthylène glycol. Les meilleurs résultats sont obtenus avec la troisième phase.

Enfin, dans le même domaine, avec comme objectif l'optimisation de la spécificité et la fiabilité des alcoolémies, Jones propose l'utilisation simultanée de 3 types de colonnes composées de 3 phases différentes : Carbowax B, Carbowax C et 15 % Carbowax 20 M (16).

Le Chromosorb 101 représente une excellente phase pour séparer les glycols : éthylène glycol, 1,2- et 1,3-propanediol et 2,3-butanediol. Par contre, les 2 isomères de position du propanediol sont coélus sur OV17, on peut les séparer sur OV1, mais dans ce cas c'est l'éthylène glycol qui présente le même temps de rétention que le 2,3-butanediol (43).

Les températures proposées pour le chauffage des injecteurs sont assez uniformes : 150° C correspond à la température la plus souvent décrite pour l'analyse des alcools avec des extrêmes allant de 125 à 220° C ; et dans le cas des glycols : 250° C pour de nombreux auteurs, avec des extrêmes allant de 220° C à 270° C.

La séparation des alcools est souvent réalisée en isotherme à relativement basse température entre 40 et 120° C (1, 2, 5, 6, 14, 21), ce procédé permet de réduire les temps d'analyse ; d'autres auteurs ont plutôt recours à

une programmation de température (3, 4, 7, 12).

La séparation des glycols nécessite des températures plus élevées, celles-ci dépendent entre autre de la volatilité des molécules à doser et des caractéristiques de la colonne utilisée, elle oscille entre 80 et 200° C ; les auteurs ont souvent recours à une double programmation de température avec purge de la colonne afin d'éviter tout piégeage des molécules au sein de celle-ci.

En CPG, le mode de détection le plus répandu est la détection par ionisation de flamme (CPG/FID), aussi bien pour les alcools que pour les glycols. Suivant les auteurs, la température du détecteur oscille entre 150 (T° C minimale pour les alcools) et 300° C (T° C maximale pour les glycols).

Plusieurs auteurs proposent une détection en spectrométrie de masse (CPG/SM). Les applications aux alcools restent peu nombreuses (3, 12) par rapport à celles décrites pour le dosage simultané des glycols et des acides organiques ; les deux modes d'ionisation sont cités, impact électronique (26, 28, 29, 33, 34, 45, 56, 57) ou ionisation chimique (34, 45, 55).

La chromatographie en phase liquide (CLHP) est rarement appliquée au dosage des alcools. Une publication fait référence à une détection par réfractométrie, malheureusement peu sensible (10) ; Tagliaro propose une détection électrochimique, après transformation enzymatique de la molécule (11, 20).

Ma Wu a publié une méthode CLHP couplée à un détecteur réfractométrique pour doser l'éthylène glycol et l'éthylène chlorhydrate dans du matériel stérilisé par l'oxyde d'éthylène (51).

Les glyoxylates peuvent être dosés dans le sérum par CLHP et détection UV, après prétraitement de l'échantillon, puis transformation en phényl-hydrazone (38, 48) ; ce même type de détection est utilisé par Volmer pour doser l'éthylène glycol sérique, après traitement par le chlorure de benzoyl en milieu basique puis extraction en phase solide (SPE) (30). Dans tous les cas la colonne choisie est une colonne C18.

La chromatographie ionique avec détecteur conductimétrique est proposée pour le dosage des oxalates et des glycolates (48, 49).

Ovrebø sépare les acides glycolique, glyoxylique, oxalique, et formique par **isotachophorèse** et détection conductimétrique (23).

Enfin la **Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)** constitue une méthode physique intéressante, mais encore peu répandue, pour l'analyse des alcools et des

glycols (8, 18, 19, 24, 47, 61, 62).

Avantages des méthodes physiques

La liste des molécules dosables est infinie, elle ne dépend pas de l'existence de réactifs commercialisés ou de l'affinité des divers alcools ou glycols vis à vis des enzymes utilisées.

Ces méthodes sont avant tout des **méthodes séparatives** : elles permettent de doser aussi bien les **produits parents** que leurs **produits de biotransformation**. L'identification et le dosage des métabolites présentent de nombreux avantages.

Aussi bien dans le cas du méthanol que de l'éthylène glycol, ce sont **les métabolites qui sont responsables de la toxicité**.

Leurs concentrations sont mieux corrélées aux effets cliniques et biologiques que celles des produits parents (31). Par contre, l'analyse des métabolites de l'éthanol tels que l'acétaldéhyde ou l'éthyl glucuronide ne présente pas d'intérêt diagnostique ou thérapeutique importants en situation d'exposition aiguë. En effet, même s'ils représentent soit un potentiel toxique (cas de l'acétaldéhyde) soit un intérêt dans la recherche de marqueurs de l'alcoolisme (cas de l'éthyl glucuronide) ces deux métabolites ne sont pas classiquement analysés dans le cadre de la toxicologie d'urgence.

Enfin, dans le cas d'une prise en charge tardive d'un patient, la recherche d'éthylène glycol dans le sang pourra être négative du fait de la courte demi-vie d'élimination de la molécule (3 heures). La **confirmation biologique** de l'intoxication ne pourra être **assurée que par l'analyse des métabolites** d'apparition retardée par rapport au début de l'intoxication : l'acide glycolique et l'acide glyoxylique (63).

Ce raisonnement peut également s'appliquer aux intoxications à l'isopropanol, où le métabolite formé, l'acétone présente une demi-vie plus longue que le produit parent.

Les méthodes physiques permettent très souvent de doser simultanément plusieurs molécules telles que des mélanges d'alcools et de glycols (7, 18, 19), de produits parents et de métabolites (27, 28, 31, 32), des séries d'alcools (1, 10, 12, 17), de glycols (34, 35, 40, 46, 52), ou d'acides organiques (23, 26, 38, 45, 48, 49, 57).

Certaines méthodes physiques sont rapides et faciles à mettre en œuvre, elles ne nécessitent **aucun prétraitement**.

C'est le cas de la **RMN** : l'échantillon plasmatique (0.5 ml) est placé directement dans un tube de RMN dans

lequel est introduit simplement un tube capillaire contenant une solution titrée de standard : le TSP-d4 (acide triméthyl 2,2',3,3'-tétradéutéropropionique) dans l'eau deutérée ; l'enregistrement des spectres est rapide (15 minutes environ) ; et autre avantage, l'échantillon n'est pas détruit (18, 19, 47).

Très récemment, Tangerman a appliqué une technique d'injection directe en CPG pour le dosage des alcools, sans aucun prétraitement des échantillons biologiques que ce soit du sang total, du sérum ou des urines (1). Il utilise un liner particulier rempli de billes de verre qui est changé toutes les 50 injections. Enfin quelques auteurs appliquent directement le principe de l'espace de tête à des échantillons biologiques "purs" (2, 5).

Le principe de **simple dilution** reste largement décrit dans la préparation des échantillons pour le dosage des alcools quel que soit le mode d'injection : direct (4), par espace de tête (12, 24) ou même en vue d'une séparation en CLHP (11).

En ce qui concerne plus particulièrement le dosage des produits parents, le prétraitement des échantillons biologiques est souvent réduit aussi à une **simple dilution** dans une solution de standard interne (43, 44, 52, 53) ; Edimboro parvient à séparer, après injection directe du sérum dans une colonne macrobore, l'éthylène glycol, le 1,2- et le 1,3-propanediol, le 1,3-, le 2,3- et le 1,4-butanediol, et enfin le diéthylène glycol (35).

Ce prétraitement peut aussi se résumer à une **simple précipitation** des protéines par l'acide perchlorique (50, 54), l'isopropanol (27), l'acétonitrile (3, 27, 30), un mélange sulfo-tungstique (14) ou à une ultrafiltration (7, 46).

Les méthodes physiques sont **sensibles**. La limite de détection varie avec le traitement subi par les échantillons biologiques, le volume de la prise d'essai et le type de détection.

En détection par ionisation de flamme, les auteurs annoncent des limites de détection très variables allant de 0,10 mg/l à 90 mg/l pour les alcools et de quelques mg/l à 65 mg/l pour les glycols. Les prises d'essai varient de quelques microlitres à 1.5 ml et ceci indépendamment du type d'injecteur.

La sensibilité de la technique de l'espace de tête est optimisée en augmentant la concentration en électrolytes dans la phase liquide du flacon ce qui constitue l'effet de sel (60) ; cependant, de nombreux débats persistent concernant les paramètres à prendre en compte dans cette optimisation (cf chapitre suivant).

Que ce soit pour les alcools ou les glycols, l'utilisation d'un couplage à la spectrométrie de masse, si elle permet d'améliorer la spécificité n'a pas d'incidence majeure sur la sensibilité en pratique courante (3, 59). Par

contre, dans le cadre d'études physiologiques, elle offre la possibilité de mettre en évidence des concentrations endogènes d'alcools extrêmement faibles (3, 60).

L'application de la RMN à partir d'un volume d'échantillon de 0.5 ml permet d'atteindre une limite de détection de 15 mg/l (8, 18, 19).

Les méthodes physiques n'offrent pas toutes la même **spécificité**. Montgomery a développé une méthode GC/MS qui lui permet de séparer et de doser les différents diastéréoisomères du 2,3-butylène glycol dans le sang de patients alcooliques (55).

La spectrométrie de masse reste la méthode de choix, pour une identification formelle, lorsque plusieurs produits possèdent le même temps de rétention. Il est vivement conseillé d'avoir recours à cette méthode de confirmation en cas d'implication médico-légale (44, 45).

Inconvénients des méthodes physiques et pièges à éviter

Pour effectuer des dosages d'alcools ou de glycols par méthodes physiques, le laboratoire concerné doit disposer de **matériel instrumental spécifique, peu automatisable, plus ou moins sophistiqué, parfois coûteux**, et qui dans tous les cas fait appel à un **personnel technique spécialisé**. Ces **méthodes sont donc en général mal adaptées à l'urgence**.

Certaines de ces méthodes sont difficiles à appliquer, car elles font appel à un type de matériel habituellement peu répandu dans les laboratoires de toxicologie, c'est le cas de la chromatographie ionique, de l'isotachophorèse et de la RMN (18, 19, 23, 47-49).

Bien que la technique d'injection basée sur l'espace de tête soit de plus en plus considérée comme optimale pour le dosage des alcools, un débat persiste encore sur la standardisation de l'échantillon et notamment sur les paramètres suivants :

Volume de la prise d'essai : certains auteurs observent que l'injection d'espace de tête nécessite un volume d'échantillon beaucoup plus important que celui utilisé en injection directe (1, 59) ce qui est contredit par d'autres tel que Macchia qui se contente d'une prise d'essai de 0.1 ml (5).

Effet de matrice, effet de sel et tension de vapeur : les quantités d'eau, d'électrolytes, et de protéines contenues dans chaque matrice biologique sont variables or la tension de vapeur des composés volatils analysés dépend directement de ces concentrations (15, 59, 68, 69). Watts qui a publié de nombreux travaux à ce sujet, a préconisé de réaliser une dilution minimale au cinquième de l'échantillon (69) ainsi qu'une déprotéinisation (15) pour minimiser ces effets de matrice sur les

tensions de vapeur.

Cependant, certains auteurs observent de très bon résultats en ne réalisant aucun de ces prétraitements (12,15).

Effet de sel et concentration en anti-coagulant : certains auteurs ne sont pas d'accord sur l'influence réelle de cette concentration sur l'analyse de l'éthanol par espace de tête (70, 71) et le débat reste ouvert.

Bien que les méthodes de dosage en CPG soient très rapides, notamment pour les alcools (cf chapitre précédent), les caractéristiques chromatographiques des acides et des glycols sont considérablement améliorées par un **prétraitement et une dérivatisation** des fonctions alcool et acide.

Déprotéinisation : pour le dosage des glycols, beaucoup d'auteurs ne limitent pas le prétraitement à une simple défécation du sang : celle-ci n'est souvent qu'une étape préliminaire à d'autres étapes telles que l'extraction et la dérivatisation. On retrouve classiquement les déprotéinisations par l'acétonitrile (28, 31, 40, 54), l'acétone (33, 34, 39), l'acide trichloracétique (38, 39) et l'acide sulfosalicylique (55, 56).

En l'absence d'extraction liquide/liquide des glycols, mais avant l'étape de dérivatisation, il est nécessaire de déshydrater le défécât et de le concentrer (28, 31).

Extraction des acides : l'extraction des acides organiques et des métabolites ioniques des alcools et glycols est une opération délicate. Elle se fait à pH très acide. Divers solvants sont proposés : le mélange dichlorométhane/ isopropanol (57), une triple extraction par l'éther (55) ; Dietzen pense que la triple extraction par l'éther ne permet pas de mesurer des concentrations physiologiques ou de déceler des augmentations pathologiques dans l'exploration des maladies métaboliques ; les acides très polaires à chaîne courte (tel que l'acide glycolique) nécessitent une extraction par le tétrahydrofurane ; après cette extraction, il prépare un mélange azéotrope avec du benzène (29). Kumps commence par transformer les lactates et les glycolates en oximes facilement silylables, en les traitant par du chlorhydrate d'hydroxylamine avant de les extraire à pH 1 par l'acétate d'éthyle (26).

Wandzilak utilise une méthode SPE sur colonnes C-18 pour doser ensuite les glycolates et les oxalates par chromatographie ionique (49).

De même, Vollmer purifie l'éthylène glycol sur des colonnes contenant de la terre de diatomées après l'avoir dérivé en ester dibenzoïque (30).

Pour shunter la délicate étape d'extraction des acides, Ovrebø propose une méthode de dosage des acides par isotachophorèse (23).

Quelques précautions particulières doivent être prises pour l'analyse des urines : une acidification des urines

à pH=2, permet une meilleure conservation des oxalates et des glycolates (29). Kumps met en garde contre "un effet de dilution des urines dans l'eau" se traduisant lors du dosage des acides organiques urinaires tels que les lactates et les glycolates par une diminution des concentrations mesurées (26).

Dérivatisation : l'acide formique est le plus souvent **méthylé** directement dans le flacon destiné à une analyse par espace de tête (21, 22).

Les glycols non dérivés possèdent un comportement chromatographique médiocre se traduisant par des pics traînants et une faible sensibilité de détection. Parmi les dérivés décrits dans la littérature, les **phenyls boronates** sont les plus fréquemment rencontrés pour l'éthylène glycol (36, 40, 54). Les esters cycliques de glycols peuvent être obtenus après réaction avec plusieurs dérivés de l'acide boronique (acide phenylboronique, bromo- phenylboronique, n-butylboronique,...) à condition que les 2 fonctions diols soient proches. Ce facteur limitant n'existe pas pour la dérivatisation des glycols avec l'acide pivalique (33).

Les glycols peuvent être également silylés (à chaud ou en présence de catalyseurs) surtout lorsqu'ils sont dosés simultanément avec des acides organiques (26, 28-31, 45, 55-57).

Fraser méthyle l'acide glycolique (39).

Vollmer transforme l'éthylène glycol en ester dibenzoïque (traitement par le chlorure de benzoyl en milieu alcalin) avant de le doser en CLHP (30).

Pour doser en CPG/SM toute une série de glycols, Dasgupta utilise deux réactifs de dérivatisation : le chlorure de perfluorooctanoyl et le chlorure de 4-carbethoxyhexafluorobutyl (34).

La transformation en phénylhydrazone est plus courante pour le dosage CLHP des métabolites acides de l'éthylène glycol (38, 48).

Ces différentes étapes **allongent le temps de réalisation de l'analyse et rendent la procédure plus délicate**.

Elles sont cependant fortement recommandées pour pallier à une difficulté bien connue pour le dosage de l'éthylène glycol ; en effet, cette molécule insuffisamment volatile, a tendance à rester piégée dans les seringues, les injecteurs, les liners, les colonnes, les détecteurs, conduisant à l'apparition de "**pics fantômes**" aléatoires. Les solutions proposées pour remédier à cette difficulté sont donc : la dérivatisation des glycols, un rinçage soigneux des seringues d'injection, voire un traitement par la chaleur, un changement fréquent des liners, une température appropriée pour les injecteurs, une étape de purge des colonnes, une température suffisante des détecteurs.

Certains procédés de transformation de l'éthylène glycol sont peu fiables et conduisent à des réactions non spécifiques : c'est le cas de l'oxydation de l'éthylène glycol en méthanol étudiée par Bjellerup (37).

Le choix du standard interne doit être judicieux.

Bien que Macchia ait proposé assez récemment de travailler sans standard interne pour le dosage de l'éthanol par analyse de l'espace de tête (5), l'énorme majorité des techniques d'analyse des alcools comprend une standardisation interne avec comme molécules les plus couramment rencontrées : le n-propanol, le n-butanol, le tertio-butanol, l'isopropanol. Cependant le choix du standard, là aussi, fait l'objet de nombreux débats (64-67).

Si d'un point de vue purement chromatographique, l'isopropanol et le tertio-butanol donnent des résultats comparables (64), Malandain a exposé les différents inconvénients liés à l'utilisation de l'isopropanol comme standard interne (65) : les cas d'exposition à cet alcool ne sont pas rares, celui-ci peut également provenir d'une transformation endogène de l'acétone en cas de diabète insulino-dépendant, de jeûne prolongé ou d'alcoolisme chronique. Malandain propose donc comme alternative l'utilisation du n-propanol, à la suite de nombreux auteurs. D'autres auteurs mettent en garde vis-à-vis du n-propanol qui peut être un produit de putréfaction dans le cas particulier des échantillons post-mortem (4, 66). Enfin Machata qui a une grande expérience de l'analyse de l'éthanol par espace de tête préconise le choix du tertio-butanol comme standard interne. Cet alcool a en effet l'avantage d'avoir les mêmes caractéristiques de tension de vapeur que l'éthanol d'où sa supériorité par rapport à tous les autres.

En ce qui concerne les glycols, c'est le 1,3-propanediol qui est le plus souvent sélectionné (27, 28, 30, 36, 40, 42, 53, 54). Sont cités également le 1,2-butanediol (34, 41), le 1,4-butanediol (33, 35), le 2,3-butanediol (43, 46), le n-propanol (7, 37), le 3-bromo-1-propanol (31). Pour le dosage des acides organiques et plus particulièrement des métabolites acides de l'éthylène glycol, il est souhaitable de choisir comme standard interne un acide : les auteurs proposent l'acide propionique (39), l'acide éthyl-phosphorique (29), les acides tropique et 2 cétocaproïque (26), l'acide 2-oxobutyrique (38) et l'acide furoïque (57).

Les standards internes deutérés sont très peu disponibles (55, 56).

Parmi les pièges à éviter il est fortement déconseillé de choisir le 1,2-propanediol (propylène glycol) comme standard interne car ce dernier est utilisé comme solvant dans de nombreuses préparations injectables (Valium®). Cette interférence peut conduire à des résultats erronés par défaut en cas d'absorption d'éthylène glycol (41, 42, 53, 63).

Dans les conditions de travail décrites par Jones (54) et Porter (36) (dérivatisation en phenyl boronate, colonne OV17 ou OV101 et détection par ionisation de flamme), le 2,3-butanediol n'est pas séparé de l'éthylène glycol. Une deuxième raison conduit à déconseiller l'usage de cette molécule comme standard interne : elle peut être présente dans le sang de patients alcooliques chroniques et conduire ainsi comme dans le cas du 1,2-propanediol, à des résultats erronés. La présence de diols à chaîne courte dans le sang fait l'objet de débats quant à leur origine : sont-ils contenus dans les boissons alcoolisées ou proviennent-ils d'une voie métabolique intermédiaire associée à l'alcoolisme chronique (54) ?

Dasgupta propose plutôt le 1,4-butanediol à condition de ne pas avoir recours à une dérivatisation par l'acide phenylboronique (33).

Les méthodes physiques et plus particulièrement les méthodes chromatographiques séparatives sont dites spécifiques, cependant plusieurs cas d'**interférences** comme celui du 1,2-propanediol ou du 2,3-butanediol sont bien documentés (36, 43, 54).

Bjellerup met en garde contre l'utilisation d'une méthode de dosage de l'éthylène glycol en CPG/FID qui consiste à transformer l'éthylène glycol en formaldéhyde par oxydation puis à réduire celui-ci en méthanol : des résultats faussement positifs ont été obtenus par l'auteur en analysant le sérum de patients alcooliques ou diabétiques contenant des substances "méthanol-like" (37).

Shoemaker rapporte le cas d'une erreur de diagnostic aux conséquences judiciaires dramatiques : l'analyse a posteriori, en post mortem, du sérum d'un enfant décédé à la suite d'une intoxication présumée criminelle, a montré qu'en fait, il s'agissait d'une maladie métabolique ; il y avait eu confusion de la part du laboratoire entre l'éthylène glycol et acide propionique provenant d'une acidose méthylmalonique, du fait de l'utilisation de la CPG/FID sans dérivatisation préalable. La confirmation de cette erreur a été faite en spectrométrie de masse (44).

A l'inverse, Woolf publie le cas d'un enfant de 6 mois empoisonné de façon criminelle par de l'éthylène glycol (45). Le diagnostic a pu être posé fortuitement seulement au cours de la troisième hospitalisation pour acidose métabolique sévère à l'occasion d'une exploration complémentaire, en spectrométrie de masse, des anomalies du métabolisme.

Dans la très grande majorité des cas d'interférences signalés par les auteurs, ces derniers utilisent une méthode CPG/FID avec séparation sur une colonne

remplie et sans dérivatisation préalable.

Conclusion

La bibliographie concernant les méthodes physiques de dosage des alcools et des glycols est abondante mais traite principalement des chefs de file "éthanol et éthylène glycol".

Le sang demeure le prélèvement de choix, associé aux urines pour une confirmation ou une recherche de métabolites.

Le panel des méthodes proposées aux toxicologues est vaste, mais la CPG reste largement prédominante.

En ce qui concerne les alcools, il faut choisir entre une injection directe qui présente les avantages d'être rapide et économique pour de petites séries de dosages, et de nécessiter une faible prise d'essai, et une injection par espace de tête qui permet de mieux protéger la colonne et d'être automatisable en cas de grosses séries

de dosages.

L'analyse des glycols par CPG quant à elle, implique de privilégier la spécificité et d'être vigilant par rapport à plusieurs pièges associés tels que le choix du standard interne, de la technique de dérivatisation et du type de colonne.

En pratique, du fait du manque d'homogénéité des caractères physico-chimiques des molécules à doser, il semble difficile de trouver la méthode unique qui permettrait, sur un même échantillon, de doser le produit parent et ses métabolites. A fortiori il apparaît encore plus complexe de coupler sur un même système, l'analyse des deux familles de molécules alcools et glycols. C'est la raison pour laquelle très peu de laboratoires, même spécialisés en toxicologie analytique, réalisent actuellement, en dépit de leurs intérêts diagnostique et thérapeutique, le dosage de ces métabolites

Références

1. Tangerman A., Highly sensitive gas chromatographic analysis of ethanol in whole blood, serum, urine, and fecal supernatants by the direct injection method. *Clin. Chem.* 1997 ; 43 (6) : 1003-1009.
2. Mc Carver-May D. G., Durisin L., An accurate, automated, simultaneous gas chromatographic headspace measurement of whole blood ethanol and acetaldehyde for human in vivo studies. *J. Anal. Toxicol.* 1997 ; 21 : 134-141.
3. Dean R.A., Thomasson H.R., Dumauval N., Amann D., Li T-K., Simultaneous measurement of ethanol and ethyl-d5 alcohol by stable isotope gas chromatography-mass spectrometry. *Clin. Chem.* 1996 ; 42 (3) : 367-372.
4. O'Neal C.L., Wolf II C.E., Levine B., Kunsman G., Poklis A., Gas chromatographic procedures for determination of ethanol in post-mortem blood using t-butanol and methyl ethyl ketone as internal standards. *Forensic Sci. Int.* 1996 ; 83 : 31-38.
5. Macchia T., Mancinelli R., Gentili S., Lugaresi E. C., Raponi A., Taggi F., Ethanol in biological fluids : headspace GC measurement. *J. Anal. Toxicol.* 1995 ; 19 : 241-246.
6. Clerc Y., Huart B., Charotte JM., Pailler F.M., Validation d'une méthode de dosage de l'éthanol sanguin par chromatographie en phase gazeuse. *Ann. Biol. Clin.* 1995 ; 53 : 233-238
7. Livesey J.F., Perkins S.L., Tokessy N.E., Maddock M.J., Simultaneous determination of alcohols and ethylene glycol in serum by packed-or-capillary-column gas chromatography. *Clin. Chem.* 1995 ; 41/2 : 300-305.
8. Pappas A.A., Thompson J.R., Fuller G.L., Porter W.H., Gadsden R.H., High-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy in the detection of low molecular weight volatiles. *J. Anal. Toxicol.* 1993 ; 17 : 273-277.
9. Wax P.M, Hoffman R.S., Goldfrank L.R., Rapid quantitative determination of blood alcohol concentration in the emergency department using an electrochemical method. *Ann. Emerg. Med.* 1992 ; 21 (3) : 254-259.
10. Sharma V.K., Jadhav R.K., Rao G.J., Saraf A.K., Chandra H., High performance liquid chromatographic determination of alcohols with reference to body distribution of methanol. *For. Sci. Int.* 1991 ; 50 : 255-261.
11. Tagliaro F., Dorizzi R., Ghielmi S., Marigo M., Direct injection high-performance liquid chromatographic method with electrochemical detection for the determination of ethanol and methanol in plasma using an alcohol oxidase reactor. *J. Chromatogr.* 1991 ; 566 : 333-339.
12. Schuberth J. Volatile compounds detected in blood of drunk drivers by headspace/capillary gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry.* 1991 ; 20 : 699-702.
13. Senkowski C.M., Thompson K.A., The accuracy of blood alcohol analysis using headspace gas chromatography when performed on clotted samples. *J. For. Sci.* 1990 ; 35 (1) : 176-180.
14. Warnet J.M., Boudène C., Cluet J.L. François E., Goulle J.P., Le Henaff Y., Leblanc A., Lenegre F., Leymarie M., Mousson B., Pailler F.M., Papoz L., Ricordel I., Rudler M., Thevenin M., Tourneau J., Evaluation d'une technique de détermination de l'éthanolémie par chromatographie en phase gazeuse. *Ann. Biol. Clin.* 1990 ; 48 : 587-595.
15. Watts M.T., MacDonald O.L., The effect of sodium chloride concentration, water content, and protein on the gas chromatographic headspace analysis of ethanol in plasma. *Am. J. Clin. Pathol.* 1990 ; 93 : 357-362.

16. Jones A.W., Schuberth J., Computer-aided headspace gas chromatography applied to blood-alcohol analysis : importance of online process control. *J. For. Sci.* 1989 ; 34 (5) : 1116-1127.
17. Cheung S.T., Lin W.N., Simultaneous determination of methanol, ethanol, acetone, isopropanol and ethylene glycol in plasma by gas chromatography. *J. Chromatogr.* 1987 ; 414 : 248-250.
18. Wahl A., Azaroual N., Imbenotte M., Mathieu D., Forzy G., Cartigny B., Vermeersch G., Lhermitte M., Poisoning with methanol and ethylene glycol: ¹H NMR spectroscopy as an effective clinical tool for diagnosis and quantification. *Toxicol.* 1998 ; 128 : 73-81.
19. Wahl A., Azaroual N., Imbenotte M., Vermeersch G., Lhermitte M., RMN¹H de liquides biologiques pour le diagnostic de deux cas d'acidose métabolique. *Toxicorama* 1996 ; 8 (4) : 17-20.
20. Tagliaro F., Schiavon G., Dorizzi R., Marigo M., Development of post-column enzymic reactors with immobilized alcohol oxidase for use in the high-performance liquid chromatographic assay of alcohols with electrochemical detection. *J. Chromatogr.* 1991 ; 563 : 11-21.
21. Yasugi T., Kawai T., Mizunuma K., Horiguchi S., Iwami O., Iguchi H., Ikeda M., Formic acid excretion in comparison with methanol excretion in urine of workers occupationally exposed to methanol. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 1992 ; 64 : 329-337.
22. Fraser A.D., MacNeil W., Gas chromatographic analysis of methyl formate and application in methanol poisoning cases. *J. Anal. Toxicol.* 1989 ; 13 : 73-76.
23. Ovrebo S., Jacobsen D., Sejersted O.M., Determination of ionic metabolites from ethylene glycol in human blood by isotachopheresis. *J. Chromatogr.* 1987 ; 416 : 111-117.
24. Monaghan M.S., Olsen K.M., Ackerman B.H., Fuller G.L., Porter W.H., Pappas A.A., Measurement of serum isopropanol and the acetone metabolite by proton nuclear magnetic resonance : application to pharmacokinetic evaluation in a simulated overdose model. *Clin. Toxicol.*, 1995; 33(2): 141-149.
25. Bailey D.N., Detection of isopropanol in acetone-mic patients not exposed to isopropanol. *Clin. Toxicol.* 1990 ; 28 (4) : 459-466.
26. Kumps A., Duez P., Genin J., Mardens Y., Gas chromatography-mass spectrometry analysis of organic acids : altered quantitative response for aqueous calibrators and dilute urine specimens. *Clin. Chem.* 1999 ; 45 (8) : 1297-1302.
27. Bourgogne E., Sanquer S., Vaux S., Astier A., Analyse d'un cas d'intoxication par un produit caustique inconnu: mise en évidence d'acide butoxyacétique dans les urines. *Toxicorama* 1997 ; numéro spécial : 307-309.
28. Porter W.H., Rutter P.W., Yao H.H., Simultaneous determination of ethylene glycol and glycolic acid in serum by GC/MS. *Clin. Chem.* 1997 ; 43 (6) : S211.
29. Dietzen D.J., Wilhite T.R., Kenagy D.N., Milliner D.S., Smith C.H., Landt M., Extraction of glyceric and glycolic acids from urine with tetrahydrofuran: utility in detection of primary hyperoxaluria. *Clin. Chem.* 1997 ; 43 (8) : 1315-1320.
30. Vollmer P.A., Harty D.C., Erickson N.B., Balhon A.C., Dean R.A., Serum ethylene glycol by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1996 ; 685 : 370-374.
31. Yao H.H., Porter W.H., Simultaneous determination of ethylene glycol and its major toxic metabolite, glycolic acid, in serum by gas chromatography. *Clin. Chem.* 1996 ; 42 (2) : 292-297.
32. De Leacy E.A., Moxon L.N., Ellis V.M., Van Dongen J.M.A.M., Johnson L.P., Doddrell D.M., Cowley D.M., A report of accidental ethylene glycol ingestion in 2 siblings. *Pathology* 1995 ; 27 : 273-276.
33. Dasgupta A., Blackwell W., Griego J., Malik S., Gas chromatographic-mass spectrometric identification and quantitation of ethylene glycol in serum after derivatization with perfluorooctanoyl chloride: a novel derivative. *J. Chromatogr.* 1995 ; 666 : 63-70.
34. Dasgupta A., Macaulay R., A novel derivatization of ethylene glycol from human serum using 4-carbethoxyhexafluorobutyryl chloride for unambiguous gas chromatography-chemical ionization mass spectrometric identification and quantification. *Clin. Chem.* 1995 ; 104 (3) : 283-288.
35. Edinboro L.E., Poklis A., Gas chromatography ethylene glycol method : evaluation for diol interference. *Therapeutic Drug Monitoring* 1995 ; 17 : 211.
36. Porter W.H., Jarrells M.C. Improved specificity for ethylene glycol determined as the phenylboronate by capillary column gas chromatography. *Clin. Chem.* 1994 ; 40 (5) : 850-851.
37. Bjellerup P., Kallner A., Kollind M., GLC determination of serum-ethylene glycol, interferences in ketotic patients. *Clin. Toxicol.* 1994 ; 32 (1) : 85-87.
38. Lange M., Malyusz M., Fast method for the simultaneous determination of 2-oxoacids in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1994 ; 662 : 97-102.
39. Fraser A.D., MacNeil W., Colorimetric and gas chromatographic procedures for glycolic acid in serum: the major toxic metabolite of ethylene glycol. *Clin. Toxicol.* 1993 ; 31 (3) : 397-405.
40. Houzé P., Chaussard J., Harry P., Pays M., Simultaneous determination of ethylene glycol, propylene glycol, 1,3-butylene glycol and 2,3-butylene glycol in human serum and urine by wide-bore column gas chromatography. *J. Chromatogr.* 1993 ; 619 : 251-257.
41. Smith N.B., Internal standards in gas-chromatographic analyses for ethylene glycol in serum. *Clin. Chem.* 1993 ; 39 (9) : 2020.
42. Apple F.S., Googins M.K., Resen D., Propylene glycol interference in gas-chromatographic assay of ethylene glycol. *Clin. Chem.* 1993 ; 39 (1) : 167.
43. Aarstad K., Dale O., Aakervik O., Ovrebo S., Zahlsten K., A rapid gas chromatographic method for determination of ethylene glycol in serum and urine. *J. Anal. Toxicol.* 1993 ; 17 : 218-221.

44. Shoemaker J.D., Lynch R.E., Hoffman J.W., Sly W.S., Misidentification of propionic acid as ethylene glycol in a patient with methylmalonic acidemia. *J. Pediatr.* 1992 ; 120 (3) : 417-421.
45. Woolf A.D., Wynshaw-Boris A., Rinaldo P., Levy H.L., Intentional infantile ethylene glycol poisoning presenting as an inherited metabolic disorder. *J. Pediatr.* 1992 ; 120 (3) : 421-424.
46. Nyanda A.M., Cross R.E., Phillips J.C., A simple and rapid method for determination of ethylene glycol and propylene glycol using capillary column gas chromatography and ultrafiltration for sample preparation. *Clin. Chem.* 1992 ; 38 (6) : 1017.
47. Malhotra D., Shapiro J.I., Chan L., Nuclear magnetic resonance spectroscopy in patients with anion-gap acidosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1991 ; 2 : 1046-1050.
48. Marangella M., Petrarulo M., Bianco O., Vitale C., Finocchiaro P., Linari F., Glycolate determination detects type I primary hyperoxaluria in dialysis patients. *Kidney Int.* 1991 ; 39 : 149-154.
49. Wandzilak T.R., Hagen L.E., Hughes H., Sutton R.A.L., Smith L.H., Williams H.E., Quantitation of glycolate in urine by ion-chromatography. *Kidney Int.* 1991 ; 39 : 765-770.
50. Jonsson J.A., Eklund A., Molin L, Determination of ethylene glycol in postmortem blood by capillary gas chromatography. *J. Anal. Toxicol.* 1989 ; 13 : 25-26.
51. Ma Wu N., Malinin T.I., High performance liquid chromatography determination of ethylene glycol and ethylene chlorohydrin in tissues. *J. Anal. Toxicol.* 1987 ; 11 : 63-66.
52. Moffatt E.J., Hagardorn A.N., Ferslew K.E., A gas-liquid chromatographic method for quantitation of 1,3-butylene glycol in whole blood or plasma and the separation of the short chain glycols. *J. Anal. Toxicol.* 1986 ; 10 : 35-37.
53. Legatt D.F., Ethylene glycol quantification : avoid propylene glycol as an internal standard. *Clin. Chem.* 1990, 36 (10) 1860-1861.
54. Jones A.W., Nilsson L., Gladh A., Karlsson K., Beck-Friis J., 2,3-Butanediol in plasma from an alcoholic mistakenly identified as ethylene glycol by gas-chromatographic analysis. *Clin. Chem.* 1991 ; 37(8) : 1453-1455.
55. Montgomery J.A., Jetté M., Brunengraber H., Assay of physiological levels of 2,3-butanediol diastereomers in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 1990 ; 185 : 71-76.
56. Desrochers S., Montgomery J.A., Des Rosiers C., Lincoln B.C., Brunengraber H., Quantitation of 1,3-butanediol and its acidic metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 1990 ; 186 : 101-107.
57. Sakai T., Araki T., Masuyama Y., Determination of urinary alkoxyacetic acids by a rapid and simple method for biological monitoring of workers exposed to glycol ethers and their acetates. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1993 ; 64 : 495-498.
58. Sakai T., Araki T., Morita Y., Masuyama Y., Gas chromatographic determination of butoxyacetic acid after hydrolysis of conjugated metabolites in urine from workers exposed to 2-butoxyethanol. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1994 ; 66 : 249-254.
59. Tagliaro F., Lubli G., Ghielmi S., Franchi D., Marigo M., Chromatographic methods for blood alcohol determination. *J. Chromatogr.* 1992 ; 580 : 161-190.
60. Deveaux M., Alcool éthylique. In : Kintz P., Toxicologie et pharmacologie médico-légales. Paris Elsevier, 1998 : 111-126.
61. Fuller G., Pappas A., Ackerman B., Olsen K., Monaghan M., Proton magnetic resonance spectroscopy for the simultaneous determination of isopropanol and acetone levels in human whole blood. *Clin. Chem.* 1993 ; 39 (6) : 1228-1229.
62. Pappas A.A., Thompson J.R., Porter W.H., Gadsden R.H., High-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy in the detection and quantitation of ethanol in human serum. *J. Anal. Toxicol.* 1993 ; 17 : 230-232.
63. Eder F.E., McGrath M., Dowdy Y.G., Tomaszewski J.E., Rosenberg F.M, Wilson R.B., Wolf B.A., Shaw L.M., Ethylene glycol poisoning: toxicokinetic and analytical factors affecting laboratory diagnosis. *Clin. Chem.* 1998 ; 44 (1) : 168-177.
64. Varga M., Somogyi G., Posta J., Buris L., Effect of different columns and internal standards on the quality assurance of the gas chromatographic determination of blood ethanol. *Eur. J. Clin. Chem. Biochem.* 1993 ; 31 : 773-776.
65. Malandain H., Cano Y., Ethanol sanguin et isopropanol. *Ann. Biol. Clin.* 1996 ; 54 : 97
66. Machata G., Concerning the paper by Poklis et al., entitled: " Gas chromatographic procedures for determination of ethanol in postmortem blood using t-butanol and methyl ethyl ketone as internal standards ". *Forensic Sci. Int.* 1997 ; 86 : 139-140.
67. O'Neal C.L., Wolf II C.E., Levine B., Kunsman G., Poklis A., Reply to G. Machata's letter re: " Gas chromatographic procedures for determination of ethanol in postmortem blood using t-butanol and methyl ethyl ketone as internal standards ". *Forensic Sci. Int.* 1997 ; 86 : 141-143.
68. Jones A.W., Determination of liquid/air partition coefficients for dilute solutions of ethanol in water, whole blood, and plasma. *J. Anal. Toxicol.* 1983 ; 17 : 193-197.
69. Watts M.T., MacDonald O.L., The effect of biologic specimen type on the gas chromatographic headspace analysis of ethanol and other volatile compounds. *Am. Clin. Pathol.* 1987 ; 87 : 79-85.
70. Solanki A.A., Effect of different concentrations of sodium fluoride on blood alcohol determination by headspace gas chromatography using the internal standard method. *J. Anal. Toxicol.* 1994 ; 18 : 63.
71. Jones A.W., Salting-out effect of sodium fluoride and its influence on the analysis of ethanol by headspace gas chromatography. *J. Anal. Toxicol.* 1994 ; 18 : 292-293.

Place des techniques enzymatiques dans le diagnostic et le suivi des intoxications par un alcool ou un glycol

Diagnosis and monitoring of alcohol and glycol poisonings : usefulness of enzymatic methods

H. MALANDAIN, Y. CANO

Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier P. Chubert - 56017 VANNES

RÉSUMÉ

A côté des techniques physiques, séparatives ou non, pour doser les alcools, les glycols et leurs métabolites, quelques méthodes enzymatiques ont été proposées dans l'intention de rendre plus aisée l'utilisation et donc la diffusion de ces dosages. Si la mesure de l'éthanol est très répandue dans les laboratoires hospitaliers, d'autres molécules peuvent aussi être dosées par voie enzymatique : le méthanol, l'isopropanol, l'éthylène glycol, le propylène glycol et aussi des métabolites comme les acides formique, glycolique ou oxalique. La plupart de ces techniques sont bien adaptées à l'urgence et à la rareté des demandes mais sont réputées manquer de spécificité. Le présent travail recense les méthodes disponibles et analyse en détail ces problèmes d'interférences. Il semble que certaines méthodes peuvent être retenues là où une méthode physique fait défaut ou n'est pas disponible 24h/24. Ceci est notamment le cas pour le dosage de métabolites comme l'acide formique ou l'acide glycolique dont l'inclusion dans le bilan analytique permet une approche plus complète de l'intoxication.

MOTS-CLÉS

Méthodes enzymatiques, éthanol, méthanol, isopropanol, éthylène glycol, propylène glycol, acide formique, acide glycolique, interférences, praticabilité.

SUMMARY

Alcohols, glycols, and their metabolites are usually quantified with physical techniques, separative or not. Some enzymatic methods have been developed too with the aim to make these tests easier than physical ones and thus more widely used. In addition to ethanol some other molecules can now be measured in hospital labs : methanol, isopropanol, ethylene glycol, propylene glycol, and metabolites like formic, glycolic or oxalic acids. These enzymatic methods are reviewed in this paper with a special attention paid to their interference problems. Most assays seem to be well suited to urgent but irregular requests and some are an acceptable option where physical techniques are unavailable or not used round-the-clock. This is especially the case for metabolites like formic or glycolic acids whose measurement should be included in the analytical check-up for improving the poisoned patient assessment.

KEY-WORDS

alcohols, glycols, poisoning, enzymatic methods, formic acid, glycolic acid.

Introduction

Une enquête récente auprès des hôpitaux français a montré que très peu de laboratoires étaient en mesure de documenter en urgence une intoxication par le méthanol ou par l'éthylène glycol (EG)[1] : les dosages étaient impossibles sur place ou n'étaient pas réalisés 24h/24. Par ailleurs, l'analyse des métabolites faisait défaut dans la plupart des hôpitaux. Quelques réponses possibles à cet état de fait :

- les laboratoires spécialisés en toxicologie peuvent répondre en urgence aux dosages de méthanol et d'éthylène glycol; mais l'équipement nécessaire pour doser simultanément les métabolites (acide formique, acide glycolique,..) est disproportionné par rapport à la fréquence de ces demandes d'analyses

- la réalisation dans des laboratoires souvent distincts du bilan biologique (ionogramme, gaz du sang, acide lactique,..) et du bilan toxicologique n'a pas favorisé une approche étiologique globale : les critères indirects d'intoxication sont encore utilisés (trous anionique et osmolaire, cristallurie) [2], alors que le dosage des métabolites acides permettrait [3-7] :

- de documenter l'origine de l'acidose métabolique
- d'orienter les choix thérapeutiques (ex. : hémodyalyse)
- d'évaluer une intoxication avant creusement significatif du trou anionique
- voire de diagnostiquer une intoxication vue tardivement

En biologie clinique de très nombreux dosages font appel à une réaction enzymatique. C'est le cas de l'éthanol dont la mesure est couramment pratiquée dans les laboratoires hospitaliers.

Un certain nombre des procédés enzymatiques ont aussi été décrits pour le dosage du méthanol, de l'EG, des acides formique, oxalique, glycolique, etc.. Par leur meilleure praticabilité dans des situations ponctuelles, ces méthodes enzymatiques constituent une alternative intéressante aux techniques instrumentales (CPG, HPLC, RMN..).

Les protocoles enzymatiques

Les alcools et les glycols se prêtent bien à des réactions d'oxydation avec formation, dans un premier temps, d'un aldéhyde ou d'une cétone. Deux sortes d'enzymes sont utilisées : des déshydrogénases, comme l'alcool déshydrogénase (ADH), et des oxydases. Les premières conduisent à la formation de NADH (ou NADPH) avec, classiquement, un suivi de la réaction à 340 nm. Les oxydases utilisent l'oxygène dissous et entraînent la formation d' H_2O_2 : la réaction est suivie soit par ampérométrie (électrode à O_2 ou à H_2O_2) soit par photométrie d'un chromogène formé après conver-

sion de l' H_2O_2 par une peroxydase.

Quand la réversibilité de la réaction enzymatique pose un problème de non linéarité de la gamme ou s'il y a risque d'inhibition par le produit, il est ajouté soit un "trapping" (ex. : captation de l'acétone par l'hydrazine) soit une seconde réaction (ex. : conversion de l'acétaldéhyde par une aldéhyde déshydrogénase ou recirculation du NADH par une diaphorase).

Les techniques disponibles Les réactifs commercialisés

La mesure enzymatique de l'éthanol a été l'objet de nombreux travaux, tant pour le développement que pour la comparaison des réactifs industriels [8-17]. Une dizaine de coffrets pour dosage sur automate sont actuellement commercialisés en France. Ces kits utilisent une ADH extraite de levures, à l'exception du coffret Alcool-PAP (BioMérieux) qui emploie une alcool oxydase. Ils ont fait l'objet d'une étude multicentrique qui a montré des performances et des coûts assez différents d'un kit à l'autre [17]. Ces réactifs sont prévus pour un dosage sur plasma ou sérum. La mesure sur un échantillon de sang total a été testée pour certains [8,18]. Mais l'utilisation d'une méthode enzymatique dans le cadre d'une alcoolémie médico-légale (c'est-à-dire sur sang total) est tout à fait déconseillée et même interdite s'agissant de la circulation routière. Aussi la validité des kits enzymatiques pour l'éthanolémie, en termes de spécificité et d'exactitude, ne doit être jugée que dans le seul cadre d'un usage hospitalier.

En dehors de l'éthanolémie, seule la mesure de l'oxalurie est disponible sous forme de coffrets complets et autorisés pour un usage en biologie humaine. Les kits proposés (Sigma, par exemple) font appel à une oxalate décarboxylase. Une étape préalable visant à éliminer certains chromogènes urinaires rend ces techniques relativement longues. La constitution d'un prélèvement urinaire est, par ailleurs, dépendante de la conservation d'une diurèse, laquelle est souvent compromise dans les intoxications avec l'éthylène glycol [19].

Les méthodes non commercialisées

Ethanol :

Peu de variantes significatives ont été proposées aux techniques commerciales utilisant l'ADH : Young décrit une amélioration sensible de la gamme de mesure par addition d'une pyrazole, inhibiteur compétitif de l'ADH [20]. Parce que la réaction avec une alcool oxydase est rapide, cette enzyme a fait de son côté l'objet de quelques propositions techniques. Diverses sources d'alcool oxydase ont été essayées : *Candida boidinii*, *Pichia pastoris* [21,22], *Hansenula polymorpha* [23]. Comme pour l'ADH, la source de l'enzyme influe sur

ses capacités catalytiques. Cependant, toutes les alcool oxydases convertissent le méthanol en plus de l'éthanol, ce qui rend délicat leur utilisation pour l'analyse dans les milieux biologiques. Certains procédés ont pu contourner ce problème par le biais d'une séparation chromatographique préalable [24,25] ; mais de telles solutions instrumentales sont finalement plus complexes que la CPG. Une modification du protocole opératoire du coffret Alcool-PAP (BioMérieux) permet, par contre, d'éviter l'interférence du méthanol et d'envisager un dosage simple et automatisé de l'éthanol [26] : cette technique tire parti des comportements cinétiques très différents de l'éthanol et du méthanol (cf. le paragraphe "Méthanol" ci-après) et est aussi à la base d'un dosage simultané [27] ou séparé [28] du méthanol.

Méthanol :

L'utilisation d'une méthanol deshydrogénase est envisageable dans des milieux bien définis mais pas pour la mesure de la méthanolémie du fait de l'interférence de nombreux autres alcools [29].

Parmi les alcool oxydases, celle issue de *Candida boïdinii* est en fait plus une méthanol oxydase qu'une éthanol oxydase [30]. Quelques essais avec cette enzyme ont donc été tentés : si l'on met, là encore, à part les séparations HPLC préalables [24,25], les méthodes directes ont été limitées par des problèmes de non spécificité, particulièrement à cause de l'éthanol [31-33].

L'alcool oxydase de *Candida boïdinii* peut cependant être utilisée pour une mesure fiable de la méthanolémie : le rapport des cinétiques réactionnelles du méthanol et de l'éthanol s'inverse au cours de la réaction (figure 1). Cette disparité a été mise à profit dans un "twin test" (suivi de deux cinétiques successives dans la même cuve réactionnelle) basé sur un réactif aisément disponible (Alcool-PAP) [27]. Cette méthode permet de quantifier simultanément l'éthanol de façon fiable en corrigeant le défaut de spécificité de l'enzyme [26], défaut lui-même aggravé par le protocole opératoire choisi par le fabricant du réactif pour la mesure de l'éthanol [17].

Pour les laboratoires dont l'automate ne peut suivre un "twin test", une adaptation permet de quantifier le méthanol par calcul [28]. Deux dosages sont effectués : A = éthanol avec une technique classique à l'ADH (insensible au méthanol) et B = éthanol + méthanol avec le coffret Alcool-PAP. La présence de méthanol dans l'échantillon se traduira par un résultat B supérieur au résultat A et la concentration en méthanol sera déduite par calcul (cf. détails en annexe 1). Dans des laboratoires dépourvus de CPG, ce protocole pourrait répondre aux besoins d'analyses pluriquotidiennes d'éthanol et ponctuelles de méthanol.

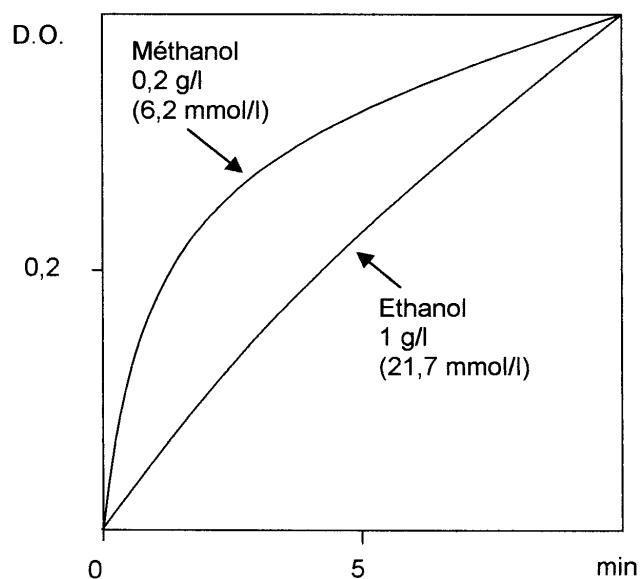


Figure 1 : Cinétique comparée des réactions du méthanol et de l'éthanol en présence d'alcool oxydase (tiré de [27]).

Ethylène glycol :

La faible réaction obtenue avec l'éthylène glycol (EG) en présence d'ADH a donné des propositions techniques peu réalistes [34,35] puisqu'il fallait que l'échantillon soit dépourvu d'éthanol ! L'observation d'interférences dues au propylène glycol (PG) dans la mesure des triglycérides [36,37] a suscité quelques méthodes tirant parti de cet inconvénient : la glycéról deshydrogénase utilisée dans certains de ces réactifs convertit en effet l'EG et le PG en plus du glycéról [38]. Les pochettes triglycérides de l'automate Aca (Dade), relativement répandu à l'époque, ont été à la base de divers procédés : dosage après digestion externe des triglycérides de l'échantillon [39,40] ou calcul d'un "triglyceride gap" entre le résultat de l'Aca (= triglycérides + EG) et le résultat des triglycérides avec un coffret non interféré (utilisant une glycéro-phosphate oxydase) [41]. Une autre approche a été tentée avec suivi de la réaction en fluorimétrie [42].

La nécessité d'un automate particulier a cependant poussé les recherches vers des techniques plus ouvertes. Hansson [43,44] a proposé une méthode UV utilisant une glycéról deshydrogénase extraite d'*Enterobacter*. La méthode a été automatisée par Standefer [45] et verra une assez large diffusion dans les laboratoires non équipés de CPG, ou pour la garde [46,47].

Les techniques utilisant l'Aca ou dérivant de Hansson sont basées sur le suivi du NADH formé. Elles ont deux inconvénients : une linéarité limitée et des interférences dues notamment au glycéról et au PG (cf. plus loin "limites des méthodes"). La correction du croise-

ment par le glycérol a été rendue possible par addition de glycérokinase [27] ; et l'amélioration de la linéarité, obtenue par un recyclage du NADH, a permis de minimiser le problème du PG [28]. Cette technique bénéficie d'un réactif préparé spécialement par la société Sigma et est décrite en détail en annexe 2.

Propylène glycol :

L'essai de différentes glycérol déshydrogénases pour le dosage de l'EG a révélé que, contrairement à l'enzyme extraite d'*Enterobacter*, celle issue de *Cellulomonas* convertissait le PG sans interférence significative de l'EG ou du glycérol dans des conditions opératoires bien choisies [48]. Une technique UV a donc été présentée [48] dont l'intérêt pourrait résider dans la recherche étiologique d'une hyperosmolarité ou d'une acidose lactique inexplicables.

Isopropanol :

La sélectivité des ADH varie beaucoup elle aussi avec l'origine de l'enzyme : l'ADH extraite d'*Anaerobium brockii* s'avère plus active sur les alcools secondaires que primaires. Une technique électrométrique a été publiée [49] ainsi qu'une méthode directe sur échantillon biologique dans l'UV [50]. Cette méthode automatisée suit la formation du NADPH à 340 nm en présence d'hydrazine pour capter l'acétone.

Acide glycolique :

Connaissant l'importance du dosage des métabolites pour la prise en charge (voire le diagnostic) d'une intoxication par l'EG, il est étonnant que la mesure de l'acide glycolique sérique ait reçu si peu de développements. Pourtant, à côté des dosages urinaires en HPLC dans les hyperoxaluries I et d'une technique chimique à l'acide chromotrope [51], le principe d'un dosage enzymatique de la glycolatémie avait été avancé dès 1979 par Kasidas [52]. La glycolate oxydase extraite de l'épinard a aussi été utilisée par Bais, mais pour un dosage urinaire [53]. Une adaptation tirant parti de réactifs commerciaux et d'une automatisation a été présentée en 1995 [27], complétée par une pré-réaction facultative éliminant l'interférence de l'acide lactique [28]. Les détails de cette technique sont présentés en annexe 3.

Acide formique :

Les méthodes de dosage enzymatique de l'acide formique sérique sont, elles aussi, restées peu développées en comparaison de leur utilité potentielle en milieu hospitalier. Les techniques publiées font appel à la formate déshydrogénase et bénéficient de la grande spécificité de cette enzyme vis-à-vis de l'acide formique. Des procédés ont été proposés pour un dosage urinaire [54-56] ou pour le sérum mais nécessitant une lecture fluorimétrique [57-59]. Une trousse destinée à l'analy-

se alimentaire (Roche ref. 979 732) pourrait être utilisée après défécation de l'échantillon [60] ; mais la courte durée de stabilité de ce kit une fois reconstitué s'adapte mal aux demandes très ponctuelles de formateémie. Buttery a présenté en 1988 une technique manuelle où le NADH formé est repris par l'INT [61]. Basée sur un principe similaire, une méthode automatisée et utilisant des réactifs plus facilement préparés et stables a été récemment évaluée [28] : la matrice réactionnelle est constituée par le même réactif que pour le dosage de l'EG [28]. Les détails du protocole opératoire sont présentés en annexe 4.

Acide oxalique :

Un coffret non commercialisé pour l'analyse en biologie humaine (Roche ref. 755 699) décrit la possibilité d'une adaptation pour dosage dans l'urine ; son intérêt reste limité par la stabilité des réactifs et l'obtention d'un échantillon urinaire. La mesure de l'oxalémie est parfois utilisée dans le diagnostic de l'intoxication par l'EG [62]. Mais il n'existe pas, à notre connaissance, de méthode enzymatique rapide pour le dosage de l'oxalémie. L'intérêt de ce dosage est cependant moindre que celui de la glycolatémie qui, en plus d'étayer le diagnostic, permet de suivre et/ou expliquer l'acidose métabolique.

Fonctionnalités des méthodes enzymatiques

Domaine de mesure :

- sensibilité : elle est généralement suffisante dans le cadre de l'utilisation hospitalière. La limite de détection est inférieure à 0,05 g/l (env. 1 mmol/l) pour l'ensemble des trousse d'éthanol [17]. Des résultats inférieurs à 0,5 mmol/l (15 mg/l) pour le méthanol [27] et inférieurs à 1 mmol/l pour l'EG (env. 60 mg/l), le PG, l'acide glycolique et l'acide formique ont aussi été trouvés [28]

- linéarité : limitée à environ 10 mmol/l (0,6 g/l) dans certaines techniques pour l'EG [43,45-47], elle est suffisante (4 g/l) pour la plupart des trousse d'éthanol [17] ainsi que pour un certain nombre de techniques automatisées (40 mmol/l) pour l'EG (env. 2,5 g/l), le PG, l'isopropanol (2,4 g/l) et les acides glycolique et formique [28,48,50].

La reproductibilité des mesures est en général satisfaisante, les CV jour à jour publiés étant régulièrement inférieurs à 5 % pour les méthodes automatisées.

L'exactitude des méthodes enzymatiques a été testée par comparaison avec des méthodes physiques : CPG, HPLC, RMN,.. Pour l'éthanol la plupart des études ont

montré des résultats bien corrélés et, en moyenne, très légèrement inférieurs (-2 %) à ceux de la CPG [8-17]. Les prélèvements post-mortem sont moins bien corrélés, ce qui souligne encore la nécessité de recourir à la CPG dans le cadre médico-légal. Il ne peut être fait état ici des nombreuses corrélations publiées pour les autres molécules : elles sont généralement satisfaisantes pour leur utilisation hospitalière d'urgence. A titre d'exemple la figure 2 montre les comparaisons obtenues pour des méthodes d'EG, d'acide glycolique et d'acide formique [28].

Praticabilité : on attend d'une méthode d'urgence qu'elle soit disponible, aisément mise en œuvre et donne un résultat utilisable (chiffré) le plus vite possible. Sans qu'il puisse y avoir une règle générale, un délai maximum de 30 minutes entre la réception du prélèvement et l'obtention du résultat (calibration incluse) ne devrait pas être dépassé. Les trousse automatisées pour le dosage de l'éthanol répondent à tous ces critères. Quelques adaptations pour l'EG ont une praticabilité adéquate [28,41,45,46]. Le choix est plus restreint pour le méthanol, les acides glycolique et formique, le PG ou l'isopropanol [27,28,48,50].

Avantages des méthodes enzymatiques

Comparativement aux méthodes instrumentales (CPG, CLHP, RMN,..) les techniques enzymatiques sont susceptibles d'offrir un certain nombre d'avantages :

- l'appareillage nécessaire (spectrophotomètre ou automate de biochimie) est déjà présent dans la plupart des laboratoires ;
 - le même appareil peut réaliser les diverses mesures simultanément (éthanol, EG, acide glycolique,..) quand plusieurs colonnes, voire plusieurs systèmes chromatographiques sont nécessaires pour les mêmes demandes. Les techniques proposées pour mesurer en CPG simultanément les alcools et les glycols ou l'EG et le glycolate sont d'une mise en œuvre délicate [63] ou trop longue [64,65] ;
 - l'utilisation ponctuelle d'une méthode enzymatique est d'une mise en œuvre plus réaliste que celle d'une technique instrumentale (savoir-faire du personnel, appareillage prêt à fonctionner) ;
 - dans de nombreux cas le délai d'obtention d'un résultat chiffré est plus court avec une méthode enzymatique (pas d'étape de dérivation, analyse en parallèle de l'échantillon et des calibrants).
- Au total, les méthodes enzymatiques sont globalement mieux adaptées à l'urgence [46].

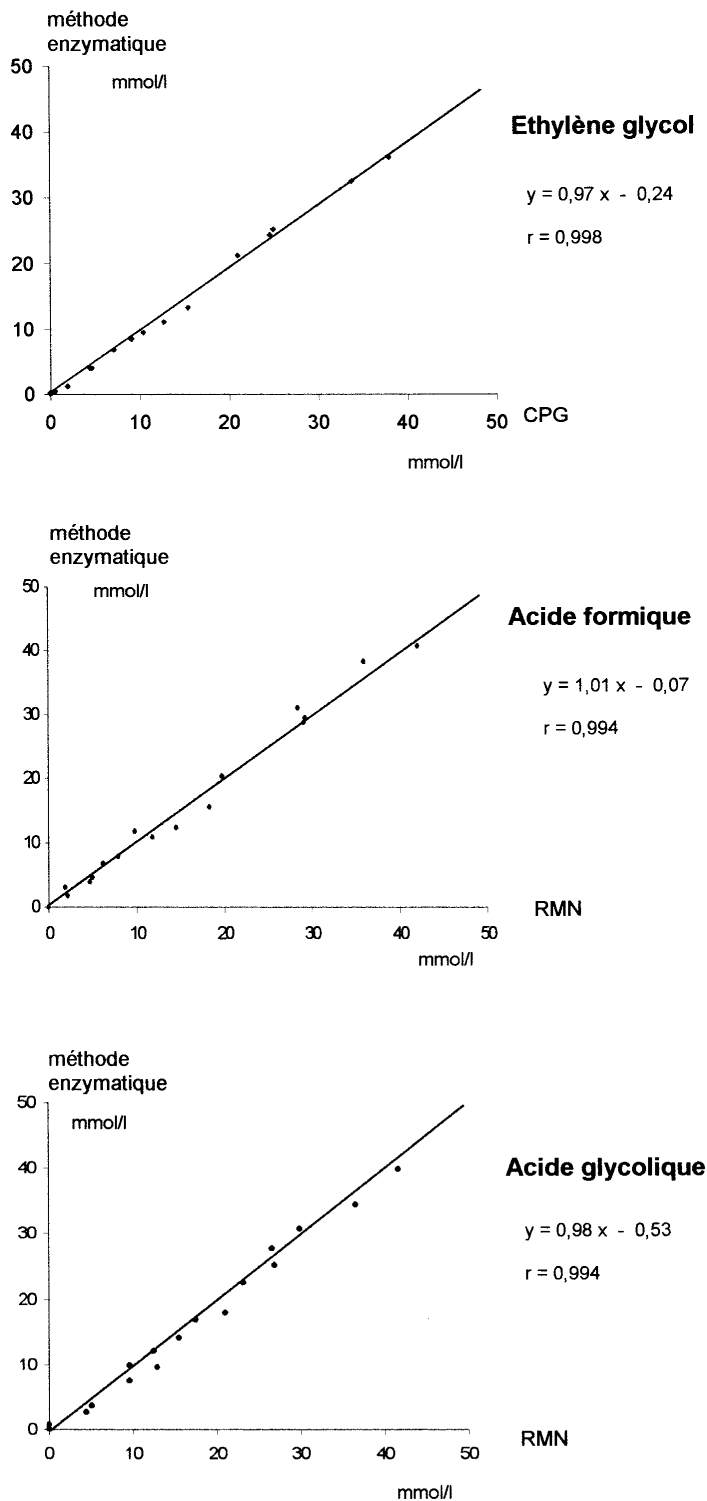


Figure 2 : Comparaison multicentrique de méthodes enzymatiques avec une méthode physique (tiré de [28]).

Les limites des méthodes enzymatiques

Le principal défaut des techniques enzymatiques est leur manque de spécificité. De nombreuses publications ont recensé ces problèmes. Et certaines méthodes

ont même pour base une interférence dont elles ont tiré parti : dosage de l'EG avec un réactif triglycérides [38, etc..], dosage du méthanol avec un réactif éthanol [26],...

On peut distinguer deux sortes d'interférences :

1)- les réactions croisées : l'enzyme accepte d'autres substrats que la molécule à doser (ex. : le 1-propanol pour l'ADH ou le lactate pour la glycolate oxydase). Cela peut conduire à trois types de résultats :

a - faux positifs : la molécule à doser était en fait absente dans l'échantillon

b - résultat en excès : la réponse de l'interférant s'additionne à celle de la molécule à doser

c - résultat par défaut : l'interférant consomme le co-substrat ou déplace l'équilibre de la réaction (ex. : le PG avec certaines méthodes de dosage de l'EG).

2)- les réactions parasites : par exemple présence de lactate et de LDH produisant du NADH (faux positif ou résultat en excès) ou présence d'ascorbate réduisant l' H_2O_2 formé (résultat par défaut)

Un aperçu des réactions croisées et parasites est donné dans le Tableau 1. On peut remarquer que l'étude des interférences reste limitée à peu de molécules dans de nombreuses publications. De plus les interférants sont rarement testés en présence du produit à doser (interférences correspondant aux types 1b ou 1c ci-dessus). Le dosage de l'EG est exemplaire pour ce type d'oubli méthodologique : la description princeps de Hansson [43] tenait bien compte de la réaction (rapide) du glycérol et du PG et faisait débiter les mesures de D.O. après un délai adéquat. Hansson, et d'autres auteurs ayant repris son schéma réactionnel, n'ont testé la possibilité d'une interférence qu'en l'absence d'EG. Ils n'ont pas remarqué le phénomène d'inhibition par le produit (le NADH) qui affecte les résultats d'EG quand l'échantillon contient aussi du glycérol ou du PG [66] Le phénomène a été souvent minimisé [41,46], à tel point qu'un récent article faisant revue sur l'EG n'a même pas évoqué le problème du PG ! [2]. Pourtant la chute du résultat d'EG peut être considérable : par exemple 13 mmol/l d'EG au lieu de 20 si l'échantillon contient aussi 5 mmol/l de PG [66]. Ce problème peut être corrigé : l'addition de glycérokinase [27] et l'adjonction d'une étape de recirculation du NADH, qui linéarise aussi la gamme d'étalonnage, permettent de gommer ces interférences (figure 3) [28].

Les interférences observées avec les méthodes enzymatiques sont donc fréquentes. Elles doivent, cependant, être replacées dans le contexte d'urgence clinique auquel sont destinées ces méthodes :

- certaines molécules ont peu de chances d'être rencontrées : c'est le cas des alcools primaires supérieurs (1-propanol, 1-butanol, etc..) dans le dosage de l'étha-

nol [67] ou du 1,2-butanediol dans celui du PG [48]. Ces deux molécules sont d'ailleurs fréquemment utilisées comme standard interne pour la CPG de l'éthanol et des glycols [63] ;

- dans d'autres cas, des concentrations élevées de l'interférant sont très improbables dans le sérum : c'est le cas des aldéhydes (acétaldéhyde, formaldéhyde, glycolaldéhyde, glyoxylate,..) [68-70] et du 2,3-butanediol en France [71,72] ;

- enfin il faut mettre à part les problèmes dus à des concentrations excessives d'hémoglobine libre [73] ou de lactate et de LDH [17,74-77] qui sont surtout rencontrées dans des prélèvements post-mortem, c'est-à-dire hors du champ de l'urgence hospitalière.

Conclusion

Le diagnostic et la prise en charge des intoxications aiguës par un alcool ou un glycol nécessite une réponse rapide et complète du laboratoire. Dans de nombreux sites hospitaliers cela n'est pas possible et le réanimateur base son attitude sur une suspicion [78]. Si un traitement antidotique est entrepris (éthanolisation ou fomepizole), il précède souvent le retour des résultats du laboratoire : les dosages sont trop lents, non pratiqués à certaines heures, envoyés à un autre laboratoire, etc.. [19]. Ils peuvent de plus être peu informatifs quand le dosage des métabolites n'est pas effectué (faut-il dialyser ?, que penser de ce trou anionique subnormal ?, de quoi est faite l'acidose métabolique ?...) [1]

Les techniques enzymatiques ont donc leur place. Elles ont une praticabilité, une disponibilité et une rapidité qui répondent bien aux besoins de l'urgence. Les techniques physiques, chromatographiques ou non, gardent leur rôle : analyse en urgence là où l'appareillage et l'organisation le permettent et dosage de toxiques plus rares pour lesquels il n'existe pas encore de technique enzymatique (ex. : diéthylène glycol, acides alcoxyacétiques,...).

Enfin, le peu de développement du dosage des métabolites, tant en France qu'ailleurs [1,79], pose la question de l'adéquation entre les besoins et les cultures : si la toxicologie analytique s'affine dans des techniques instrumentales de plus en plus sophistiquées, elle doit répondre aussi aux exigences hospitalières et intégrer une vue plus globale et plus pragmatique des intoxications aiguës [1]. Cette méconnaissance du problème n'est pas rare [2,19,80]. A titre d'exemple, le très classique "Ellenhorn's Medical Toxicology" [81] ne mentionne pas les techniques enzymatiques dans la liste de toutes les techniques pouvant être utilisées en toxicologie analytique...

Figure 3

Interférences du glycérol (fig. 3a) et du propylène glycol (fig. 3b) sur la mesure de l'éthylène glycol avec une glycéról déshydrogénase extraite d'Enterobacter

Fig. 3a : influence du glycérol dans les conditions opératoires décrites par Hansson [43,44] et après adjonction de glycérokinase au réactif [27,28]

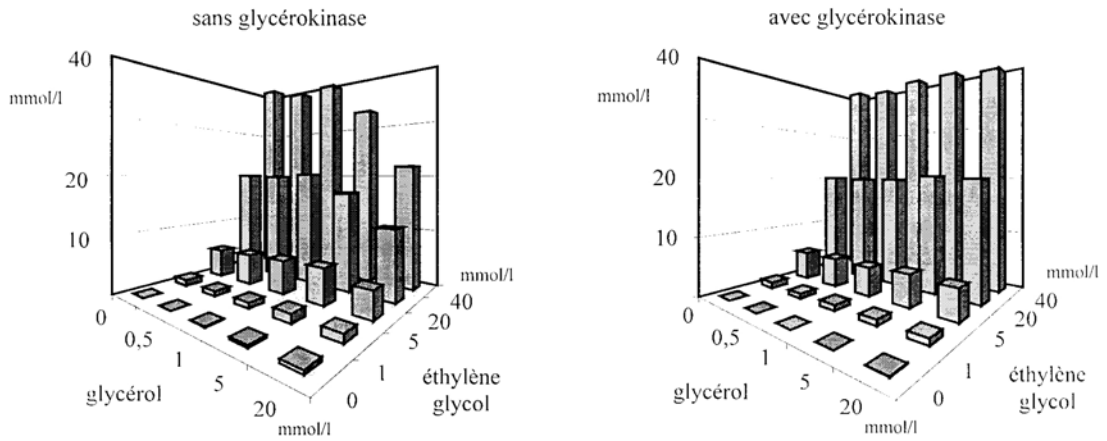
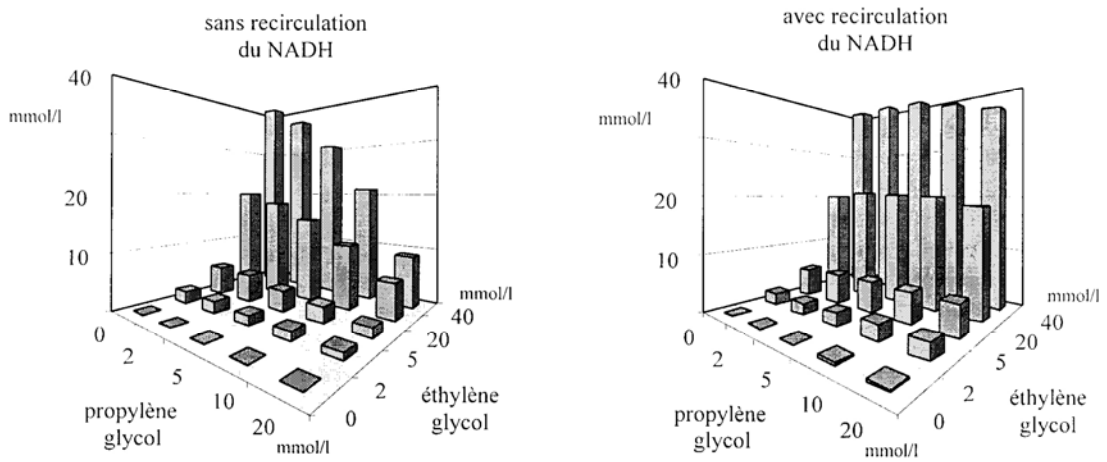


Fig. 3b : influence du propylène glycol dans les conditions décrites par Hansson [43,44] et après recirculation du NADH [28].



METHANOL

Principe :

- Le méthanol est oxydé par l'alcool oxydase; le peroxyde d'hydrogène formé est repris dans une réaction type Trinder (4-aminophénazone, peroxydase) (réactif R1).
- L'influence de l'éthanol présent dans le prélèvement est corrigée : en mesurant, dans chaque série, un calibrant contenant de l'éthanol et en dosant séparément l'éthanolémie du patient

Matériels et réactifs nécessaires :

- Coffret : Alcool-PAP (Bio-Mérieux 61 891)
- Ethanol pour analyses ; Méthanol pour analyses ; eau distillée ; NaCl 9 g/l
- Sérum bovin lyophilisé (par exemple : Bovine precision low Randox SL 1097)
- Pipettes jetables de 1, 5 et 10 ml ; pipettes réglables de 0 à 350 µl

Préparations d'avance :

- Solutions stock de méthanol (10 g/l) et d'éthanol (100 g/l) : préparées par pesée dans H₂O (si possible stérile). Stables au moins 6 mois à 4°C en flacons de verre.
- Calibrants méthanol 1 g/l : diluer le calibrant stock dans NaCl 9 g/l. Il est possible de le congeler par fractions de 1 ml : impérativement dans des tubes ou flacons en verre (ex. : tubes 'secs' Vacutainer 2 ml ou flacons pour passeur d'échantillons CG). Stable 1 mois à 4 °C ou 1 an congelé.
- Contrôle éthanol à 2 g/l : préparé dans du sérum bovin reconstitué. Déterminer sa valeur en éthanol avec la technique habituelle. Congeler par fractions de 1 ml, comme ci-dessus. Stable 1 an.

Le prélèvement : Sang sans anticoagulant : amener immédiatement au Laboratoire

Si l'analyse est retardée : décanter le sérum le plus tôt possible dans un tube en verre et placer à 4 °C (analyse sous 48 h) ou congeler. L'hémolyse entraîne une légère sous-estimation du résultat.

A l'arrivée du prélèvement :

- Immédiatement** : préparer le réactif R1 : dissoudre un flacon ③ avec 15 ml de ② (la dissolution est instantanée). Mélanger. Transvaser dans un tube large en plastique (oxygénation)
- Pendant la centrifugation : décongeler un calibrant méthanol 1 g/l (ou le préparer) et un contrôle sérique éthanol 2 g/l. Bien homogénéiser.

Procédure opératoire :

Adaptation au COBAS Mira Roche

- Calibration** : 2 points : zéro (NaCl 9 g/l) et calibrant méthanol 1 g/l
- Contrôle** : contrôle sérique à 2 g/l d'éthanol
- TRANSVASER le réactif dans un godet-réactif Mira (si possible en verre) juste avant de faire 'Start'

Measurement mode	absorb	Reagent cycle	1	Calc. Step A	endpoint
Reaction mode	R-S	volume	350		
Calibration mode	lin regr	Sample limit	no	Readings first	3
Reagent blank	no blank	Reaction direction	increase	last	6
Cleaner	no	check	on	Calib. Interval	on request
Wavelength	500			Standard pos.	Choix utilisateur
Decimal position	2	Convers. factor	1	std-1	0
Unit	g/l	offset	0	std-2	1
Post-dilution factor	no	Test range low	off	Replicate	dupl
Conc. Factor	no	high	off	Deviation	no
Sample cycle	1	Norm. Range low	no		
volume	2	high	no		
dilution name	H2O	Number of steps	1		
volume	5				

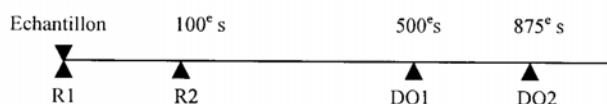
Calcul : soustraction de l'éthanolémie : corriger le résultat obtenu en méthanol sur le prélèvement x (soit : M_x) en tenant compte du résultat en méthanol du contrôle éthanol 2 g/l (soit : M_{E2}) et des taux d'éthanol du prélèvement (E_x) et du contrôle (E_{E2}) mesurés par ailleurs :

$$\text{Méthanol} = M_x - (E_x \times M_{E2}) / E_{E2}$$

ETHYLENE GLYCOL

Principe :

- L'éthylène glycol est oxydé par la glycérol deshydrogénase (réactif R2) en présence de NAD; le NADH formé est recyclé par une réaction type INT (INT + diaphorase) qui produit une coloration à 500 nm (réactif R1).
- Le glycérol du prélèvement est dérivé en glycéro-phosphate avant addition du réactif 2 (glycéro-kinase et ATP du réactif 1)
- Le réactif commercial utilisé a été modifié : il ne contient ni lipase (pas de formation de glycérol à partir des triglycérides du prélèvement), ni glycéro-phosphate deshydrogénase.
- Le recyclage du NAD permet la linéarisation de la calibration jusqu'à 40 mmol/l, ce qui a aussi pour effet de réduire l'interférence négative du propylène glycol éventuellement présent dans le prélèvement



Matériels et réactifs nécessaires :

- Flacon de réactif: Triglycérides (INT) modified (Sigma T9564)
- Enzyme : Glycérol deshydrogénase Enterobacter (Roche 258-555)
- Ethylène glycol (Sigma E 9129) ; sulfate d'ammonium pour analyses ; eau distillée
- Sérum bovin lyophilisé (exemple : Bovine precision low Randox SL 1097)
- Pipettes jetables de 1 et 5 ml ; pipettes réglables de 0 à 250 µl

Préparations d'avance :

- Calibrant stock d'éthylène glycol (1 mol/l) : peser 6,207 g d'éthylène glycol dans une fiole de 100 ml. Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée. Stable au moins 6 mois à 4°C.
- Calibrants 0 et 40 mmol/l et contrôle 20 mmol/l : par dilution du calibrant stock dans le sérum bovin reconstitué. Congeler par fractions de 1 ml. Stables au moins 2 ans.
- Solution molaire de sulfate d'ammonium : dissoudre 13,2 g de (NH₄)₂SO₄ dans 100 ml d'H₂O. Stable au moins 1 an à 4°C.

Le prélèvement : Sang sans anticoagulant : amener immédiatement au Laboratoire
Si l'analyse est retardée : décanter le sérum et placer à 4 °C (analyse sous 48 h) ou congeler.

A l'arrivée du prélèvement :

Pendant la centrifugation :

- Décongeler un calibrant zéro, un calibrant 40 mmol/l et un contrôle sériques. Bien homogénéiser.
- Réactif R1 : reprendre un flacon Triglycérides avec 10 ml d'eau distillée. Mélanger doucement.
- Réactif R2 : ajouter 100 µl de la suspension de glycérol deshydrogénase Roche à 1 ml de (NH₄)₂SO₄ molaire. Bien mélanger.

Procédure opératoire :

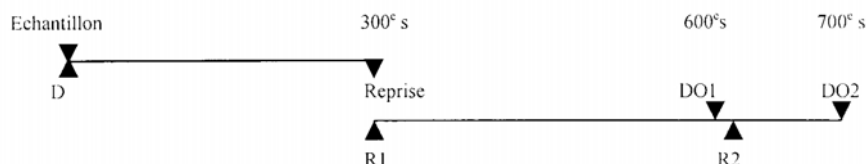
Adaptation au COBAS Mira Roche :

Measurement mode	absorb	Sample	cycle	1	Convers. factor	1
Reaction mode	R-S-SR1		volume	5	offset	0
Calibration mode	lin regr	dilution name	H2O		Test range low	off
Reagent blank	no blank		volume	5	high	off
Cleaner	no	Reagent	cycle	1	Norm. Range low	no
Wavelength	500		volume	250	high	no
Decimal position	1	Start R1	cycle	4	Number of steps	1
Unit	mmol/l		volume	50	Calc. Step A	endpoint
		dilution name	H2O		Readings first	20
Post-dilution factor	no		volume	10	last	35
Conc. Factor	no				Calib. Interval	on request
		Sample limit	no		Standard pos.	Choix utilisateur
		Reaction direction	increase		std-1	0
		check	on		std-2	40
					Replicate	dupl
					Deviation	no

ACIDE GLYCOLIQUE

Principe :

- Le glycolate est oxydé par la glycolate oxydase (réactif R2); le peroxyde d'hydrogène formé est repris dans une réaction type Trinder (4-aminophénazone, peroxydase) (réactif R1).
- Le lactate étant un substrat mineur de la glycolate oxydase est dérivé en pyruvate dans une étape préalable (réactif D)
- L'influence de l'acide ascorbique sur la réaction de Trinder est prévenue par la présence d'ascorbate oxydase (réactif R1). La présence d'acide urique est négligeable.



Matériels et réactifs nécessaires :

- Coffrets : Lactate UV (Roche 149 993), Acide Urique PAP (Roche 1 661 906)
- Glycolate oxydase (Sigma G 8260), Acide glycolique (Sigma G 8284)
- Sérum bovin lyophilisé (par exemple : Bovine precision low Randox SL 1097)
- Eau distillée ; NaCl 9 g/l
- Pipettes jetables de 1 et 5 ml ; pipettes réglables de 0 à 300 µl

Préparations d'avance :

- Calibrant stock d'acide glycolique (1 mol/l) : dissoudre 7,605 g d'acide glycolique dans env. 50 ml d'H₂O. Ramener le pH à 7,0 avec NaOH. Compléter à 100 ml. Stable au moins 1 an à 4°C.
- Calibrants 0 et 40 mmol/l et contrôle 20 mmol/l : diluer le calibrant stock dans du sérum bovin reconstitué. Congeler par fractions de 1 ml. Stables au moins 2 ans.

Le prélèvement : Sang sans anticoagulant : amener immédiatement au Laboratoire
Si l'analyse est retardée : décanter le sérum et placer à 4 °C (analyse sous 48 h) ou congeler.

A l'arrivée du prélèvement :

Pendant la centrifugation :

- Décongeler un calibrant zéro, un calibrant 40 mmol/l et un contrôle sériques. Bien homogénéiser.
- Réactif D : reprendre un flacon ① du coffret Lactate UV par 5 ml de ①a. Ajouter 120 µl de ②. Mélanger
- Réactif R1 : mélanger 4 ml du réactif ① du coffret Acide Urique avec 0,8 ml de ②. Mélanger
- Réactif R2 : ajouter 60 µl de la suspension de glycolate oxydase Sigma à 600 µl du réactif ② Acide Urique. Bien mélanger.

Procédure opératoire : *Adaptation au COBAS Mira Roche:*

Measurement mode	absorb	Sample cycle	1	Convers. factor	1
Reaction mode	D-R-S-SR1	volume	10	offset	0
Calibration mode	lin regr	dilution name	H2O	Test range low	off
Reagent blank	no blank	volume	5	high	off
Cleaner	no	Reagent cycle	1	Norm. Range low	no
Wavelength	550	volume	250	high	no
Decimal position	1	Start R1 cycle	6	Number of steps	1
Unit	mmol/l	volume	40	Calc. Step A	endpoint
		dilution name	H2O	Readings first	5
Post-dilution factor	no	volume	10	last	10
Conc. Factor	no			Calib. Interval	on request
Dilution name	<i>Choix utilisateur</i>	Sample limit	no	Standard pos.	<i>Choix utilisateur</i>
factor	20	Reaction direction	increase	std-1	0
time	300	check	on	std-2	40
std	factor			Replicate	dupl
				Deviation	no

NB : Ne pas oublier de définir la position rack pour le réactif D (dilution name) : elle doit être différente de celle des réactifs (test name)

Variante sans étape préalable de conversion du lactate :

L'acide lactique donne une faible réponse en présence de glycolate oxydase : un protocole sans étape préalable, plus simple et plus rapide, peut être utilisé sans affecter significativement le résultat en glycolate, sauf acidose lactique majeure. Le réactif D n'est plus nécessaire et le paramétrage devient :

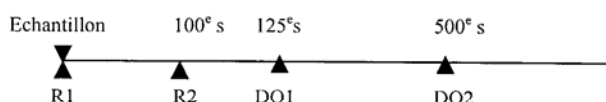
Measurement mode	absorb	Sample cycle	1	Convers. factor	1
Reaction mode	R-S-SR1	volume	2	offset	0
Calibration mode	lin regr	dilution name	H2O	Test range low	off
Reagent blank	no blank	volume	10	high	off
Cleaner	no	Reagent cycle	1	Norm. Range low	no
Wavelength	550	volume	250	high	no
Decimal position	1	Start R1 cycle	6	Number of steps	1
Unit	mmol/l	volume	40	Calc. Step A	endpoint
		dilution name	H2O	Readings first	5
Post-dilution factor	no	volume	10	last	10
Conc. Factor	no			Calib. Interval	on request
		Sample limit	no	Standard pos.	<i>Choix utilisateur</i>
		Reaction direction	increase	std-1	0
		check	on	std-2	40
				Replicate	dupl
				Deviation	no

NB : le résultat peut aussi être corrigé de la lactacidémie du patient en titrant dans la série un standard lactate (ex. : 20 mmol/l)

ACIDE FORMIQUE

Principe :

- L'acide formique est oxydé par la formate deshydrogénase (réactif R2) en présence de NAD; le NADH formé est recyclé par une réaction type INT (INT + diaphorase) qui produit une coloration à 500 nm (réactif R1).
- Le glycérol du prélèvement est dérivé en glycéro-phosphate avant addition du réactif 2 (glycéro-kinase et ATP du réactif 1)
- Le réactif commercial utilisé a été modifié : il ne contient ni lipase (pas de formation de glycérol à partir des triglycérides du prélèvement), ni glycéro-phosphate deshydrogénase.
- Le recyclage du NAD permet la linéarisation de la calibration jusqu'à 40 mmol/l.



Matériels et réactifs nécessaires :

- Flacon de réactif: Triglycérides (INT) modified (Sigma T9564)
- Enzyme : Formate deshydrogénase (Roche 244 678)
- Sérum bovin lyophilisé (par exemple : Bovine precision low Randox SL 1097)
- Formate de sodium pour analyses, eau distillée ; NaCl 9 g/l stérile
- Pipettes jetables de 1 et 5 ml ; pipettes réglables de 0 à 250 µl

Préparations d'avance :

- Calibrant stock d'acide formique (1 mol/l) : peser 6,801 g de formate de sodium ; dissoudre et compléter à 100 ml avec de l'eau distillée. Stable au moins 6 mois à 4°C.
- Calibrants 0 et 40 mmol/l et contrôle 20 mmol/l : par dilution du calibrant stock dans le sérum bovin reconstitué. Congeler par fractions de 1 ml. Stables au moins 2 ans.
- Solution de formate deshydrogénase : dissoudre le contenu d'un flacon de 80 U avec 5 ml de NaCl 9 g/l stérile ; conserver à 4 °C dans le flacon d'origine. Stable au moins 1 an.

Le prélèvement : Sang sans anticoagulant : amener immédiatement au Laboratoire
Si l'analyse est retardée : décanter le sérum et placer à 4 °C (analyse sous 48 h) ou congeler.

A l'arrivée du prélèvement :

Pendant la centrifugation :

- Décongeler un calibrant zéro, un calibrant 40 mmol/l et un contrôle sériques. Bien homogénéiser.
- Réactif R1 : reprendre un flacon Triglycérides avec 10 ml d'eau distillée. Mélanger doucement.
- Réactif R2 : prêt à l'emploi.

Procédure opératoire :

Adaptation au COBAS Mira Roche :

Measurement mode	absorb	Sample cycle	1	Convers. factor	1
Reaction mode	R-S-SR1	volume	3	offset	0
Calibration mode	lin regr	dilution name	H2O	Test range low	off
Reagent blank	no blank	volume	5	high	off
Cleaner	no	Reagent cycle	1	Norm. Range low	no
Wavelength	500	volume	250	high	no
Decimal position	1	Start R1 cycle	4	Number of steps	1
Unit	mmol/l	volume	10	Calc. Step A	endpoint
		dilution name	H2O	Readings first	5
Post-dilution factor	no	volume	10	last	20
Conc. Factor	no			Calib. Interval	on request
		Sample limit	no	Standard pos.	<i>Choix utilisateur</i>
		Reaction direction	increase	std-1	0
		check	on	std-2	40
				Replicate	dupl
				Deviation	no

Tableau I : Interférences observées avec les méthodes enzymatiques

1a : Dosage de l'éthanol

Réactif commercial	Fournisseur	Enzyme	Intérférences (en % mmol/mmol)*										Remarques	Référence				
			Méthanol	1-propanol	1-butanol	1-pentanol	Isopropanol	Ethylène glycol	Méthyl-glycol	Butyl-glycol	Acétaldéhyde	Formaldéhyde			Glycolaldéhyde	Acétone	Lactate + LDH	
TDX	Abbott	Alc. Oxydase Pichia p. ADH	>	>	>	>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	A	21	
EMIT	Dade	Alc. Oxydase Pichia p.	117	29			8									B	9	
EMIT	Dade	ADH	7,5	10	5		n.s.	9,5							16		22	
ADX	Abbott																	11
EMIT	Dade			17	4		n.s.	3							n.s.			74
EMIT	Dade						18											13
Aca	Dade	Alc. Oxydase Candida b.	n.s.	45	30	10	n.s.	n.s.	n.s.	4,6	n.s.	n.s.	25	n.s.	n.s.	C	14	
ADX / TDX	Abbott	ADH	n.s.	87	71	48	7,9	n.s.	n.s.	n.s.	5,4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		26,27	
Axsym	Abbott			n.s.	42	10,6	4,7	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
CX	Beckman			n.s.	99	48	21	6,9	n.s.	n.s.	n.s.	3,6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
Ektachem	Ortho			n.s.	87	44	23	7,9	n.s.	n.s.	n.s.	3,9	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		17
EMIT	Dade	ADH	n.s.	46	27	14	4,4	n.s.	n.s.	n.s.	-3,5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			
Ethyl alcohol	Roche			n.s.	14	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
Alcool	Eurobio			n.s.	13	4,2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
Alcool-PAP	BioMérieux			n.s.	74	44	23	4,7	n.s.	n.s.	n.s.	3,5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
			302	38	26	8,9	n.s.	n.s.	n.s.	3,4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			

* Résultat chiffré : réponse obtenue (en mmol/l de produit à doser) pour 100 mmol/l d'interférent
 > : peut donner des faux-positifs n.s. : pas d'interférence significative case vide : non testé

Remarques : A : Pas d'interférence significative pour : acides formique, pyruvique, salicylique, citrique, ascorbique et acétique, tert-butanol, glycérol, propylène glycol, glucose
 B : N'ont pas donné lieu non plus à une interférence significative : acide acéto-acétique et acide béta-hydroxy butyrique
 C : Les molécules ont été testées (50 mmol/l) en l'absence d'éthanol et en présence d'éthanol (0,92 g/l). N'ont pas donné lieu à une interférence significative (réponse ou déviation < 3 % mmol/mmol) : 2-butanol, isobutanol, tert-butanol, propylène glycol, glycérol, 1,3 propylène glycol, 1,2 1,3 2,3 et 1,4-butanediols, diéthylène glycol, acides formique, glycolique, lactique, acéto-acétique, glyoxylique, ascorbique (1 mmol/l) et béta-hydroxy butyrique, sorbitol, mannitol
 D : Les molécules ont été testées (100 mmol/l) en l'absence d'éthanol et en présence d'éthanol (0,92 g/l). N'ont pas donné lieu à une interférence significative (réponse ou déviation < 3% mmol/mmol) : propylène glycol, glycérol, éthyl-glycol, 2,3-butanediol, 2-butanol, méthyl-isobutylcétone, cyclohexanone, acides formique, glycolique, lactique, acéto-acétique et béta-hydroxy butyrique. La présence simultanée de lactate (50 mmol/l) et de LDH (10000 U/l) a donné une réponse estimée significative (>) quand le résultat dépassait 0,1 g/l en l'absence d'éthanol.

Ic : Dosages de l'éthylène glycol, du propylène glycol, de l'acide formique et de l'acide glycolique

Dosage	Pas d'interférence	Testé aussi en présence du produit à doser ?	Interférences (en % mmol/mmol)*								Remarques	Référence					
			Glycérol	Propylène glycol	1,2-butane-2,3-diol	2,3-butane-2,3-diol	Glycolaldéhyde	Acide glycolique	Béta-OH butyrate	Acide lactique			Lactate + LDH				
Ethylène glycol	Pas d'interférence		<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<				
	Ethanol et isopropanol		n.s.	n.s.		n.s.								A	39,40		
	Ethanol, méthanol, isopropanol et acétone		n.s.	n.s.			>						n.s.			43	
	£								>						B	72	
	££		Oui	>	<				>	n.s.	>				C	41	
Propylène glycol	Ethanol, méthanol et formiate		n.s.	n.s.		18										46	
	Glyoxylate, ascorbate et \$		<	<	<	49	-15										77
	\$\$		<	<	<	65									D	66	
	Ethylène glycol et \$		n.s.		95	n.s.									E	28	
	Ethylène glycol et \$\$		Oui	n.s.	n.s.	n.s.											48
Acide glycolique	Ethylène glycol et \$\$		Oui	n.s.	n.s.	n.s.											61
																	28
																	52
																	53
			Oui														27
	Ethylène glycol et \$\$	Oui	n.s.	n.s.	n.s.									F		28	

* Résultat chiffré : réponse obtenue (en mmol/l de produit à doser) pour 100 mmol/l d'interférent

> : réponse en excès < : réponse abaissée

B : variable (34 à 60 %) selon les concentrations de 2,3-butane-2,3-diol

C : variable selon les concentrations : exemple : le glycérol (10 mmol/l) augmente de 20 % la réponse de l'éthylène glycol à 5 mmol/l et le propylène glycol (5 mmol/l) la diminue de 25 %

D : la réponse du 2,3-butane-2,3-diol s'ajoute à celle de l'éthylène glycol ; les autres interférents sont sans effet en l'absence d'éthylène glycol et abaissent la réponse attendue en présence d'éthylène glycol (cf. figures 1a et 1b) ; le 1,2-butane-2,3-diol a le même effet que le propylène glycol

E : l'effet en présence d'éthylène glycol n'est sensible que si glycérol > 20 mmol/l ou si propylène glycol > 10 mmol/l (cf. figures 1c et 1d)

F : au delà de 20 mmol/l de lactate

£ : par d'interférence (< 8%) pour : méthanol, éthanol, 1-propanol, isopropanol, acétone, diéthylène glycol, glyoxylate, oxalate, acétaldéhyde et 1,3-propanediol

££ : pas d'interférence pour : éthanol, méthanol, propanol, acétone, butyl glycol, diéthylène glycol et 1,3-propanediol

\$: pas d'interférence (< 3 %) pour : méthanol, éthanol, isopropanol, diéthylène glycol, méthyl-glycol, butyl-glycol, acétone, formiate, acéto-acétate, 1-propanol, 1-pentanol, 1,3-propanediol, 1,3-butane-2,3-diol, 1,4-butane-2,3-diol, éthyl-glycol, mannitol, sorbitol, 2-butane-2,3-diol, acétaldéhyde

\$\$: pas d'interférence (< 3 %) pour : méthanol, éthanol, isopropanol, diéthylène glycol, méthyl-glycol, butyl-glycol, acétone, formiate, acéto-acétate ascorbate (2 mmol/l), acétate, salicylate, urée, glucose

n.s. : pas d'interférence significative case vide : non testé

1b : Dosages du méthanol et de l'isopropanol

Référence	Dosage	Pas d'interférence	Testé aussi en présence du produit à doser ?	Interférences (en % mmol/mmol)*							Remarques		
				Ethanol	1-Propanol	1-butanol	2-butanol	isobutanol	1-pentanol	2-pentanol		formaldéhyde	
Méthanol				8,8									
		\$	Oui	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	∨	A	32,33
Isopropanol		\$\$	Oui	n.s.									26,27
				n.s.			83						28
													49

* Interférence = réponse ou déviation > 3 mmol/l en présence de 100 mmol/l d'interférent

> : réponse en excès
< : réponse abaissée

n.s. : pas d'interférence significative

case vide : non testé

Remarque A : l'interférence du formaldéhyde est propre à ce réactif qui contient de la formaldéhyde déshydrogénase

\$: les molécules ont été testées (50 mmol/l) en l'absence d'éthanol et en présence d'éthanol (0,92 g/l). N'ont pas donné lieu à une interférence significative les molécules ci-dessus (£) plus : isopropanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol, 1,3 propylène glycol, 1,2 1,3 et 1,4-butanediols, acide ascorbique (1 mmol/l), acide glyoxylique, acétaldéhyde, glycolaldéhyde, sorbitol et mannitol

\$\$: pas d'interférences (< 3 %) pour : éthylène glycol, propylène glycol, 2,3-butanediol, diéthylène glycol, méthyl-glycol, butyl-glycol, glycérol, acides formique, glycolique, lactique, acéto-acétique et béta-hydroxy butyrique, acétone, isopropanol, ascorbate (2 mmol/l), acétate, salicylate, urée, glucose et lactate + LDH

\$\$\$: pas d'interférence (< 3 %) pour : éthylène glycol, propylène glycol, 2,3-butanediol, diéthylène glycol, méthyl-glycol, butyl-glycol, glycérol, acides formique, glycolique, lactique, acéto-acétique et béta-hydroxy butyrique, acétone, méthanol, tert-butanol, isopentanol, 1,3-propanediol, 1,2-butaneediol, 1,3-butanediol, 1,4-butanediol, éthyl-glycol, mannitol, sorbitol, acide glyoxylique, acétaldéhyde.

Références

1. Malandain H., Cano Y. Rôle du laboratoire dans les intoxications aiguës par un alcool ou un glycol. Journée Scientifique "Alcools et glycols", Paris, 8 décembre 1999, pp.----
2. Eder A.F., McGrath C.M., Dowdy Y.G., Tomaszewski J.E., Rosenberg F.M., Wilson R.B., Wolf B.A., Shaw L.M. Ethylene glycol poisoning: toxicokinetic and analytical factors affecting laboratory diagnosis. *Clin. Chem.* 1998 ; 44 : 168-77
3. Fraser A.D. Importance of glycolic acid analysis in ethylene glycol poisoning. *Clin. Chem.* 1998 ; 44 : 1769-70
4. Moreau C.L., Kerns W. 2nd, Tomaszewski C.A., McMartin K.E., Rose S.R. Ford M.D., Brent J. Glycolate kinetics and hemodialysis clearance in ethylene glycol poisoning. META Study Group. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1998 ; 36 : 659-66
5. Jacobsen D., McMartin K.E. Antidotes for methanol and ethylene glycol poisoning. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1997 ; 35 : 127-43
6. Osterloh J.D., Pond S.M., Grady S., Becker C.E. Serum formate concentration in methanol intoxication as a criterion for hemodialysis. *Ann. Intern. Med.* 1986 ; 104 : 200-3
7. Mahieu P., Hassoun A., Lauwerys R. Predictors of methanol intoxication with unfavorable outcome. *Hum. Toxicol.* 1989 ; 8 : 135-7
8. Caplan Y.H., Levine B. The analysis of ethanol in serum, blood, and urine: a comparison of the TDx REA ethanol assay with gas chromatography. *J. Anal. Toxicol.* 1986 ; 10 : 49-52
9. Slama G., Bruzzo F., Dupeyron J.P., Lassechere M., Dauchy F. Ketone bodies do not give falsely positive alcohol tests. *Diabetic Med.* 1989 ; 6 : 142-3
10. Sutheimer C.A., Lavins E., King T. Evaluation of the Syva ETS-PLUS Ethyl Alcohol Assay with application to the analysis of antemortem whole blood, routine postmortem specimens, and synovial fluid. *J. Anal. Toxicol.* 1992 ; 16 : 119-24
11. Jortani S.A., Poklis A. Emit ETS plus ethyl alcohol assay for the determination of ethanol in human serum and urine. *J. Anal. Toxicol.* 1992 ; 16 : 368-71
12. Urry F.M., Kralik M., Wozniak E., Crockett H., Jennison T.A. Application of the Technicon Chem 1+ chemistry analyzer to the Syva Emit ethyl alcohol assay in plasma and urine. *J. Anal. Toxicol.* 1993 ; 17 : 287-91
13. Jortani S.A., Poklis A. Evaluation of the ADx REA assay for determination of ethanol in serum and urine. *J. Anal. Toxicol.* 1993 ; 17 : 307-9
14. Sadeg N., Fourcault-Eddi M. Détermination de l'alcoolémie par la méthode Emit ST. Comparaison avec la méthode de chromatographie en phase gazeuse. *Ann. Biol. Clin.* 1994 ; 52 : 463-5
15. Alt A., Reinhardt G. Die Genauigkeit der Blutalkoholbestimmung mit Head Space GC, ADH und dem REA Ethanol Assay für das Axsym-System: ein Methodenvergleich. *Blutalkohol* 1996 ; 33 : 209-14
16. Mebs D., Schmidt K., Bratzke H. Einsatz der ADH/REA-Methode (Abbott TDx-REA) in der forensischen Blutalkoholbestimmung. *Blutalkohol* 1996 ; 33 : 71-7
17. Malandain H., Bourdon J.H., Cano Y., Capolaghi B., David P., Lachâtre G., Lacroix C., Lamiable D., Lardet G., Lenormand I., Levillain P., Pollet J., Verchain S., Vincent F. Etude multicentrique du dosage automatisé de l'éthanolémie par méthode enzymatique. *Toxicorama* 1997 ; 9 : 157-69
18. Caplan Y.H., Levine B. Evaluation of the Abbott TDx-radiative energy attenuation (REA) ethanol assay in a study of 1105 forensic whole blood specimens. *J. Forensic Sci.* 1987 ; 32 : 55-61
19. Church A.S., Witting M.D. Laboratory testing in ethanol, methanol, ethylene glycol, and isopropanol toxicities. *J. Emerg. Med.* 1997 ; 15 : 687-92
20. Young E., Rafter-Tadgell B. Use of a competitive inhibitor in a kinetic enzymatic method for measuring ethanol in serum. *Clin. Chem.* 1987 ; 33 : 2296-98
21. Prencipe L., Iaccheri E., Manzati C. Enzymic alcohol assay: a new colorimetric method based on measurement of hydrogen peroxide. *Clin. Chem.* 1987 ; 33 : 486-9
22. Lubrano G.J., Faridnia M.H., Palleschi G., Guilbault G.G. Amperometric alcohol electrode with extended linearity and reduced interferences. *Anal. Biochem.* 1991 ; 198 : 97-103
23. Gonchar M.V., Maidan M.M., Moroz O.M., Woodward J.R., Sibirny A.A. Microbial O₂- and H₂O₂-electrode sensors for alcohol assays based on the use of permeabilized mutant yeast cells as the sensitive bioelements. *Biosensors Bioelectronics* 1998 ; 13 : 945-52
24. Tagliaro F., Dorizzi R., Ghielmi S., Marigo M. Direct injection high-performance liquid chromatographic method with electrochemical detection for the determination of ethanol and methanol in plasma using an alcohol oxidase reactor. *J. Chromatogr.* 1991 ; 566 : 333-9
25. Marko-Varga G., Johansson K., Gorton L. Enzyme-based biosensor as a selective detection unit in column liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1994 ; 660 : 153-67
26. Malandain H., Cano Y., Goullé J.P. A simple method to overcome methanol interference with alcohol-oxidase reagents and to measure simultaneously plasma ethanol and methanol. in Galteau M.M., Siest G. et Henny J. eds. *Biologie Prospective: comptes rendus du 8e Colloque de Pont-à-Mousson.* Paris : John Libbey Eurotext, 1993 ; 405-8
27. Malandain H., Cano Y. Des méthodes enzymatiques simples, utilisables en garde, pour doser le méthanol, l'éthylène glycol et l'acide glycolique. *Toxicorama* 1995 ; 7 : 31-7

28. Malandain H., Cano Y., Charlier C., Houdret N., Lardet G., Mura P. Diagnostic d'urgence d'une intoxication au méthanol ou à l'éthylène glycol: évaluation de méthodes non-chromatographiques. 1ères Journées Internationales de Toxicologie Hospitalière, Liège, 22-23 oct. 1998
29. Argall M.E., Smith G.D. The use of trehalose-stabilized lyophilized methanol dehydrogenase from *Hyphomicrobium X* for the detection of methanol. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1993 ; 30 : 491-7
30. Sahm H., Wagner F. Microbial assimilation of methanol: the ethanol- and methanol-oxidizing enzymes of the yeast *Candida boidinii*. *Eur. J. Biochem.* 1973 ; 36 : 250-6
31. Giles H.G., Hirst M., Hoffman E., Kapur B.M. A color test for methanol. *Clin. Chem.* 1993 ; 39 : 693
32. Vinet B. An enzymatic assay for the specific determination of methanol in serum. *Clin. Chem.* 1987 ; 33 : 2204-8
33. Vinet B. Enzymic methanol determination: toxic concentrations of ethanol may give positive values. *Clin. Chem.* 1988 ; 34 : 1944
34. Eckfeldt J.H., Light R.T. Kinetic ethylene glycol assay with use of yeast alcohol dehydrogenase. *Clin. Chem.* 1980 ; 26 : 1278-80
35. Anderson P., Jacobson C. Cross reactivity of ethylene glycol and other polyalcohols with an alcohol dehydrogenase reagent for measuring ethanol. *Clin. Chem.* 1992 ; 38 : 1018
36. Cano Y., Malandain H. Interférence du propylène glycol dans le dosage enzymatique des triglycérides. *Ann. Biol. Clin.* 1982 ; 40 : 606-8
37. Ng R.H., Guilmet R., Altaffer M., Statland B.E. Falsely high results for triglycerides in patients receiving intravenous nitroglycerin. *Clin. Chem.* 1986 ; 32 : 2098-9
38. Glick M.R., Enockson C.B., Taylor D.K., Trent J.L. Sample interaction (carryover) on the aca when glycol-stabilized serum is used. *Clin. Chem.* 1982 ; 28 : 1821
39. Ryder K.W. Emergency screening for ethylene glycol in serum. *Clin. Chem.* 1986 ; 32 : 1574-7
40. Ochs M.L., Glick M.R., Ryder K.W., Moorehead W.R. Improved method for emergency screening for ethylene glycol in serum. *Clin. Chem.* 1988 ; 34 : 1507-8
41. Blanford D.E., Desjardins P.R. A rapid method for measurement of ethylene glycol. *Clin. Biochem.* 1994 ; 27 : 25-30
42. Mohammad A.A., Petersen J.R., Okorodudu A.O. Monitoring NAD-mediated enzymatic reactions for ethylene glycol determination via lanthanide sensitization. *CLIN CHEM* 1994 ; 40 : 1074
43. Hansson P., Masson P. Simple enzymatic screening assay for ethylene glycol in serum. *Clin. Chim. Acta.* 1989 ; 182 : 95-102
44. Hansson P. Kinetic enzymatic assay for ethylene glycol. *Clin. Chim. Acta.* 1990 ; 189 : 243-4
45. Standefer J., Blackwell W. Enzymatic method for measuring ethylene glycol with a centrifugal analyzer. *Clin. Chem.* 1991 ; 37 : 1734-6
46. Mahly M., Lardet G., Vallon J.J. Automated Cobas Mira kinetic enzymatic assay for ethylene glycol applied to emergency situations. *J. Anal. Toxicol.* 1994 ; 18 : 269-71
47. Goullé J.P., Allion M.J., Anagnostides J.G. Ethylène glycol : intérêt d'une méthode enzymatique en toxicologie d'urgence. *Toxicorama* 1995 ; 7 : 15-20
48. Malandain H., Cano Y. An enzymatic assay for the emergency diagnosis of propylene glycol intoxication. *Clin. Chem.* 1996 ; 42 : 213
49. Wang J., Naser N., Lopez D. Organic-phase biosensing of secondary alcohols with a *Ta. brockii* alcohol dehydrogenase electrode. *Biosensors Bioelectronics* 1994 ; 9 : 225-30
50. Malandain H., Cano Y. Two enzymatic assays for emergency diagnosis of isopropanol and acetone intoxications. *Clin. Chem.* 1995 ; 41 : 120
51. Fraser A.D., MacNeil W. Colorimetric and gas chromatographic procedures for glycolic acid in serum: the major toxic metabolite of ethylene glycol. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1993 ; 31 : 397-405
52. Kasidas G.P., Rose G.A. A new enzymatic method for the determination of glycolate in urine and plasma. *Clin. Chim. Acta.* 1979 ; 96 : 25-36
53. Bais R., Nairn J.M., Potezny N., Rofe A.M., Conyers R.A.J., Bär A. Urinary glycolate measured by use of (s)-2-hydroxy-acid oxidase. *Clin. Chem.* 1985 ; 31 : 710-3
54. Mizon C., Mizon J. Le dosage enzymatique de l'acide formique urinaire. *Ann. Biol. Clin.* 1986 ; 44 : 414
55. Zoppi F., Montalbetti N. Large-scale screening determination of formate as a tool for assessing severity of methanol intoxication. *Clin. Chem.* 1986 ; 32 : 2002-3
56. Ogata M., Iwamoto T. Enzymatic assay of formic acid and gas chromatography of methanol for urinary biological monitoring of exposure to methanol. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 1990 ; 62 : 227-32
57. Makar A.B., Tephly T.R. Improved estimation of formate in body fluids and tissues. *Clin. Chem.* 1982 ; 28 : 385
58. Grady S., Osterloh J. Improved enzymic assay for serum formate with colorimetric endpoint. *J. Anal. Toxicol.* 1986 ; 10 : 1-5
59. Shahangian S., Ash K.O., Rollins D.E. An enzymatic method for the analysis of formate in human plasma. *J. Anal. Toxicol.* 1984 ; 8 : 273-6
60. Höpner T., Knappe J. Formic acid: determination with formate dehydrogenase. in Bergmeyer H.U. ed. *Methods of enzymatic analysis*, vol. 3. New York : Academic Press, 1974 ; 1551-5
61. Buttery J.E., Chamberlain B.R. A simple enzymatic method for the measurement of abnormal levels of formate in plasma. *J. Anal. Toxicol.* 1988 ; 12 : 292-4
62. Gillet Y., Gaulier J.M., Floret D., Cochat P. Histoire d'antigel. *Arch. Ped.* 1996 ; 3 : 612-3

63. Livesey J.F., Perkins S.L., Tokessy N.E., Maddock M.J. Simultaneous determination of alcohols and ethylene glycol in serum by packed- or capillary-column gas chromatography. *Clin. Chem.* 1995 ; 41 : 300-5
64. Cheung S.T., Lin W.N. Simultaneous determination of methanol, ethanol, acetone, isopropanol and ethylene glycol in plasma by gas chromatography. *J. Chromatogr.* 1987 ; 414 : 248-50
65. Yao H.H., Porter W.H. Simultaneous determination of ethylene glycol and its major metabolite, glycolic acid, in serum by gas chromatography. *Clin. Chem.* 1996 ; 42 : 292-7
66. Malandain H., Cano Y. Interferences of glycerol, propylene glycol, and other diols in the enzymatic assay of ethylene glycol. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1996 ; 34 : 651-4
67. Litovitz T.L., Klein-Schwartz W., Dyer K.S., Shannon M., Lee S., Powers M. 1997 annual report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. *Am. J. Emerg. Med.* 1998 ; 16 : 443-97
68. McCarver-May D.G., Durisin L. An accurate, automated, simultaneous gas chromatographic headspace measurement of whole blood ethanol and acetaldehyde for human in vivo studies.. *J. Anal. Toxicol.* 1997 ; 21 : 134-41
69. Burkhart K.K., Kulig K.W., McMartin K.E. Formate levels following a formalin ingestion. *Vet. Hum. Toxicol.* 1990 ; 32 : 135-7
70. Downie A., Khattab T.M., Malik M.I.A., Samara I.N. A case of percutaneous methanol toxicity. *Occup Med Oxford* 1992 ; 42 : 47-9
71. Jones A.W. 2,3-butanediol in blood from drinking technical alcohol containing 2-butanone. *Lancet* 1991 ; 338 : 1090
72. Nilsson L., Jones A.W. 2,3-butanediol: a potential interfering substance in the assay of ethylene glycol by an enzymatic method. *Clin. Chim. Acta.* 1992 ; 208 : 225-9
73. Gadsden R.H. Study of forensic and clinical source hemoglobin interference with the duPont aca ethanol method. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1986 ; 16 : 399-406
74. Badcock N.R., O'Reilly D.A. False-positive EMIT-st ethanol screen with post-mortem infant plasma. *Clin. Chem.* 1992 ; 38 : 434
75. Thede-Reynolds K., Johnson G.F. False-positive ethanol results by EMIT. *Clin. Chem.* 1993 ; 39 : 1143
76. Nine J.S., Moraca M., Virji M.A., Rao K.N. Serum-ethanol determination: comparison of lactate and lactate dehydrogenase interference in three enzymatic assays. *J. Anal. Toxicol.* 1995 ; 19 : 192-6
77. Eder A.F., Dowdy Y.G., Gardiner J.A.M., Wolf B.A., Shaw L.M. Serum lactate and LDH in high concentrations interfere in enzymatic assay of ethylene glycol. *Clin. Chem.* 1996 ; 42 : 1489-91
78. Darchy B., Abruzzese L., Pitiot O., Figueredo B., Domart Y. Delayed admission for ethylene glycol poisoning: lack of elevated serum osmolal gap. *Intens. Care Med.* 1999 ; 25 : 859-61
79. Kearney J., Rees S., Chiang W. Availability of serum methanol and ethylene glycol levels: a national survey. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1997 ; 35 : 509
80. Winek C.L., Wahba W.W. Serum-ethanol determination: comparison of lactate and LDH interference in three enzymatic assays. *J. Anal. Toxicol.* 1996 ; 20 : 211-2
81. Ellenhorn M.J., Schonwald S., Ordog G., Wasserberger J., Ellenhorn S.S. Diagnostic procedures. in *Elenhorn's medical toxicology: diagnosis and treatment of human poisoning*, 2nd edition. Baltimore: Williams and Wilkins, 1997: 47-65

Alcoolémie : aspects médico-légaux

Blood ethanol in legal medicine

J.-P. GOULLÉ*, C. LACROIX

Laboratoire de Pharmacocinétique et de Toxicologie Clinique, Groupe Hospitalier
BP 24 - 76083 LE HAVRE Cedex - Tél : 33 2 32 73 32 18 - Fax : 33 2 32 73 32 38

*Auteur à qui adresser la correspondance : Docteur Jean-Pierre GOULLÉ,
Laboratoire de Pharmacocinétique et de Toxicologie Clinique, Groupe Hospitalier - BP 24 - 76083 LE HAVRE
Tél : 33 2 32 73 32 23 - Fax : 33 2 32 73 32 38

RÉSUMÉ

Après un rappel de la réglementation française concernant l'alcoolémie, les auteurs passent en revue l'ensemble des problèmes posés par l'interprétation des résultats aux biologistes experts et aux laboratoires hospitaliers, ainsi que les rapports avec les autorités judiciaires. Les données récentes concernant les échanges gazeux d'éthanol au niveau pulmonaire permettent d'apporter une réponse à un vieux débat contradictoire concernant la relation alcoolémie-éthylométrie. Les derniers acquis en matière de métabolisme digestif de l'éthanol éclairent en partie la discussion sur la grande variabilité de ce métabolisme.

MOTS-CLÉS

alcoolémie, médico-légal.

SUMMARY

After a reappraisal of the French legislation concerning blood alcohol levels, the authors review the totality of problems resulting from the interpretation of results as well as the relationship to judicial authorities for expert biologists and hospital laboratories. Recent results concerning the gaseous exchange of ethanol at the pulmonary level give a response to the long lasting contradictory debate concerning the ratio, blood alcohol levels-ethylometry. The results of recent studies on the digestive metabolism of ethanol explain, at least partly, the great variability.

KEY-WORDS

Blood alcohol levels, legal medicine.

Introduction

Depuis la loi du 8 décembre 1983 instituant une concentration maximale autorisée d'éthanol dans l'air expiré et la mise à la disposition des forces de l'ordre d'éthylomètres, le nombre et la nature des alcoolémies adressés aux biologistes experts et aux laboratoires hospitaliers depuis 1986 s'est considérablement modifié. Les prélèvements sanguins concernent les sujets ne pouvant souffler dans l'éthylomètre -blessés le plus souvent- ou les cadavres. L'effondrement du nombre d'alcoolémies et la "sélection" rendent la pratique quotidienne de l'expertise beaucoup plus difficile et posent de manière plus aiguë celui de la responsabilité de l'expert ou des laboratoires hospitaliers désignés.

A l'heure actuelle, deux méthodes sont reconnues au plan légal : la méthode de Cordebard faisant appel à une distillation préalable et la chromatographie en phase gazeuse (CPG). La méthode enzymatique ne peut être utilisée que pour le diagnostic clinique. Tous les résultats rendus par cette méthode sont entachés de nullité dans le cadre de la loi. Aujourd'hui seule la CPG, impliquant un investissement coûteux, est utilisée en routine, la méthode de Cordebard étant pratiquement abandonnée. D'ailleurs, le législateur ne s'y est pas trompé puisque la cotation par CPG (B120) est supérieure à celle par Cordebard (B50). Dans de nombreux pays, une distinction encore plus importante est faite entre l'alcoolémie médicale et l'alcoolémie médico-légale avec des écarts de tarification parfois considérables pouvant atteindre un facteur dix. En France, la reconnaissance de cette compétence et technicité particulière ne date que de mai 1997. Elle doit être mieux affirmée, et le chemin est encore long pour situer notre pays dans la moyenne Européenne.

Aspects réglementaires

Rappel des textes en vigueur

Nous nous bornerons à indiquer les références des textes en vigueur. Les références des textes plus anciens peuvent être consultés dans la revue réalisée par M. Deveaux (1).

Dosage sanguin : articles R25 et R26 du code des débits de boissons.

Décret 71-819 du 1/10/1971 (J.O. DU 5/10/1971) : l'analyse de contrôle (flacon n°2) peut être confiée au second biologiste expert. La durée de conservation du sang est de 9 mois.

Arrêtés du 27/09/1972 (J.O. du 30/11/1972) : méthodes et sites anatomiques de prélèvement in vivo et post mortem, ainsi que la concentration en fluorure (0.4 à

0.5 %) et les modalités détaillées de la méthode de dosage (Cordebard).

Arrêté du 6/3/1986 (J.O. du 16/3/1986) : une seconde méthode est reconnue : la CPG.

A ce jour seules la CPG et la méthode de Cordebard sont reconnues au plan légal.

Décret du 29/8/1995 (J.O. du 15/9/95) :

- seuil contraventionnel (tribunal de police) alcoolémie ≥ 0.5 g p.1000 (0.25 mg/L d'air expiré). Retrait de 3 points – amende 900 francs.

- seuil délictuel (tribunal correctionnel) alcoolémie ≥ 0.8 g p. 1000 (0.40 ml/L d'air expiré). Sanctions plus lourdes, retrait de 6 points ou plus, amendes plus élevées. Un projet est à l'étude visant à instaurer l'absence totale d'alcool chez les jeunes conducteurs.

Décret du 6/2/1996 : nouveaux modèles des fiches A, B et C. Il est rappelé que le dosage doit être effectué conformément à l'une des deux méthodes agréées, celle-ci doit être précisée dans une case prévue à cet effet.

Décret 97-524 du 26/5/1997 (J.O. du 28/5/1997) : alcoolémie par CPG = B120, par Cordebard = B50, l'enzymologie n'est pas reconnue.

Ethylotests et Ethylomètres : arrêté du 21/3/1983 relatif à l'homologation des ethylotests.

Loi n°8-1345 du 8/12/1983 (J.O. du 9/12/1983) : elle prévoit l'utilisation d'ethylotests électroniques et d'éthylomètres.

Décret 85-1519 et arrêté du 31/12/1985 (J.O. du 7/1/1986) : réglementation des performances minimales des ethylotests et ethylomètres. Fixation de la norme NFX 20701 toujours en vigueur pour les ethylomètres. Essais et examens d'approbation ou de contrôle sont effectués par le Laboratoire national d'essais. Il n'existe plus que deux appareils homologués et distribués en France : le Drager 7110 Allemand (juillet 99), le Seres S.679 (séries T et E).

Décret 86-70 article R14 du 15/1/1986 (J.O. du 16/1/1986) : modalités d'utilisation des ethylomètres : les premiers appareils sont mis sur le marché en mars 1986.

Arrêté du 5/3/1992 modifiant l'arrêté du 31/12/1985 (J.O. du 21/3/1992) : construction, vérification et utilisation d'éthylomètres.

Arrêté du 10/4/1995 modifiant l'arrêté du 21/3/1983 (J.O. du 22/4/1995). Relatif aux ethylotests de catégorie A et B. Homologation : attribution et retrait, commission d'homologation.

Les experts et les laboratoires hospitaliers

La réalisation d'une alcoolémie médico-légale est un acte judiciaire, de ce fait celle-ci est soumise à un certain nombre de règles. Le législateur, à l'occasion de la mise en œuvre de la procédure de rétention du permis de conduire, a introduit deux cas de figure :

- Premier cas : il s'agit d'un crime ou délit, seul un expert figurant sur la liste arrêtée par la Cour d'Appel peut être désigné. L'officier de police judiciaire (OPJ) agissant sous couvert du procureur de la République, ou le magistrat instructeur peuvent toujours désigner un biologiste (réquisition ou ordonnance) pour procéder à la détermination de l'alcoolémie-biologiste qui devra prêter serment- mais la disposition est rarement appliquée. Cette procédure peut être d'ailleurs étendue à tout examen, exception faite des actes réservés soumis à agrément. Le biologiste désigné, s'il accepte la mission, est tenu de mettre en œuvre une méthode légale (Cordebar ou CPG).

- Second cas : il s'agit du contrôle du taux d'alcoolémie des conducteurs automobiles, il peut être fait appel aux laboratoires des hôpitaux publics ou privés participant au service public. L'alcoolémie n'est pas adressée nominativement à l'expert comme dans le premier cas, mais au laboratoire de l'hôpital (circulaire DSG/62//2D du 30/1/1986, non parue au J.O.). Cette circulaire précise : "bien entendu, les laboratoires hospitaliers ne peuvent utiliser pour effectuer ces analyses que les techniques définies par arrêté ministériel, comme le prévoit l'article R25 du code des débits de boissons et des mesures contre l'alcoolisme". Ceci exclut l'emploi d'une méthode enzymatique et engage la responsabilité du biologiste et du directeur de l'établissement. Par ailleurs, ces laboratoires ne sont pas habilités à réaliser des contre-expertises.

Mode de désignation des experts

Les listes d'experts en matière d'alcoolémie (ou pour toute autre activité) sont révisées annuellement par chaque cour d'appel après avis du tribunal de grande instance (TGI) auprès duquel l'intéressé fait sa demande. Le dossier doit être déposé avant le 1^{er} mars de chaque année. Le procureur de la République instruit le dossier et émet un avis. A Paris, un avocat général est chargé des experts. La cour d'appel se réunit au mois de novembre avec des représentants de chaque TGI (procureur, président de TGI, autres magistrats) et arrête la liste en fonction de différents critères : nombre d'experts et volume d'activité des experts dans une rubrique donnée, compétence du candidat. Après la prestation de serment qui a généralement lieu en

décembre à la cour d'appel, l'expert peut être désigné. Chaque année, il doit remettre un rapport d'activité et une demande de renouvellement auprès du TGI de son ressort.

Critères pour la désignation des experts en matière d'alcoolémie

A la demande des autorités judiciaires, la Compagnie Nationale des Biologistes et Analystes Experts (CNBE), en liaison avec la Sté Française de Toxicologie Analytique (SFTA), a proposé des critères pour la désignation des experts en matière d'alcoolémie. Ceux-ci ont été ratifiés par l'assemblée générale de la CNBE le 21 janvier 1998.

Titres et diplômes

Être Docteur en pharmacie ou Docteur en Médecine ou Docteur Vétérinaire, avec en plus un DES de Biologie ou le titre de Biologiste (au sens de la biologie médicale) et/ou une qualification en analyse chimique ou physico-chimique.

Matériel

Avoir un chromatographe en phase gazeuse et/ou un appareil à distillation et les réactifs chimiques nécessaires à l'utilisation des méthodes officielles de dosage de l'alcool sanguin.

Formation continue

Être membre d'une société savante d'analyse (Société Française de Toxicologie Analytique, Société Française de Biologie Clinique...) et participer à ses travaux.

Il est souhaitable de pouvoir apporter la preuve de la réalisation de travaux scientifiques (par au moins 2 publications ou communications en biologie ou analyse...).

Résultats aux contrôles de qualité

Avoir participé à des contrôles externes de qualité (organisés par exemple par la Société Française de Toxicologie Analytique, Biorad ou autres) pour le dosage de l'alcool dans le sang, au moins deux fois par an, et avoir obtenu pendant deux années consécutives la certification de l'organisateur.

Le recours à un sapiteur

L'expert peut dans un certain nombre de circonstances (problème analytique particulier, incohérence des résultats...) demander au magistrat de s'adjoindre un collègue spécialiste du problème posé. Celui-ci est appelé sapiteur.

Aspect de procédure

Crime ou délit

L'expert doit rendre chaque résultat sous forme d'un rapport dans lequel il décrit les scellés (nature, aspect, volume), la technique de dosage utilisée et éventuellement la traçabilité.

Alcool et sécurité routière

L'expert est tenu de remplir les fiches prévues à cet effet, la technique de dosage doit être précisée, la traçabilité peut être exigée. Les deux premiers exemplaires sont destinés au procureur de la République accompagnés du mémoire, un exemplaire au Préfet ou Sous-Préfet pour la commission de retrait du permis de conduire, un exemplaire à des fins épidémiologiques : médecin de la Direction Départementale de l'Action Sanitaire et Sociale. Les documents sont adressés sous pli confidentiel.

Le registre légal

Chaque prélèvement doit faire l'objet d'un enregistrement spécifique pour ce qui concerne les alcoolémies de la sécurité routière. Il s'agit d'un registre avec pages numérotées, certifié conforme, visé par un officier de police judiciaire. Les résultats doivent y être reportés, sans rature ni surcharge.

Contre-expertises

Les flacons n° 2 sont en principe remis ou adressés directement au contre-expert susceptible d'être désigné. Environ 5 pour 100 des analyses donnent lieu à une contre-expertise. La durée légale de conservation des échantillons est de 9 mois.

Rapports avec les magistrats ou les OPJ

L'autorité requérante est toujours soit le procureur de la République, soit un juge d'instruction lorsqu'une instruction est ouverte par le parquet mais ceci est plus rarement le cas en matière d'alcoolémie. L'officier de police judiciaire : gendarme ou policier, agit toujours sous couvert du magistrat. En cas de problème ou de difficulté, l'expert ou le laboratoire doit contacter ce dernier.

Cas particulier de la procédure de rétention du permis de conduire (72 heures)

L'expert ou le laboratoire dispose d'un délai toujours inférieur à 72 heures pour rendre le résultat. En pratique, il est souhaitable de réaliser le dosage dans la journée. Cette manière d'opérer est applicable aussi le week-end et permet de travailler en toute sérénité, sans hâte et sans précipitation. Si la rétention est faite le vendredi à 17 h, le résultat doit être communiqué le lundi avant 17 h. La seule difficulté pratique pour l'application de cette mesure est celle d'un jour férié précédant ou succédant un week-end.

L'analyse

Parmi les contraintes des méthodes de dosage (H. Eysseric, H. Malandain : méthodes de dosage in "Alcools et glycols" Journée thématique SFTA, Déc. 1999, Paris), il convient de rappeler que la mesure ne doit être effectuée qu'à partir d'un prélèvement conforme réalisé sur fluorure (A. Bouillerot : facteurs préanalytiques in "Alcools et glycols" Journée thématique SFTA, Déc. 1999, Paris). La détermination de l'alcoolémie doit être effectuée sur sang total et non sur sérum. En effet, le rapport erythroplasmatique est nettement inférieur à 1, tout dosage réalisé sur sérum est en moyenne 14 pour 100 plus élevé en raison de sa plus forte teneur en eau, de plus il varie avec l'hématocrite (2).

Expression des résultats - seuils légaux

Les résultats doivent être rendus à partir de mesures réalisées sur sang total. Dans certains pays : Allemagne, Norvège, Suède, Finlande, la valeur maximale autorisée chez les conducteurs est exprimée en mg/g ou g/kg et non en g/L (Tableau I). En France, les textes indiquent g pour mille, il s'agit donc au sens étymologique de g pour mille et non g/L. La différence est sensible puisque 1 ml de sang total pèse 1.055 g(3).

Interprétation des résultats alcoolémie "a retro"

Depuis 1971 la fixation de taux limites d'alcoolémie a rendu l'interprétation médicale de l'état d'imprégnation alcoolique d'un sujet facultative. Elle est de ce fait tombée en désuétude, mais certaines cours d'appel conservent encore une liste de médecins pour les alcoolémies (alors qu'ils ne pratiquent pas de dosage) pour les crimes et les délits.

En revanche, il peut être demandé au biologiste expert de calculer l'alcoolémie "a retro", ou "back calculation" dans les pays anglo-saxons, lorsque le prélèvement est réalisé plusieurs heures après les faits. L'alcoolémie "a retro" ne peut être calculée que si la phase d'absorption est achevée (soit plus d'une heure trente après l'ingestion). De nombreuses études ont été publiées sur la vitesse β d'élimination de l'éthanol dans le sang. A partir d'une revue de la littérature Jones (4) donne pour valeur moyenne $\beta = 0.16$ g/L/h. Pour Al. Lanquavi (5), la décroissance horaire dans le sang total $\beta = 0.15$ g/L/h. Winek et Murphy (6) ont trouvé $\beta = 0.12$ g/L/h chez les non buveurs, $\beta = 0,15$ g/L/h chez les buveurs modérés et $\beta = 0,30$ g/L/h chez des sujets

Tableau 1 : Valeurs limites autorisées chez les conducteurs dans les différents pays d'Europe.

PAYS	Alcool Sanguin	Alcool dans l'air expiré	Facteur de conversion utilisé sur l'appareil
ALLEMAGNE	0,80 g/kg* = 0,84 g/L	uniquement dépistage	2100
AUTRICHE	0,80 g/L	0,40 mg/L	2000
BELGIQUE	0,50 g/L	0,25 mg/L	2000
FINLANDE	0,50 mg/g* = 0,53 g/L	0,25 mg/L	2100
FRANCE	0,50 g/L	0,25 mg/L	2000
HOLLANDE	0,50 g/L	0,22 mg/L	2300
NORVÈGE	0,50 mg/g* = 0,53 g/L	0,25 mg/L	2100
ROYAUME UNI	0,80 g/L	0,35 mg/L	2300
SUÈDE	0,20 mg/g* = 0,21 g/L	0,10 mg/L	2100

* 1 ml de sang total pèse 1,055 g

alcooliques. Pour Jones (7), chez des alcooliques en cure de désintoxication, la valeur moyenne de $\beta = 0.23$ g/L/h (extrêmes 0.13 à 0.36). Des valeurs supérieures ont été décrites, pouvant atteindre 0.52 g/L/h (8). Ces chiffres considérables sont vraisemblablement dus à une augmentation du métabolisme chez les gros buveurs en rapport avec une augmentation de l'activité microsomiale hépatique (4). Le stress majore la vitesse d'élimination de l'éthanol dans le sang. En 1994, Breslin (9) mesure $\beta = 0.15$ g/L/h chez des sujets témoins et 0.17 et 0.18 g/L/h chez des sujets soumis à un stress. Des valeurs supérieures chez des sujets stressés sont confirmées par Friel (10) $\beta = 0.19$ et 0.20 g/L/h. Jones en 1996 (11) trouve une valeur moyenne de $\beta = 0.19$ g/L/h.

En conclusion, la valeur que l'on peut attribuer à β est au minimum de 0.10 g/L/h.

En aucun cas l'expert ne doit rendre de résultat d'alcoolémie "a retro" à partir de la valeur obtenue sur un éthylomètre (voir paragraphe éthylomètre).

Estimation de la quantité d'alcool consommé

Formule de Widmark

Dès 1932, Widmark a proposé une formule permettant de calculer la quantité d'alcool consommé en grammes (A) à partir de l'alcoolémie en g/kg (Ct) –pour des raisons pratiques nous l'exprimons en g/L- à un temps t après l'ingestion exprimé en heures (12) :

$$A = Vd \times p \times (Ct + \beta \times t)$$

Où Vd représente le volume de distribution en L/kg, p le poids du sujet en kg et β la vitesse d'élimination de l'éthanol en g/L/h. Il a mesuré le Vd chez 20 hommes (Vd = 0.64 – les valeurs trouvées par Widmark sont

corrigées pour ramener les g/kg en g/L : g/kg x 1.055 = g/L) et chez 10 femmes (Vd = 0.52). La valeur moyenne de β vaut 0.16 g/L/h.

Pour calculer le volume de boisson consommé en mL, en fonction du degré alcoolique en %, il faut tenir compte de la densité de l'éthanol (d = 0.789) :

$$VOL = \frac{A \times 100}{\text{deg } \% \times 0.789}$$

La formule de Widmark a été réévaluée en 1994 par Gullberg et Jones (13) à partir de 108 sujets mâles ayant reçu différentes quantités d'éthanol (0.51 à 0.85 g/kg de poids corporel). Les dosages d'alcoolémie sont réalisés 2 h et 5 h après ingestion. Les valeurs trouvées pour Vd et β sont très voisines de celles de Widmark : Vd = 0.69 L/kg et $\beta = 0.13$ g/L/h. Ces valeurs confirment celles d'une autre étude contrôlée portant sur 109 sujets (14) où Vd = 0.69 L/kg et $\beta = 0.14$ g/L/h. Les auteurs montrent que sur la base d'une simple détermination de l'éthanolémie, la quantité d'alcool ingérée pour une absorption modérée peut être calculée avec une précision de ± 20 % (degré de confiance 95 %). Il existe une bonne corrélation entre le volume de distribution apparent et la teneur en eau dans l'organisme dans les deux sexes (15). **Il n'est pas possible d'appliquer la formule de Widmark à des mesures réalisées dans l'air expiré** (13).

Relation alcoolémie-éthylomètre

Principe des éthylotest et des éthylomètres - spécificité

(emprunté à M. Deveaux (1) dans "Alcool, médicaments, stupéfiants et conduite automobile").

Dépistage dans l'air : éthylotests

⇒Éthylotests de catégorie A

Un tube réactif est associé à une poche souple de contenance de 1 L environ. Les fonctions alcools réagissent avec le chrome de valence + 6 (cristaux de bichromate de potassium imprégnés d'acide sulfurique). Après 3 minutes, un changement de couleur s'opère sur une longueur grossièrement proportionnelle à la concentration en alcool de l'air expiré. Un repère indique un dépassement probable du seuil de 0.25 mg/L d'air. On estime que la précision n'est que de l'ordre de 20 %.

⇒Éthylotests de catégorie B

Ces appareils électroniques portables sont munis d'embouts à usage unique. L'affichage numérique permet une lecture directe du taux, qui reste cependant indicatif. Grâce à un catalyseur, l'alcool est oxydé en acide acétique générant un courant électrique (deux électrons par molécule d'éthanol) proportionnel à la concentration d'alcool. L'acide acétique est ensuite dégradé en oxygène, gaz carbonique et eau. La mesure dure environ 20 secondes.

Les deux types d'éthylotests donnent des réponses positives avec les autres alcools légers (méthanol ; isopropanol, n-propanol, n-butanol), l'acétate d'éthyle et l'acétaldéhyde. En revanche, l'acétone, les hydrocarbures et la vapeur d'eau n'interfèrent pas. Leur précision est de l'ordre de 5 %.

Dosage dans l'air : éthylomètres

Ils utilisent la mesure de l'absorption d'un rayonnement infrarouge entre 3.30 et 3.50 μm (élongation des groupements méthyle). La mesure se fait à deux longueurs d'onde, 3.39 et 3.48 μm pour éliminer les interférences dues à l'acétone (les rapports d'absorption sont différents). Mais d'autres produits volatils peuvent produire des interférences : 2-butanone, isopropanol, toluène, éther éthylique. La possibilité de leur mesure est envisagée et autorisée par la loi (16). En fait les appareils plus récents utilisent un filtre à 9.4 μm pour supprimer l'influence de ces solvants (17). Le cahier des charges auquel sont soumis les fabricants pour l'homologation de leur éthylomètre est très précis sur ce point. Il faut aussi envisager le cas de l'inhalation de produits industriels contenant plusieurs entités chimiques volatiles, dont la somme des mesures ferait monter artificiellement le taux d'alcool mesuré. Ces éventualités sont rares mais il ne faut pas les négliger”.

Si le risque d'interférence est très limité sur les éthylomètres à la disposition des forces de l'ordre, encore que l'on ne dispose en France d'aucune étude, il en va différemment avec les éthylotests de catégorie B utilisés en dépistage tant par les policiers, les gendarmes que par certains services d'urgence. Parmi les molécules incriminées figurent le méthanol (18), l'éther (19), l'isopropanol (20), l'acétone en particulier lorsque sa concentration croît de manière sensible (21-23). Il faut également savoir que dans certaines conditions, l'acétone peut se métaboliser en isopropanol (24). Jones (25) a récemment identifié les molécules le plus souvent à l'origine d'interférences sur l'intoxilyzer 5000 (appareil très répandu dans le monde mais non commercialisé en France) : acétone, isopropanol, méthyl éthyl cétone ; dans ces cas, aucun résultat n'est affiché sur l'appareil. Le toluène et les xylènes sont aussi des interférents potentiels (26). Le problème des nébuliseurs utilisés dans l'asthme et des sprays dans la décongestion nasale a été citée comme cause d'erreur (27). Seules les spécialités contenant de fortes concentrations d'éthanol (33 %) peuvent être incriminées, mais elles n'agissent que sur l'alcool de la cavité buccale qui est bien différencié par les éthylomètres. Par ailleurs, une période d'abstinence de 15 min suffit pour éliminer toute trace de la cavité buccale. Cette interférence est confirmée (H. Malandain, 1988, communication personnelle) : après deux bouffées de Bécotide®, l'éthylomètre a rendu “mesure incorrecte” 5 min plus tard le chiffre de 0,12 mg/L a été lu, 25min après les bouffées le résultat était revenu à 0.

Variabilité du rapport - Corrélation éthylomètre-dosage sanguin

Les teneurs en alcool mesuré dans l'air expiré sont exprimées en milligrammes par litre. Compte tenu du fait qu'il est admis -à tort- que le rapport de ces deux concentrations est de l'ordre de 1/2000 une fois l'absorption terminée, l'éthanol dans l'air expiré est de 0,25 mg/L, pour une éthanolémie de $0,25 \times 2000 = 500$ mg/L soit 0,5 g/L.

En réalité, cette valeur de 2000 a été choisie en France par commodité. Dans d'autres pays d'Europe, elle varie de 2000 à 2300 (Tableau I). Plus cette valeur est faible, plus elle “mineure” en moyenne l'état d'imprégnation éthylique d'un sujet par rapport à la moyenne de la population. Pour Jones (28), alors qu'en Suède le coefficient retenu est de 2100, cela constitue en moyenne une minoration de 10 % pour les contrevenants par rapport à la valeur sanguine. En fait il s'agit d'une valeur moyenne qui ne rend pas compte des variations individuelles parfois considérables. Ainsi Dubowski et O'Neill (29) l'ont mesuré à 2280 ± 242 (écart type) avec

un coefficient de variation de 10,6 % mais les valeurs extrêmes varient de 1706 à 3063 ! Jones et Beylich (30) en Suède et Norvège ont confirmé les grandes variations constatées par Dubowski avec des rapports respectifs de 2052 à 4400 et de 1972 à 3400. Ils constatent également un biais systématique entre les concentrations dans le sang et dans l'air expiré et suggèrent une correction. Dans un travail plus récent, réalisé dans un service d'accueil et d'urgence, Derogis (31) constate que la mesure dans l'air expiré minore en moyenne d'éthanolémie de 21 % mais ces résultats sont à prendre avec prudence dans la mesure où il ne s'agit pas d'un éthylomètre mais d'un éthylotest de catégorie B. Dans une étude toxicocinétique portant sur 21 hommes, Jones (32) établit que la minoration moyenne de l'imprégnation éthylique d'un sujet par la mesure dans l'air expiré est de 4,2 %. En 1996 Jones (28) montre sur un échantillon de 799 sujets qu'il est possible d'améliorer la dispersion du rapport sang-air en corrigeant les résultats en fonction du temps séparant les deux types de mesure, sur la base d'une diminution de l'alcoolémie de 0,19 g/L/h. Dans ces conditions, la valeur moyenne du rapport s'établit à 2407 ± 213 et pour 95 % de l'échantillon les valeurs sont comprises entre 1981 et 2833, mais cette dispersion reste malgré tout importante. Dès 1987 Simpson (33) affirme que plus de 90 % de la dispersion est due à des variations biologiques individuelles. Cette variabilité est unanimement reconnue (34,10,28). Par ailleurs, au plan du principe la détermination dans l'air expiré fait appel à la mesure en fin de période respiratoire ce qui sous estime le contenu en alcool dans l'air alvéolaire (35). Dans une revue très récente Hlastala (36), l'un des plus éminents spécialistes de la physiologie des échanges gazeux de ces 20 dernières années, rappelle que la théorie de la mesure de l'alcool dans l'air expiré utilisée dans les éthylomètres, fondée sur les acquis de la physiologie respiratoire des années 1940 et 1950 est obsolète. Ces acquis ont été largement remis en cause suite à l'évolution fantastique des connaissances au cours des 50 dernières années. En effet, la dernière fraction de l'air expiré ne peut être le reflet de l'alcool réel contenu dans l'air alvéolaire. Des études expérimentales et théoriques récentes sur les échanges gazeux de composés très solubles ont conduit à un nouveau modèle sur les échanges d'alcool au niveau pulmonaire (Figure 1). Il est maintenant bien établi que la majeure partie de la variabilité observée est due à des paramètres physiologiques, paramètres qui peuvent changer d'une mesure à l'autre. La prise en considération de l'ensemble des échanges dans l'air expiré plutôt que dans l'air alvéolaire, ouvre une nouvelle voie de recherche pour la mise au point d'appareils permettant d'améliorer la précision des mesures de l'alcool dans l'air expiré.

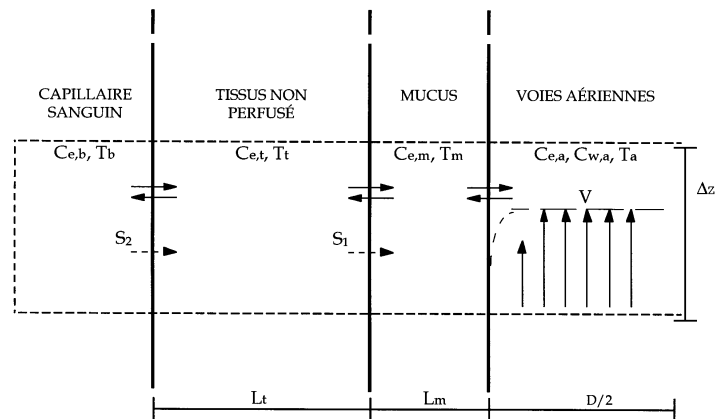


Figure 1 :

- $C_{e,b}$: concentration en alcool dans le sang
- $C_{e,t}$: concentration en alcool dans les tissus
- $C_{e,m}$: concentration en alcool dans le mucus
- $C_{e,a}$: concentration en alcool dans l'air
- $C_{w,a}$: concentration en eau dans l'air
- T_b : température du sang
- T_t : température du mucus
- T_a : température de l'air
- S : flux d'alcool
- L_t : épaisseur de la couche de tissus
- L_m : épaisseur de la couche de mucus
- D : diamètre de la lumière
- V : débit d'air
- Δz : variations de concentration d'alcool sur l'axe longitudinal des voies aériennes.

Contrôle de qualité des éthylomètres

Ceux-ci doivent être soumis à un contrôle annuel, assuré par le service des poids et mesures, sous peine d'invalidation des résultats qui pourraient être produits. On peut regretter que ces appareils ne soient pas en outre l'objet d'un contrôle de qualité externe régulier. Enfin certains déplorent que tous les appareils ne soient pas équipés d'imprimante. Par ailleurs, aucun échantillon d'air expiré n'est conservé, ce qui rend impossible toute analyse de contrôle.

Conclusion concernant les éthylomètres

En l'attente de la mise au point éventuelle d'appareils nouveaux tenant compte des acquis les plus récents en matière de physiologie, il est illusoire de vouloir transformer la teneur en alcool dans l'air expiré en "équivalent d'alcoolémie". Une mesure dans l'air expiré est seulement une mesure dans l'air expiré ; elle dépasse ou ne dépasse pas le seuil fixé par la loi (0,25mg/L en France). De la même manière, un dosage dans le sang total est un dosage dans le sang total réalisé selon l'une des deux méthodes légales et il est inférieur ou supérieur aux concentrations retenues par la loi (0,50 g/L = contravention, 0,80 g/L = délit). Dans ces conditions,

un expert requis doit récuser toute mission visant à transformer une mesure d'éthylomètre en dosage sanguin et à fortiori l'interprétation d'une "alcoolémie à rétro" à partir d'une valeur d'éthylomètre.

Arguments de défense invoqués en cas de poursuite

Lorsque des conducteurs sont appréhendés sous l'empire d'un état alcoolique, ceux-ci nient souvent toute consommation d'alcool. Dans certains pays d'Europe, la charge de la preuve est du ressort de l'accusation, aussi la procédure contre un conducteur sous l'influence de l'alcool est souvent abandonnée quand le contrevenant affirme que la consommation d'alcool a eu lieu après le délit. Ainsi en Suède dans plus de 90 % des cas les conducteurs positifs prétendent avoir consommé l'alcool entre le délit et le prélèvement sanguin (Tableau II). Ceci explique que l'on ait recours souvent en pareil cas à un prélèvement d'urines pour invalider une telle affirmation. Cette pratique est également utilisée dans d'autres pays. En Allemagne on fait appel à l'analyse de substances d'accompagnement ou congénères qui s'accumulent dans le sang des buveurs chroniques : méthanol, 1-propanol, 2-butanol, 2-méthyl, 1-propanol.

La cinétique de l'éthanol en rapport avec le tube digestif

Ces éléments de toxicocinétique sont importants, ils peuvent faire l'objet de questions par le magistrat. Les

experts doivent bien les connaître pour y répondre : estimation de la quantité d'alcool consommé, interprétation des résultats, alcoolémie "a retro".

De nombreux auteurs ont constaté après absorption de grandes quantités d'éthanol sur plusieurs heures, que l'évaluation de la quantité ingérée à partir de l'alcoolémie était sous estimée (37). Outre la possibilité d'une élimination accrue d'éthanol, l'effet de premier passage au niveau du tube digestif et plus particulièrement de l'estomac pourrait jouer un rôle important (37-42).

Le métabolisme gastro-intestinal de l'éthanol est très important puisqu'il influe sur sa biodisponibilité et qu'il conduit à une production locale d'acétaldéhyde pouvant être à l'origine de lésions tissulaires. Bien que la présence d'ADH gastro-intestinale soit connue depuis 16 ans (43), son importance a été mise en lumière depuis la découverte d'un effet de premier passage de l'éthanol. De surcroît, plus récemment le métabolisme bactérien dans le tube digestif a été largement étudié et il a été avancé qu'il contribuait non seulement à la toxicité locale, mais aussi à la maladie alcoolique et à la perte d'énergie liée à la consommation chronique d'éthanol.

Le métabolisme gastro-intestinal de l'éthanol et son rôle dans la physiopathologie gastro-intestinale est complexe, puisqu'il est dépendant de nombreux facteurs incluant motilité, absorption, dilution par d'importants volumes de sécrétion gastro-intestinale et rediffusion d'éthanol. Nous évoquerons les facteurs qui ont fait l'objet d'investigations récentes et qui influencent le métabolisme de l'éthanol chez l'homme. Pour les éléments métaboliques de base : N. Houdret : particularités et points communs des différents métabolismes in "Alcools et glycols" Journée thématique SFTA, Déc. 1999, Paris.

Tableau II : Les dix arguments de défense les plus utilisés par les individus appréhendés pour conduite sous l'empire d'un état alcoolique en Suède selon Jones (81).

Fréquence décroissante	Breve description du moyen de défense
1	Consommation d'alcool après le délit, le stratagème du flacon de poche
2	Jus de fruit ou boisson faiblement alcoolisée contenant un alcool fort à l'insu du consommateur
3	Inhalation des vapeurs d'éthanol au travail
4	Problème pathologique ou traumatisme
5	Désinfection de la peau à l'alcool avant le prélèvement
6	Inversion d'échantillons sanguins
7	Formation d'alcool in vitro après le prélèvement
8	Interactions médicaments-alcool
9	Consommation d'elixirs, de fortifiants ou de sirops contre la toux contenant de l'alcool
10	Perfusion de sang ou d'autres liquides à l'occasion d'un traitement chirurgical en urgence

Métabolisme de l'éthanol par d'ADH de la muqueuse gastro-intestinale

Il s'agit d'un effet de premier passage, essentiellement gastrique (44-46). Le tube digestif (cavité buccale, estomac, duodénum, intestin) sécrète 3 isozymes distinctes de l'ADH (45,47) : γ ADH = classe I, χ ADH = classe III, σ ADH = classe IV. Le métabolisme de l'éthanol via l'ADH au niveau de la muqueuse de l'oropharynx et de l'oesophage peut contribuer à la toxicité locale éventuellement à une cocarcinogénèse (48).

Premier passage gastrique de l'éthanol

Ce métabolisme est étroitement lié à l'activité de l'activité de l'ADH gastrique. La plupart des facteurs modulant l'activité de l'ADH gastrique agissent également sur le premier passage de l'éthanol (consommation chronique d'alcool, infection par *helicobacter pylori*, cimétidine). L'importance de cette oxydation gastrique varie beaucoup selon les études montrant le caractère extrêmement complexe des facteurs qui la régissent. Il est à l'heure actuelle admis que cet effet de premier passage gastrique est habituellement mineur, de l'ordre de 10 % de la quantité d'éthanol ingéré (49) et est indépendant du sexe (50). Ce métabolisme est diminué en cas de lésion de la muqueuse gastrique.

L'ADH oesophagienne et colorectale et son rôle possible dans la production locale d'acétaldéhyde

Il est constaté chez l'alcoolique chronique une augmentation du risque de cancer rectal et non du risque de cancer colique (51) ; ce qui pourrait être en relation avec une activité beaucoup plus importante de l'ADH au niveau de la muqueuse rectale (52). Très récemment des modifications du profil de l'ADH ont été constatées au cours du cancer colorectal (53).

Métabolisme bactérien de l'éthanol (voir aussi A. Bouillerot : facteurs préanalytiques in "Alcools et glycols" Journée thématique SFTA, Déc. 1999, Paris).

Des études expérimentales ont clairement démontré que les bactéries de tout le tube digestif (oropharynx et estomac compris) sont capables de métaboliser l'éthanol. De nombreuses bactéries et levures possèdent une activité ADH. Kaji (54) a publié 39 cas de production intradigestive considérable d'éthanol après un régime riche en hydrates de carbone sous l'effet de *candida albicans*. L'alcoolémie peut dépasser 2,0 g/L, mais il

s'agit certes d'observations exceptionnelles (A. Bouillerot : facteurs préanalytiques in "Alcools et glycols" Journée thématique SFTA, Déc. 1999, Paris). Au niveau oropharyngé, les bactéries transforment l'éthanol en acétaldéhyde conduisant à une attaque de la muqueuse (55). Ce phénomène est retrouvé au niveau de la muqueuse rectale, accompagné d'un processus d'hyper-régénération qui la rend plus sensible aux carcinogènes chimiques (55,56). Par ailleurs, la dépense énergétique liée au métabolisme bactérien de l'alcool constitue une perte non négligeable (57).

Facteurs Génétiques - Médicamenteux - Prandiaux - Divers

D'autres facteurs sont susceptibles d'influer de manière sensible sur l'alcoolémie, ou du moins sont souvent le support d'arguments de défense. Les points développés dans ce chapitre doivent permettre à l'expert de répondre à toutes ces interrogations.

Facteurs génétiques - facteurs ethniques

Dans une étude portant sur la métabolisation de l'éthanol, chez des jumeaux monozygotes et dizygotes, Vesell (58) montre l'importance du facteur génétique, mais ces constatations ne sont pas confirmées par d'autres auteurs (59,60).

Il existe des différences ethniques sur l'activité σ ADH gastrique beaucoup plus faible chez le Japonais que chez le Caucasien (61).

Variabilité individuelle et inter-individus

De nombreux travaux ont fait état de variations toxicocinétiques inter-individuelles (62,63). Curieusement la variabilité intra-individuelle au cours du temps a été peu étudiée. Pour Jones (64) la grande variation inter-individuelle, des paramètres pharmacocinétiques classiques (concentration au temps 0, volume de distribution, aire sous la courbe) par rapport à une plus faible variation intra-individuelle tient vraisemblablement à des différences de répartition graisses/tissus maigres des sujets. Ceci explique certainement les écarts de temps constatés dans la vidange de l'estomac (65).

Facteurs prandiaux

Pour une même quantité d'éthanol consommée, l'alcoolémie est beaucoup plus élevée à jeun qu'avec un repas (66-68). Cette dernière augmente de manière proportionnelle aux apports mais la vitesse d'absorption

n'est pas modifiée (69). Le métabolisme de l'éthanol est augmenté lorsque les apports sont étalés dans le temps par rapport à des prises uniques (70). Pour une même quantité d'alcool consommé, plus le degré alcoolique est élevé, plus l'alcoolémie maximale tend à diminuer alors que le temps nécessaire pour obtenir le pic est inchangé (71), en raison d'un retard à la vidange gastrique (72). En présence d'aliments, le phénomène inverse peut être constaté (73). En fait c'est la vitesse de vidange gastrique qui est déterminante puisque l'absorption de l'éthanol est beaucoup plus rapide au niveau du duodénum et du jéjunum (74). Ainsi l'alcool, mélangé à une boisson, pénètre plus rapidement que s'il est mélangé à des aliments solides (74). Le type d'aliments (glucides, lipides, protéines) est sans effet sur l'alcoolémie (75).

Facteurs divers (alimentaires - les potions "anti-alcool")

Certaines variétés de pains fermentés et de boissons non alcoolisées (76) y compris des boissons sans alcool destinées aux enfants (77) peuvent contenir de faibles concentrations d'éthanol. En ce qui concerne les boissons non alcoolisées, le chiffre le plus élevé trouvé par Logan (76) est de 0,84 g/L. Pour les pains fermentés la teneur la plus forte en éthanol est de 1,66 g/100 g (76). Logan a montré qu'en respectant une période d'abstinence de 15 minutes la consommation de ces produits était sans effet sur la mesure de l'alcool dans l'air expiré. Une étude de Goldberger (78) confirme par l'analyse de diverses boissons non alcoolisées la présence d'éthanol (jusque 0,96 g/L). Nous avons mesuré l'éthanol dans des boissons sans alcool destinées aux enfants ou à des sujets alcooliques sevrés (77). Les résultats les plus élevés atteignent 2 g/L soit 0,2 %, ce qui est parfaitement conforme puisque les boissons titrant moins de 0,5 % sont considérées comme non alcoolisées. Depuis quelques temps (79) des potions "anti-alcool" sont proposées, elles sont censées abaisser l'alcoolémie et permettre de conduire après avoir bu. Il s'agit de produits disponibles dans la grande distribution et riches en sucres : Désalco (fructose et acide citrique), Sécurité (fructose et extraits de plantes). Leur efficacité éventuelle n'est pas prouvée de manière scientifique.

Facteurs médicamenteux

Un certain nombre de médicaments sont susceptibles d'agir sur le pic d'alcoolémie ou sur la vitesse de décroissance de l'éthanolémie (80). Par ailleurs, certaines préparations médicamenteuses contiennent de

l'alcool. Outre un affichage adapté, le médecin et le pharmacien doivent informer le malade. Parfois la consommation de fortifiants, d'élixirs ou de sirops contre la toux peut être une source d'alcool. Il s'agit de produits le plus souvent en vente libre et les concentrations en éthanol peuvent varier de 5 à 40% (81).

L'alcool peut affecter la pharmacocinétique des médicaments par altération de la vidange gastrique ou du métabolisme hépatique, par induction du cytochrome P450. Par ailleurs, des médicaments sont susceptibles de modifier la toxicocinétique de l'éthanol en modifiant la vidange gastrique et en inhibant l'ADH gastrique (Tableau III).

Les interactions pharmacodynamiques entre l'alcool et les médicaments prescrits sont courantes, en particulier les effets sédatifs cumulatifs avec les benzodiazépines ou d'autres psychotropes. L'association d'anti-inflammatoires non stéroïdiens et d'alcool augmente le risque d'hémorragie gastro-intestinale (82).

Conclusion

Les effets néfastes de l'alcool en matière de circulation routière sont reconnus dans le monde entier. Partout, la réglementation revoit régulièrement à la baisse la limite maximale autorisée de l'éthanol dans le sang et/ou dans l'air expiré. L'Europe et la France en particulier n'échappent pas à cette règle. Ainsi en France, un projet de loi est à l'étude visant à instaurer l'absence totale d'alcool chez les jeunes conducteurs. Cette baisse des concentrations implique des contraintes analytiques accrues. En admettant que celles-ci soient résolues, l'exactitude analytique ne constitue pas une fin en soi. Les biologistes experts ou les laboratoires hospitaliers désignés par la justice ont pour mission de confirmer la validité globale du résultat, en fonction des phénomènes susceptibles de l'affecter. La nature et la qualité du prélèvement ainsi que la production d'éthanol sont au rang des premières sources d'erreur. La prise en compte des paramètres métaboliques permet d'évaluer l'alcoolémie "a retro", et la formule de Widmark d'estimer la quantité d'alcool ingéré. En matière de circulation routière, l'éthylomètre a remplacé le dosage sanguin dans la majorité des cas, et beaucoup sont tentés de ramener les mesures dans l'air expiré en "équivalent éthanolémie". En aucun cas une valeur d'éthylomètre ne doit être transformée en concentration sanguine, il faut définitivement admettre que dosage sanguin et mesure dans l'air expiré sont des modes d'expression différents d'un état d'imprégnation éthylique.

Tableau III : Mécanisme des interactions alcool-médicament [selon Fraser (83)].

Mécanisme	Médicaments	Commentaires
Inhibition de l'ADH gastrique	cimétidine, ranitidine et aspirine	augmentation modérée de l'éthanolémie seulement pour de très faibles doses d'alcool (0,15 g/kg)
Augmentation de la vitesse de vidange gastrique	cisapride et erythromycine	augmentation de l'alcoolémie par diminution du premier passage hépatique
Augmentation de l'hépatotoxicité	paracétamol, isoniazide et phénylbutazone	risque de nécrose hépatique à doses thérapeutiques chez les gros buveurs
Diminution de métabolisme	benzodiazépines, narcotiques, barbituriques et Warfarine	buveurs qui font la bombe
Induction d'enzymes	phénytoïne, warfarine	abus chronique d'alcool
Hémorragie gastro-intestinale	aspirine et anti-inflammatoires non stéroïdiens	potentialisation des dégâts sur la muqueuse
Sédation, atteinte psychomotrice	benzodiazépines, antidépresseurs tricycliques et anti-histaminiques	potentialisation pharmacodynamique
Réactions de type disulfiram	tolbutamide, métronidazole, sulfonamides, griséofulvine, céfopérazone, céfamandole	risque chez les plus gros buveurs
Hypoglycémie et hypertension	hypoglycémiant oraux à effet retard, aldomet, hydralazine et nitroglycérine	potentialisation de l'effet physiologique de l'alcool

Références

- Deveaux M., Alcool, médicaments, stupéfiants et conduite automobile. P. Mura, Collection option Bio, ed. Elsevier. 1999 : 3-19
- Charlebois R.C., Corbett M.R., Wignore J.G. Comparison of ethanol concentrations in blood, serum and blood cells for forensic application. *J. Anal. Toxicol.*, 1996 ; 20 : 171-8
- Lenter C. Tables scientifiques Geigy. Vol 3 8^{ème} ed. Basle : Ciba-ceigy, 1984
- Jones A.W. Disappearance rate of ethanol from the blood of human subjects : Implications in forensic toxicology. *J. Forensic Sci.*, 1993 ; 38 : 104-18
- Al.-Lanqawi Y., Moreland T.A., McEwen J., Halliday F., Durnin C.J., Stevenson I.H., Ethanol kinetics : extent of error in back extrapolation. *Br. J. clin. Pharmacol.*, 1992 ; 34 : 316-21.
- Winek C.L., Murphy K.L., The rate and kinetic order of ethanol elimination. *Forensic Sci Int.*, 1984 ; 27 : 159-66.
- Jones A.W., Sternebring B., Kinetics of ethanol and methanol in alcoholics during detoxification. *Alcohol Alcoholism*, 1992 ; 27 : 641-7.
- Gerchow J., Heifer U., Schewe G., Schwerd W., Zink P., Calculating the maximum blood alcohol concentration. Its application to evaluate the degree of impairment of responsibility. *Blutalkohol*, 1985 ; 22, suppl. 1 : 77-107.
- Breslin C.F., Hayward M., Baum A., Effects of stress on perceived intoxication and the blood alcohol curve in men and women. *Health Psychol.*, 1994 ; 13 : 479-87.
- Friel P.N., Baer J.S., Logan B.K., Variability of ethanol absorption and breath concentrations during a large-scale alcohol administration study. *Clin. Exp. Res.*, 1995 ; 19 (4) : 1055-60.
- Jones A.W., Elimination rate of alcohol from blood and variability in blood/breath ratios of alcohol in drinking drivers. Paper presented at 48 th Annual Meeting of the American Academy of Forensic Sciences, Nashville, 1996.
- Widmark E.M.P., Principes and applications of medicolegal alcohol determination, 1932. Biomedical publications, Davis, Calif. 1987 : 107-8.
- Gullberg R.G., Jones A.W., Guidelines for estimating the amount of alcohol consumed from a single measurement of blood alcohol concentration : reevaluation of Widmark's equation. *Forensic Sci. Int.*, 1994 ; 69 : 119-30.
- Alha A.R., Blood alcohol and clinical inebriation in Finnish men : a medico-legal study. *Ann. Acad. Scientiarum Fennicae, Series A v. Medica-Antropologica*. 1951 ; 26 : 1-90.
- Marshall A.W., Kingstone D., Boss M., Morgan M.Y., Ethanol elimination in males and females : relationship to menstrual cycle and body composition. *Hepatology*. 1983 ; 3 : 701-6.
- Decret n° 85-1519 du 31 décembre 1985 et arrêté du 31 décembre 1985. *J.O. du 7 janvier 1986* : 340-3.
- Deveaux M., Demarly C., Lenoir L., Muller P.H., Problèmes posés par l'interprétation de dosages de l'alcool dans l'air expiré. *J. Med. Lég. Droit Med.*, 1990 ; 33 (5) : 335-40.

18. Jones A.W., Observations on the specificity of breath-alcohol analyzers used for clinical and medicolegal purposes. *J. Forensic Sci.*, 1989 ; 34 (4) : 842-7.
19. Bell C.M., Gutowski S.J., Young S., Wells D., Diethyl ether interference with infrared breath analysis. *J. Anal. Toxicol.*, 1992 ; 16 : 166-8.
20. Logan B.K., Gullberg R.G., Elenbaas J.K., Isopropanol interference with breath alcohol analysis : a case report. *J. Forensic Sci.*, 1994 ; 39 (4) : 211-5.
21. Jones A.W., Driving under the influence of acetone. *Clin. Toxicol.*, 1997 ; 35 (4) : 419-21.
22. Gullberg R.G., The frequency of apparent acetone in a group of breath alcohol data : statistical treatment and forensic implications. *Forensic Sci. Int.*, 1994 ; 67 : 65-72.
23. Brown R.B., Mullins R.E., Panter J.W., Wheaton R.N., Gebhart S.S.P., Schultz A., Alleged interference from acetone in breath alcohol testing. *Clin. Chem.*, 1994 ; 40 (6) : 1069.
24. Jones A.W., Andersson L., Biotransformation of acetone to isopropanol observed in a motorist involved in a sobriety check. *J. Forensic Sci.*, 1995 ; 40 (4) : 686-7.
25. Jones A.W., Andersson L., Berglund K., Interfering substances identified in the breath of drinking drivers with intoxilyzer 5000S. *J. Anal. Toxicol.*, 1996 ; 20 : 522-7.
26. Labianca D.A., Analysis of breath alcohol via infrared spectrophotometry : predicting false ethanol results by application of the base-line method to vapor phase infrared spectra. *Eur. J. Clin. Chem. Biochem.*, 1996 ; 34 : 59-61.
27. Logan B.K., Distefano S., Glenn A., Evaluation of the effect of asthma inhalers and nasal decongestant sprays on a breath alcohol test. *J. Forensic Sci.*, 1998 ; 43 (1) : 197-9.
28. Jones A.W., Andersson L., Variability of the blood/breath alcohol ratio in drinking drivers. *J. Forensic Sci.*, 1996 ; 41 (6) : 916-21.
29. Dubowski K., Absorption, distribution and elimination of alcohol : highway safety aspects (Review). *J. Stud. Alc.*, 1985 ; suppl. 10 : 98-108.
30. Jones A.W., Beylich K.M., Bjerneboe A., Ingum J., Morland J., Measuring ethanol in blood and breath for legal purposes : variability between laboratories and between breath-test instruments. *Clin. Chem.*, 1992 ; 38 (5) : 743-7.
31. Derogis V., Bourrier P., Douay O., Turcant A., Perroux D., Ethylométrie dans l'air expiré versus éthanolémie : 204 cas dans un service d'accueil et d'urgence. *Presse Med.*, 1995 ; 24 : 1067-70.
32. Jones A.W., Pharmacokinetics of ethanol in saliva : comparison with blood and breath alcohol profiles, subjective feelings of intoxication, and diminished performance. *Clin. Chem.*, 1993 ; 39 : 1837-44.
33. Simpson G., Accuracy and precision of breath-alcohol measurements for a random subject in the postabsorptive state. *Clin. Chem.*, 1987 ; 33 (2) : 261-8.
34. Labianca D.A., Simpson G., Medicolegal alcohol determination : variability of the blood-to-breath-alcohol ratio and its effect on reported breath-alcohol concentrations. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1995 ; 33 : 919-25.
35. Lubkin S.R., Gullberg R.G., Logan B.K., Maini P.K., Murray J.D., Simple versus sophisticated models of breath alcohol exhalation profiles. *Alcohol & Alcoholism*, 1996 ; 31 (1) : 61-7.
36. Hlastala M.P., The alcohol breath test-a-review. *J. Appl. Physiol.*, 1998 ; 84 (2) : 401-8.
37. Zink P., Reinhardt G., The course of the blood alcohol curve during and after consumption of alcohol in large quantities : long time studies on human volunteers. In K. Kuriyama, A. Takada and H. Ishii (eds), *Biomedical and Social Aspects of Alcohol and Alcoholism*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1988 : 623-8.
38. Julkunen R.J.K., DiPadova C., Lieber C.S. First-pass metabolism of ethanol a gastrointestinal barrier against systemic toxicity of ethanol. *Life Sci.*, 1985 ; 37 : 567-73.
39. Julkunen R.J.K., Tannenbaum L., Baraona E., Lieber C.S., First-pass metabolism of ethanol : an important determinant of blood levels after alcohol consumption. *Alcohol*, 1985 ; 2 : 437-41.
40. Ammon E., Schäfer C., Klotz U., Disposition and first-pass metabolism of ethanol in humans : Is it gastric or hepatic and does it depend on gender ? *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1996 ; 59 : 503-13.
41. DiPadova C., Worner T.M., Julkunen R.J.K., Lieber C.S., Effects of fasting and chronic alcohol consumption on the first-pass metabolism of ethanol. *Gastroenterology*, 1987 ; 92 : 1169-73.
42. Caballeria J., Frezz M., Hernandez-Muñoz R et al., Gastric origin of the first-pass metabolism of ethanol in humans : effect of gastroectomy. *Gastroenterology*, 1989 ; 97 : 1205-9.
43. Pestalozzi D.M., Bühler R., Von Wartburg J.P., Hess M., Immunohistochemical localisation of alcohol dehydrogenase in the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 1983 ; 85 : 1011-6.
44. Sato N., Kitamura T., First-pass metabolism of ethanol : an overview. *Gastroenterology*, 1996 ; 111 : 1143-4.
45. Haber P.S., Gentry R.T., Mak K.M., Mirmiranyazdy S.A.A., Greenstein R.J., Lieber C.S., Metabolism of alcohol by human gastric cells : relation to first-pass metabolism. *Gastroenterology*, 1996 ; 111 : 863-70.
46. Sharma R., Gentry R.T., Lim R.T. Jr, Lieber C.S., First-pass metabolism of alcohol : absence of diurnal variation and its inhibition by cimetidine after an evening meal. *Dig. Dis. Sci.*, 1995 ; 40 : 2091-7.
47. Yin S.J., Liao C.S., Wu C.W., Li T.T., Chen L.L., Lai C.L., Tsao T.Y., Human stomach alcohol and aldehyde dehydrogenases : comparison of expression pattern and activities in alimentary tract. *Gastroenterology*, 1997 ; 112 : 766-75.
48. Seitz H.K., Pöschl G., Alcohol and gastrointestinal cancer ; pathogenetic mechanisms. *Addiction Biology*, 1997 ; 2 : 19-33.
49. Crabb D.W., First-pass metabolism of ethanol : gastric or hepatic, mountain or molehill. *Hepatology*, 1997 ; 25 : 1292-4.
50. Schenker S., Medical consequences of alcohol abuse : is gender a factor ? *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 1997 ; 21 : 179-81.
51. Kune G.A., Vitetta L., Alcohol consumption and the etiology of colorectal cancer : A review of the scientific evidence from 1957 to 1991. *Nutrition and cancer*, 1992 ; 18 : 97-111.

52. Seitz H.K., Egerer G., Oneta C., Krämer S., Sieg A., Klee F., Simanowski U.A., Alcohol dehydrogenases in the human colon and rectum. *Digestion*, 1996 ; 57 : 105-8.
53. Egerer G., Schulitz R., Gebhardt A., Allali-Hassani A., Perez X., Simanowski U.A., Seitz H.K., Change of alcohol dehydrogenase phenotypes during colorectal carcinogenesis in man. *Gastroenterology*, 1997 ; 112 : A1260-(Abstract).
54. Kaji H., Asanuma Y., Yahara O. et al., Intra-gastrointestinal alcohol fermentation syndrome : Report of two cases and review of the literature. *J. Forensic Sci.*, 1984 ; 24 : 461-71.
55. Simanowski U.A., Suter P., Russel R.M., Heller M., Waldherr R., Ward R., Peters T.J., Smith D., Seitz H.K., Enhancement of ethanol induced rectal mucosal hyperregeneration with age in F344 rats. *Gut*, 1994 ; 35 : 1102-6.
56. Seitz H.K., Simanowski U.A., Garzon F.Z., Rideout J.M., Peters T.J., Koch A., Berger R., Einecke H., Maiwald M., Possible role of acetaldehyde in ethanol related rectal carcinogenesis in the rat. *Gastroenterology*, 1990 ; 98 : 1-8.
57. Salaspuro M., Microbial metabolism of ethanol and acetaldehyde and clinical consequences. *Addiction Biology*, 1997 ; 2 : 35-46.
58. Vesell E.S., Page J.G., Passananti G.T., Genetic and environmental factors affecting metabolism in man. *Clin. Pharmac. Ther.*, 1971 ; 12 : 192-201.
59. Kopun M., Propping P., The kinetics of ethanol absorption and elimination in twins and supplementary repetitive experiments in singleton subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1977 ; 11 : 337-44.
60. Martin N.G., Perl J., Oakeshott J.G., Gibson J.B., Starmer G.A., Wilks A.V., A twin study of ethanol metabolism. *Behav. Genet.*, 1985 ; 15 : 93-109.
61. Fujimoto K., Lieber C.S., Ethnic differences in gastric sigma-ADH activity and ethanol first-pass metabolism. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 1996 ; 20 : 1569-76.
62. Al-Lanqawi Y., Moreland T.A., McEwen J., Halliday F., Durnin C.J., Stevenson I.H., Ethanol kinetics extent of error in back extrapolation procedures. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1992 ; 34 : 316-21.
63. Jones A.W., Interindividual variations in the disposition and metabolism of ethanol in healthy men. *Alcohol*, 1984 ; 1 : 385-91.
64. Jones A.W., Jönsson K.A., Between-subject and within-subject variations in the pharmacokinetics of ethanol. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1994 ; 37 : 427-31.
65. Petring O.U., Flachs H., Inter- and intrasubject variability of gastric emptying in healthy volunteers measured by scintigraphy and paracetamol absorption. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1990 ; 29 : 703-8.
66. Fraser A.G., Rosalki S.B., Gamble G.D., Pounder R.E., Inter-individual and intra-individual variability of ethanol concentration-time profiles : comparison of ethanol ingestion before or after an evening meal. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1995 ; 40 : 387-92.
67. Von Wartburg J.P., Pharmacokinetics of alcohol. In : Crow K.E., Batt R.D., eds. *Human metabolism of alcohol*, volume 1. Pharmacokinetics, medicolegal aspects, and general interests. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1989 : 20-1.
68. Hahn R.G., Norberg A., Gabrielsson J., Danielsson A., Jones A.W., Eating a meal increases the clearance of ethanol given by intravenous infusion. *Alcohol Alcohol.*, 1994 ; 26 (6) : 673-77.
69. Jones A.W., Jönsson K.A., Neri A., Peak blood-ethanol concentration and the time of its occurrence after rapid drinking on an empty stomach. *J. Forens. Sci.* 1991 ; 36 : 376-85.
70. Dubowski K.M., Absorption, distribution and elimination of alcohol : highway safety aspects. *J. Stud. Alcohol*, 1985 ; 10 (suppl) : 98-108.
71. Pikaar N.A., Wedel M., Hermus R.J., Influence of several factors on blood alcohol concentrations after drinking alcohol. *Alcohol Alcoholism*, 1988 ; 23 : 289-97.
72. Wedel M., Pieters J.E., Pikaar N.A., Ockhuizen Th., Application of a three-compartment model to a study of the effects of sex, alcohol dose and concentration, exercise and food consumption on the pharmacokinetics of ethanol in healthy volunteers. *Alcohol Alcoholism*, 1991 ; 26 : 329-336.
73. Kalant H., Pharmacokinetics of ethanol : absorption, distribution and elimination in "The Pharmacology of Alcohol and Alcohol Dependence", Begleiter H. and Kissin B. Eds, Oxford University Press, 1996 : 15-58.
74. Horowitz M., Maddox A., Bochner M., Wishart J., Bratasiuk R., Collins P., Shearman D., Relationships between gastric emptying of solid and caloric liquid meals and alcohol absorption. *Am. J. Physiol.*, 1989 ; 257 (Gastroint. Liver Physiol. 20) : G291-G298.
75. Jones A.W., Neri A., Evaluation of blood-ethanol profiles after consumption of alcohol together with a large meal. Paper presented at the Second Course on Forensic Breath Testing for Alcohol, University of Ottawa, June, 1993.
76. Logan B.K., Distefano S., Ethanol content of various foods and soft drinks and their potential for interference with a breath-alcohol test. *J. Anal. Toxicol.*, 1998 ; 22 : 181-3.
77. Goullé J.P., résultats non publiés.
78. Goldberger B.A., Cone E.J., Kadehjian L., Unsuspected ethanol ingestion through soft drinks and flavored beverages. *J. Anal. Toxicol.*, 1996 ; 20 : 332-3.
79. Auto Plus N° 447 du 02/04/1997.
80. Lane E.A., Guthrie S., Linnoila M., Effects of ethanol on drug and metabolite pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokin.*, 1985 ; 10 : 228-47.
81. Jones A.W., Top ten defence challenges among drinking drivers in Sweden. *Med. Sci. Law.*, 1991 ; 31 : 229-38.
82. Henry D., Dobson A., Turner C., Variability in the risk of major gastrointestinal complications from nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Gastroenterology*, 1993 ; 105 : 1078-88.
83. Fraser A.G., Pharmacokinetic interactions between alcohol and other drugs. *Clin. Pharmacokin.*, 1997 ; 33 : 79-90.
84. George S.C., Babb A.L., Hlastala P., Modeling the concentration of ethanol in the exhaled breath following pre-test breathing maneuvers. *Ann. Biomed. Eng.*, 1995 ; 23 : 48-60.

Dosage d'éthanol : les erreurs pré-analytiques

Ethanol determination : pre-analyticals errors

A. BOUILLEROT*, C. LAVIANO-ROUSSELIN

Laboratoire, Hôpital de la Musse - 27180 SAINT SÉBASTIEN DE MORSENT

*Auteur à qui adresser la correspondance : Alain BOUILLEROT, Laboratoire, Hôpital de la Musse
27180 SAINT SÉBASTIEN DE MORSENT - Tél : 02 32 29 31 73 - Fax : 02 32 29 31 99
e-mail : abouillero@online.fr

RÉSUMÉ

Le Biologiste Expert n'est pas à l'abri des erreurs pré-analytiques lorsqu'il effectue un dosage d'éthanol qu'il soit d'origine sanguine ou de toute autre origine.

Ces erreurs pré-analytiques qui sont diverses (erreur d'identification, prélèvement coagulé, formation ou dégradation d'éthanol in vitro par un processus microbologique, diffusion passive d'éthanol à partir du contenu gastrique chez le sujet traumatisé décédé, oxydation in vitro, évaporation in vitro) peuvent être plus ou moins importantes quantitativement. Elles seront évoquées devant des résultats discordants mais peuvent malencontreusement restées ignorées dans un certain nombre de cas tout particulièrement en cas de dosage sur sujet décédé lorsque l'Expert ne dispose que d'un prélèvement isolé. Une revue des erreurs pré-analytiques est exposée ; les deux causes principales d'erreurs étant la diffusion passive sur cadavre et les processus microbologiques de synthèse ou de dégradation. Les moyens pour y remédier sont proposés.

MOTS-CLÉS

Erreurs pré-analytiques, Ethanol.

SUMMARY

Pre-analytical errors may occur when testing blood alcohol for a forensic evidence. This article is a review of several pre-analyticals errors. The two most important problems are microbial ethanol production or degradation and ethanol diffusion from gastric and duodenal residues. Solutions to avoid these errors are suggested.

KEY-WORDS

Pre-analyticals errors, Ethanol.

Introduction

En matière de dosage d'éthanol sanguin (ou dans d'autres liquides biologiques d'origine humaine ou non) les erreurs pré-analytiques par leur côté insidieux, par leur éventuelle importance quantitative et par leur potentiel impact médico-légal doivent être dépistées par le Biologiste Expert.

Dans cette brève revue nous tenterons de les définir, nous fournirons quelques exemples et proposerons, à travers une revue de la littérature, les différentes procédures permettant d'échapper à cette crainte si particulière : "produire un résultat analytiquement juste et médico-légalement faux".

Les différents types d'erreurs pré-analytiques du dosage de l'éthanol

Les erreurs d'identification sur les personnes et les échantillons

Citées pour mémoire, elles n'ont rien de spécifiques au dosage d'éthanol, elles sont normalement inexistantes par le recours à une bonne organisation qui implique et concerne les autorités publiques (forces de Police et de Gendarmerie, Justice) et les Laboratoires Experts. L'identification du prélèvement doit comporter : nom patronymique et marital s'il y a lieu, prénom, date de naissance, sexe, date et heure de prélèvement.

La désinfection à l'alcool sur le site de prélèvement

L'effet d'augmentation par application locale d'alcool éthylique au site de prélèvement est nul. Dans une étude personnelle sur 7 cas : des personnels volontaires ont subi une ponction veineuse au pli du coude après désinfection très large et abondante à l'alcool à 70°, toutes les éthanolémies mesurées sont restées au niveau d'indélectabilité, soit inférieur à 0,03 g/l.

Ce résultat déjà bien connu par ailleurs (1, 2), est confirmé dans un article publié en 1998 par deux auteurs suédois Jones A.W. et Jonnson K.A. (3).

Par formation d'un caillot de sang dans le flacon contenant l'échantillon

Le taux sérique de l'éthanol est environ 1,15 à 1,20 fois supérieur à celui du sang total (4, 5, 6, 7).

Dans un prélèvement mal ou insuffisamment agité le sang coagule totalement ou partiellement, il en résulte une séparation entre un liquide "sérique" et le caillot.

Le dosage d'éthanol se pratiquant sur sang total, toute prise d'essai sur un sang coagulé peut entraîner des erreurs car il est impossible de prélever correctement un échantillon représentatif de sang total sur un prélèvement coagulé. Voir résultats du tableau I.

Si la conséquence pratique de cet effet reste relativement limitée, la variation des taux d'éthanolémie étant toujours inférieure à 20%, elle est dans la pratique difficile à estimer sauf à disposer d'un deuxième échantillon non coagulé.

NB : Un moyen simple pour estimer approximativement le taux de dilution par le sérum (ou par tout autre liquide exogène ou endogène) est de mesurer le taux d'hémoglobine dans l'échantillon. Cependant on ne connaît généralement pas le taux réel d'hémoglobine du sujet chez lequel est dosé l'éthanolémie, en conséquence seuls les taux d'hémoglobine bas ou très bas sont significatifs.

Tableau I : Comparaison des taux d'éthanolémie mesurés entre deux échantillons prélevés au même moment sur un même sujet mais avec et sans agitation au moment du recueil sur fluorure oxalate (série personnelle sur 6 cas).

Sang n°	ethanol sur sang total non coagulé g/l	Ethanol sur sang coagulé Prise d'essai "sérique" avec taux d'hémoglobine bas g/l
1	0,28	0,34
2	1,94	2,30
3	0,78	0,89
4	1,19	1,39
5	0,85	1,02
6	1,74	2,06

Par production et/ou dégradation d'éthanol par un processus microbologique

Modalités

En présence de substrats fermentescibles : glucidiques endogènes ou de xénobiotiques comme le mannitol (8), ou de substrats protidiques ou apparentés (amines, purines, pyrimidines) un grand nombre d'espèces de micro-organismes (levures et bactéries), sont capables en fonction des conditions physico-chimiques de leur environnement de synthétiser de l'éthanol ou de le dégrader. Ces phénomènes sont connus depuis longtemps (9, 10) et concernent essentiellement le dosage d'éthanol sanguin sur cadavre. Après un temps initial de synthèse d'éthanol par le micro-organisme en cause, un deuxième temps de dégradation de l'éthanol est pos-

sible, cette inversion métabolique est fonction des substrats énergétiques disponibles pour le micro-organisme et de la diversité des micro-organismes présents. Certains micro-organismes à métabolisme oxydatif non fermentaire ne peuvent cependant que dégrader l'éthanol sans pouvoir en synthétiser (*Pseudomonas spp* par exemple).

Ces phénomènes de production et de dégradation peuvent être quantitativement élevés : la revue de la littérature (11, 12, 13, 14) ainsi que des exemples vécus personnels et des simulations in vitro relèvent des variations de taux d'éthanolémie allant de 0,10 g/l à 3,00 g/l, plus communément compris entre 0,20 et 1,50 g/l.

Cette production et/ou dégradation d'éthanol peut s'observer et se dérouler :

- Par production d'éthanol sur le cadavre avant prélèvement : dans les premières heures après le décès les bactéries du tractus digestif envahissent le sang portal et en moins de six heures le système circulatoire systémique. Par prolifération microbienne et rupture des membranes anatomiques, un cadavre peut être le siège de processus fermentatifs dans le sang, le liquide gastrique et les urines. Le dosage de l'éthanol dans l'humour vitré de l'œil, ce dernier restant très généralement à l'écart d'une contamination microbienne, constitue alors un contrôle de choix pour la validation de l'éthanolémie (11).

- In vitro, sur échantillon de sang prélevé sur cadavre : dans le flacon de sang (ou de tout autre liquide biologique d'origine humaine ou non) quand son contenu est contaminé par un micro-organisme à pouvoir fermentatif ou à pouvoir oxydatif de dégradation de l'éthanol (genre *Pseudomonas spp* par exemple), tout en sachant que les deux types de phénomènes peuvent coexister soit simultanément soit en se succédant dans le temps. Un même sujet décédé peut de plus avoir été prélevé sur deux ou plusieurs sites différents, un ou seulement deux ou l'ensemble de ces sites peuvent alors présenter un phénomène de production (ou de dégradation) d'éthanol in vitro. L'analyste peut dans ce cas de figure obtenir des taux d'éthanolémies différents selon les sites contaminés.

- In vivo, on peut observer une synthèse d'éthanol endogène chez le sujet vivant (mais il ne s'agit plus là à proprement parler d'une erreur pré-analytique mais d'un phénomène d'alcoolisation "endogène" lié le plus souvent à une pathologie digestive préexistante avec stase et régurgitation gastrique, jejuno-colique ou colique sur pullulation intra-luminale de levures sans apport d'éthanol exogène). Cette situation peut se rencontrer en particulier en suites de chirurgie digestive. La littérature cite plusieurs cas de ce *syndrome de fermentation alcoolique intra-gastrointestinal* (en particu-

lier chez les Japonais) : citons entre autres l'observation d'une patiente de 25 ans qui quelques temps après l'ingestion d'un repas riche en glucides présentait un état ébrié avec éthanolémie à 2.54 g/l (15, 16). L'incidence dans la population générale de ce syndrome n'est pas connue mais probablement très faible.

Germes producteurs d'éthanol par voie fermentative les plus fréquemment rencontrés

Une étude sur des dizaines de micro-organismes responsables a été menée par Bonnischen et coll. (17). Citons parmi les plus souvent rencontrés : les entérobactéries et les levures : *Candida spp* et fréquemment *Candida albicans*. Cette liste ne saurait être exhaustive. Les cocci gram positif ne sont pas producteurs d'éthanol (Streptocoques et Staphylocoques) car ils ne produisent que de l'acide lactique (12).

Germes de l'environnement responsables de la dégradation d'éthanol par oxydation

On retrouve le plus souvent le genre *Pseudomonas* très prototrophe et en particulier *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* (12). De nombreuses bactéries à gram négatif aérobies strictes présentes dans l'environnement pourraient également dégrader l'éthanol (genres *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Xanthomonas*...). Ce phénomène de dégradation est essentiellement un phénomène in vitro. L'étude complète de ces souches comme agents bactériens dégradant l'éthanol in vitro n'a pas à notre connaissance été réalisée, elle demeure également mal connue sur le cadavre où ce phénomène de dégradation demeure théoriquement possible. Dans une étude personnelle nous avons mesuré que *Pseudomonas putida* peut dégrader en 48 heures 40% de l'éthanol présent dans un échantillon à température ordinaire et 20% sur le même échantillon conservé au froid. (Tous ces échantillons de sang étant recueillis sur tubes à fluorure de sodium (NaF) 0,25% p/v, qui est la concentration de routine utilisée en France : voir les résultats tableau II).

Tableau II : Évolution cinétique de la dégradation d'éthanol in vitro par *Pseudomonas putida* sur échantillons de sang à ajouts dosés à 0,73 g/l d'éthanol. Effets de la concentration en inhibiteur NaF et du froid.

Jours	Ethanolémie en g/l			
	NaF 0,25% p/v	NaF 0,25% p/v	NaF 1% p/v	NaF 1% p/v
	20°C	4°C	20°C	4°C
0	0,73	0,73	0,73	0,73
2	0,43	0,56	0,54	0,66
4	0,29	0,50	0,31	0,60
7	0,00	0,47	0,10	0,54

Principaux mécanismes en cause

- Pour la synthèse : fermentation des glucides simples ou complexes : fermentation alcoolique pour les levures, fermentation acide mixte pour les entérobactéries (12).

- Pour la dégradation : oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde puis en acétate .

Une même espèce peut selon les orientations métaboliques (pression partielle en oxygène, disponibilité de substrats glucidiques, conditions physico-chimiques...) produire ou dégrader de l'éthanol. C'est notamment le cas de *Candida albicans* (12).

Voir Tableau III : l'évolution cinétique typique d'un échantillon de sang contaminé par *Candida albicans* et/ou *Escherichia. coli* non conservé au froid, non inhibé par un inhibiteur chimique à concentration efficace.

Tableau III : Évolution cinétique de la formation in vitro d'éthanol dans un échantillon de sang contaminé par *C.albicans* et/ou *E.coli* non conservé au froid, non inhibé par NaF à concentration efficace.

Jours après décès	Ethanolémie en g/l
1	0,00
3	0,20
5	0,30
8	0,60
12	1,20
15	1,70
20	1,40
30	1,00
35	0,60
40	0,15

Les phénomènes microbiologiques de production ou de dégradation d'éthanol in vitro sont dépendants :

- De la présence de fluorure de sodium comme inhibiteur des métabolismes microbiens. Rappelons qu'en pratique médico-légale, des variations même extrêmes de la concentration en NaF (jusqu'à 3 % p/v) (18) dans l'échantillon de sang n'ont qu'une très faible influence sur le taux d'éthanol mesuré en chromatographie en phase gazeuse. La formation d'éthanol in vitro est inhibée par la présence de NaF au *taux minimal de 1% p/v* dans l'échantillon. L'inhibition obtenue est meilleure au taux de 1,5 % p/v et plus encore à celui de 2%p/v. Les taux de NaF inférieurs à 1% p/v sont très nettement

insuffisants. Ce sont pourtant ceux qui sont pratiqués en France. Ainsi la formation d'éthanol in vitro sur échantillon de sang par *Candida albicans* n'est pas suffisamment inhibée au taux de NaF de 0,25% p/v usuellement utilisé en France. Une simulation in vitro simple permet d'obtenir dans un tube de 5 ml sous vide de type "fluorure-oxalate" contenant 11 à 13 mg de NaF par tube (soit 0,22 à 0,26% p/v pour 5ml de sang) et ensemencé in vitro par *C. albicans* avec une concentration en glucose variant de 2g/l à 10 g/l, une concentration en éthanol allant de 0.55 à 2.30 g/l. (étude personnelle non publiée).

Pour la dégradation in vitro de l'éthanol, nous avons vu plus haut que la cinétique en est relativement rapide et que son amplitude peut dépasser 50% en 5 jours et 100% en une semaine pour certaines espèces du genre *Pseudomonas*, en particulier sur les prélèvements non conservés au froid. La congélation de l'échantillon comme pour la synthèse in vitro procure la meilleure inhibition de la dégradation in vitro. Le NaF même au taux de 1% n'est en effet pas totalement efficace .Voir les résultats tableau II.

La première explication sur la relative inefficacité du fluorure de sodium en tant qu'agent inhibiteur est que cette concentration en NaF de 1% p/v n'est pas atteinte dans les tubes de sang utilisés en routine pour les déterminations d'éthanol sanguin médico-légaux. En effet les flacons de prélèvement pour dosage d'éthanol remis par les DDASS aux autorités judiciaires sont soit des tubes sous vide de 5 ml contenant 11 à 13 mg par tube de NaF avec une concentration pour 5 ml de sang de 0,25 % de NaF environ ; soit des flacons en verre de 15 ml à bouchon à vis contenant 50 mg de NaF. Dans ce dernier cas la concentration en NaF sera fonction du remplissage du flacon : elle est de 0,5% p/v pour 10 ml et de 1% pour 5 ml, par contre elle n'est plus que de 0,3 % pour 15 ml .

- De la température : le froid inhibe de moyennement à fortement et la congélation totalement les métabolismes des micro-organismes. Ceci est surtout vrai pour la formation d'éthanol in vitro, la dégradation au froid in vitro de l'éthanol par certaines souches (*Pseudomonas putida*) restant possible avec une cinétique plus lente. (soit 13 et 17 % en 5 jours à 4°C pour des échantillons contenant 1% et 0,25 % p/v respectivement de NaF voir tableau II). Malheureusement en pratique, les échantillons de sang ne sont pas toujours conservés au froid après leur prélèvement et jusqu'à leur arrivée au laboratoire (voyage par la Poste ; délais de conservation par les autorités publiques...) et le Biologiste ignore en général si la mise au froid a été respectée.

- De la présence de substrats fermentescibles glucidiques et/ou protidiques endogènes (glucose, lactates, glycogène, protéiniques ou apparentés...) ou exogènes à usage thérapeutique (sérum glucosés, mannitol) lors de la contamination microbiologique du prélèvement.

Par diffusion passive d'éthanol post-mortem

C'est avec les phénomènes microbiologiques décrits plus haut une deuxième cause d'erreur pré-analytique. Elle est à redouter chez tout sujet polytraumatisé.

A partir du contenu gastrique ou duodéal (en phase pré-absorptive) ou à partir des voies aériennes contaminées par du contenu gastrique ; l'éthanol peut diffuser vers les espaces contigus loco-régionaux. Ceci est particulièrement à craindre en cas de décès par traumatisme (thorax et abdomen) (19). C'est pourquoi il faut s'abstenir de prélever un échantillon sanguin près du cœur ou des gros vaisseaux ou dans le sac péricardique.

L'erreur liée à une diffusion passive peut alors atteindre des niveaux élevés jusqu'à 400% par rapport aux veines périphériques (11). Malheureusement les sites de nombreux prélèvements sur sujets décédés sont non renseignés ou notés : intracardiaque, sous-clavière, intra-thoracique, cavité abdominale, à la louche ou qualifiés de "prélèvement difficile".

Les veines périphériques et en particulier fémorales représentent le meilleur site de prélèvement pour le sang (11). Elles doivent toujours être choisies préférentiellement.

Par oxydation lente in vitro de l'éthanol

Cette cause de diminution in vitro de l'éthanolémie est plus mineure. Elle a été étudiée par deux auteurs Smalldon K.W. et Brown G.A. (20) : selon ces auteurs la cinétique est de 2,9 mg/l et par jour, très température dépendante, non inhibée par le fluorure de sodium à la concentration de 1% p/v. Cette oxydation nécessite un système enzymatique érythrocytaire lié à l'oxyhémoglobine et à la méthémoglobine (elle est donc nulle dans le sérum). L'ampleur de la perte en éthanol si l'échantillon a été conservé à température ordinaire est de l'ordre de 0,20 g/l en quelques semaines pouvant atteindre en 18 mois 0,35 g/l. D'après Scaplehorn A.W. (21) la perte d'éthanol est augmentée quand le volume d'air augmente dans le flacon. Les inhibiteurs retenus pour limiter cette oxydation sont avant tout le froid. L'azide de sodium serait un meilleur inhibiteur que le fluorure de sodium.

Par évaporation de l'éthanol par un flaconnage mal fermé

Cette cause de perte en alcool est décrite par Brown G.A.(22), qui détecte lors de son enquête en Grande Bretagne sur des flacons mis à disposition des forces de Police jusqu'à 5% de bouchonnage défectueux responsable de perte en éthanol.

Erreurs pré-analytiques d'origines inconnues et pourtant réelles sans aucune hypothèse sérieuse identifiée

Nous citerons un cas personnel vécu et qui n'est pas exceptionnel : celui d'un dosage d'éthanolémie pour infraction routière sur sujet vivant avec un taux sur tube n°1 à 10,00 g/l et contrôle sur tube n°2 à 2,00 g/l. Un dosage d'éthanolémie effectué sur ce patient à partir d'un échantillon de sang prélevé sur un autre tube au même moment dans le Centre Hospitalier donnait également 2,00 g/l. Hormis l'énormité du taux d'éthanolémie du résultat n°1, rien ne permettait de remettre en question le premier résultat. L'enquête menée sur ces divergences n'a pas permis de comprendre l'origine de l'éthanol ainsi présent dans le tube n°1 (il n'y avait pas de problème analytique en cause).

Les moyens de lutte contre l'erreur pré-analytique lors du dosage d'éthanol

Ils procèdent des mécanismes décrits plus haut :

Identification exacte du sujet et du flacon.

Organisation correcte pour éviter les erreurs d'identification.

Doser l'hémoglobine

Faire un taux d'hémoglobine sur l'échantillon sanguin pour évaluer les dilutions du sang total qu'elles soient liées à l'apport d'un liquide exogène ou résultant d'une coagulation partielle ou totale de l'échantillon. Cependant devant l'ignorance des antécédents du taux réel d'hémoglobine du sujet on ne peut détecter ainsi que les dilutions les plus flagrantes. On peut remarquer que le taux d'hémoglobine est stable plusieurs mois dans un échantillon conservé au froid et même si son aspect est complètement hémolysé.

Ajout d'éthanol d'origine inconnue

On ne peut rien déceler sur un tube unique s'il y a eu ajout d'éthanol pour une raison inconnue (exemple personnel vécu, voir plus haut) sauf à obtenir des taux extravagants provoquant alors une remise en cause du résultat.

Prélever sur NaF à 1% p/v minimum et mieux à 1,5% ou 2% p/v

N'accepter que des prélèvements réalisés sur fluorure de sodium-oxalate de potassium, se méfier de tout autre modalité de recueil du sang. Cependant cette exigence ne permet pas d'éviter toutes les erreurs pré-analytiques : d'une part il peut y avoir eu synthèse préalable d'éthanol sur cadavre, d'autre part le fluorure de sodium est en France le plus souvent utilisé à la concentration de 0.2 à 0.3 % p/v, au lieu du 1 % p/v minimum recommandé par tous les auteurs (22) pour l'inhibition efficace des micro-organismes. Les concentrations en NaF à taux inférieur à 1% p/v n'inhibent que partiellement la synthèse ou la dégradation d'éthanol en présence de certains microorganismes (en particulier les levures et les Pseudomonas). Malheureusement il ne semble pas possible en France de pallier facilement cette difficulté compte tenu des dispositifs mis en place pour effectuer les prélèvements. Seule la technique qui consiste à ne remplir que partiellement les flacons soit à 5 ml pour les flacons à vis soit à 1 ml pour les flacons sous vide de 5 ml, bien que peu maniable en pratique, peut être recommandée dans le but d'obtenir des concentrations au moins égales à 1% p/v en NaF. Les concentrations à 1,5 ou 2% p/v sont les plus recommandables. Afin d'obtenir en routine les meilleures conditions de prélèvement, il faudra remettre en cause les habitudes actuelles, c'est à dire : le type de flacon, sa teneur en NaF et sa capacité de résistance à la congélation.

Importance du site anatomique de prélèvement

Pour éviter les problèmes d'erreurs liées à la diffusion passive sur cadavre à partir du contenu gastrique, duodénal ou des voies respiratoires, il faut prélever le sang en veine périphérique (fémorale) ; éviter les prélèvements intracardiaques, en sac péricardique, dans les gros vaisseaux, intra-thoraciques, ou intra-abdominaux (22).

Obtenir d'autres liquides biologiques

Ce point est crucial car il permet le plus souvent de déjouer les erreurs pré-analytiques les plus fréquentes et les plus graves. Il faut obtenir du médecin légiste et de tout autre médecin préleveur (SAMU, Urgences etc...) d'autres échantillons d'autres liquides biologiques prélevés sur d'autres sites anatomiques (urines, et surtout humeur vitrée, clé de l'interprétation en cas de doute, et quasiment toujours aisée à ponctionner) (2). De plus tous ces prélèvements doivent être recueillis sur NaF au taux de 1% p/v minimum .

Procéder à une étude critique des résultats obtenus

Un taux d'éthanol élevé dans le sang avec des taux nuls ou très bas dans l'humeur vitrée ou les urines doit faire

rejeter le résultat sanguin ; de même des divergences importantes entre deux échantillons sanguins situés sur deux sites différents, ou encore une variation cinétique rapide des taux (en 2 à 8 jours) et/ou suffisamment importante (de plus de 0,20 g/l) sur un même échantillon doit faire évoquer une souillure microbiologique du prélèvement.

Mise en culture des échantillons

Procéder à une mise en culture de l'échantillon en cas de doute sur une éventuelle souillure microbiologique. Si la culture est positive à levures, entérobactéries ou bacille à gram négatif à métabolisme oxydatif ne pas rendre le résultat, sauf à pouvoir le corrélérer à un autre prélèvement sur vitrée ou urine.

Conservation des échantillons

Conserver les échantillons au froid et mieux encore congelés pour inhiber les processus microbiologiques. Inciter les autorités publiques à transmettre les prélèvements en respectant cette chaîne du froid (2).

Présence d'autres corps volatils retrouvés en Chromatographie en Phase Gazeuse

Ne pas se fier à la présence ou à l'absence en CPG de corps volatils comme acétaldéhyde, acétone, propanols, butanols qui selon Canfield D.V. (23) ne sont pas probants d'une synthèse d'éthanol en post-mortem contrairement à ce que soulignait Stone B.E. (24) en 1984. En effet Canfield relève la présence de ces corps volatils aussi bien dans les cas prouvés de synthèse post-mortem d'éthanol que dans les cas prouvés de prise d'éthanol exogène.

Conclusion

A l'instar de Derrick Pounder qui écrivait en 1998 dans le British Medical Journal : "dead sober or dead drunk"? (11) nous pouvons dire qu'il n'est pas toujours si facile en matière de dosage d'éthanol sanguin d'être toujours absolument sûr de tenir la "vérité". Si l'analyste peut certes être "analytiquement" sûr de son dosage d'éthanol dans l'échantillon qu'on lui présente et au moment où il pratique son dosage, l'erreur pré-analytique est en revanche beaucoup plus insidieuse. Le Biologiste Expert ne peut pas toujours et avec certitude, en particulier dans les situations de dosage d'éthanolémie sur cadavre (que ce soit dans une affaire criminelle ou dans le cadre des accidents de la voie publique) être certain qu'une erreur pré-analytique ne s'est pas glissée avant d'effectuer son analyse pour en rendre le résultat médico-légalement erroné dans son interprétation; *sauf à disposer de plusieurs échantillons biologiques prélevés sur des sites anatomiques différents* tout particulièrement *urines et humeur vitrée* permettant de valider le résultat du dosage sanguin.

Références

1. Boiteau H.-L., Nicolas G., Gelot S., Robin M., Desjars P. Influence de la désinfection de la peau par l'éthanol sur le taux de l'alcoolémie. *Méd. Lég. Domm. Corp.* 1974 ; 7 : 51-2.
2. Deveaux M. Alcool éthylique. Toxicologie et pharmacologie médico-légales. Kintz P., Ed Elsevier, 1998 : 111-26.
3. Jones A.-W., Jonnson K.-A. Alcohol as a disinfectant resulted in zero per thousand in blood (letter) *Lakartidningen.* 1998 Sep 16 ; 95 (38) : 4052.
4. Winek C.-L., Carfagna M. Comparison of plasma, serum and whole blood ethanol concentrations. *J. Anal. Toxicol.* 1987 ; 11 : 267-8.
5. Hak E.-A., Gerlitz B.-J., Demont P.-M., Bowthorpe W.-D. Determination of serum alcohol ratios. *Can. So. Forensic Sci. J.* 1995 ; 28 : 123-26.
6. Charlebois R.-C., Corbett M.-R., Wigmore J.-G. Comparison of ethanol concentrations in blood, serum, and blood cells for forensic application. *J. Anal. Toxicol.* 1996 ; 20 ; (3) : 171-8.
7. Kurt T.-L. Serum alcohol is not the same as blood alcohol concentration. *Ann. Emerg. Med.* 1995 ; 25 : 430-1.
8. Jones A.-M., Andersson R., Sakshaug J., Morland J. Possible formation of ethanol in postmortem blood specimens after antemortem treatment with mannitol. *J. Anal. Toxicol.* 1991 ; 15 : 157-8.
9. Nicloux M. Dosage de l'alcool dans le sang et les tissus putréfiés. *CR Soc. Biol.* 1935 ; 121 : 1301.
10. Nicloux M. L'alcool dans le sang putréfié et chez le cadavre. *Néoforation. Bull. Soc. Chim. Biol.* 1936 ; XVIII/2 : 318-51.
11. Pounder D. Dead sober or dead drunk ?. *B.M.J.* 1998 ; 316 : 87
12. Laviano C. Production et consommation d'éthanol post-mortem dans deux liquides biologiques. *Ann. Biol. Clin.* 1998 ; 56 : 96-9
13. Gilliland M.-G.-F., Bost R.-O. Alcohol in decomposed bodies : post-mortem synthesis and distribution. *J. Forensic Sci.* 1993 ; 38 : 1266-74.
14. O'Neal C.-L., Poklis A. Postmortem production of ethanol and factors that influence interpretation. A critical review. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 1996 ; 17 : 8-20.
15. Kaji H., Asanuma Y., Yahara O., et al. Intragastointestinal alcohol fermentation syndrome : report of two cases and review of the litterature. *J. Forensic Sci. Soc.* 1984 ; 24 : 461-71.
16. Davies J.-N.-P. Endogenous production of alcohol in humans. *J. Forensic Sci. Soc.* 1985 ; 25 : 299.
17. Bonnischen R., Halstrom F., Moller K.-O., Theorell H. Developpement of ethanol in blood samples and human organs during forensic chemical practise. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 1953 ; 9 : 352-61.
18. Jones A.-W. Salting-out effect of sodium fluoride and its influence on the analysis of ethanol by head-space gas chromatography. *J. Anal. Toxicol.* 1994 ; 18 : 292-3.
19. Backer R.-C., Pisano R.-V., Sopher I.-M. The comparison of alcohol concentrations in post-mortem fluids and tissues. *J. Forensic Sci.* 1980 ; 25 : 327-31.
20. Smalldon K.-W., Brown G.-A. The stability of ethanol in stored blood. Part II : The mecanism of ethanol oxidation. *Anal. Chim. Acta.* 1973 ; 66 : 285-90.
21. Scaplehorn A.-W. Home Office Centr. Res. Establ. Rep. 1970 ; n°35.
22. Brown G.-A., Neylan D., Reynolds W.-J., Smalldon K.-W. The stability of ethanol in stored blood. Part I : Important variables and interpretation of results *Anal. Chim. Acta.* 1973 ; 66 : 271-83.
23. Canfield D.-V., Kupiec T., Huffine E. Postmortem alcohol production in fatal aircraft accidents. *J. Forensic Sci.* 1993 ; 38 ; 4 : 914-17.
24. Stone B.-E. A study Using Body Fluids to Determine Blood Alcohol. *J. Anal. Toxicol.* 1984 ; (17) ; 8 : 95-6.

Contrôles externes de qualité pour l'alcoolémie : évaluation des résultats (1996 à 1998)

External quality controls for ethanol in blood : results for 1996-1998

M. DEVEAUX*⁽¹⁾, D. GOSSET⁽¹⁾
et la Commission Assurance de Qualité de la S.F.T.A.

(1) Institut de Médecine Légale, place Théo Varlet - 59000 LILLE

*Auteur à qui adresser la correspondance : M. DEVEAUX, Institut de Médecine Légale, place Théo Varlet
59000 LILLE - Tél : 03 20 62 12 23 - Fax : 03 20 62 12 29

RÉSUMÉ

Les dosages d'alcool éthylique dans le sang sont encore très fréquents malgré la multiplication des éthylomètres. les changements récents intervenus dans les fiches A, B et C et les différentes tarifications selon la méthode utilisée imposent la plus grande vigilance aux biologistes - experts. Seules la méthode chimique de Cordebard et la chromatographie en phase gazeuse sont officielles. Ayant constaté la grande diversité des méthodes employées et la fréquence de l'utilisation des méthodes enzymatiques, non officielles, la SFTA a proposé à ses membres ainsi qu'à ceux de la CNBAE, un contrôle externe de qualité pour le dosage de l'éthanol dans le sang. Il est géré par la commission assurance de qualité en liaison avec le fabricant finlandais Labquality® pour la préparation des échantillons et le traitement statistique des résultats. . Il comprend deux fois deux échantillons, dont l'un contient d'autres alcools aliphatiques. Les résultats des derniers contrôles sont comparés dans cette étude. Le nombre de participants augmente de 10% par an et ils se répartissent toujours entre une activité médico-légale (32%), clinique (43%) et mixte (43%). Les résultats du premier contrôle ont eu l'effet escompté et le nombre de laboratoires utilisant la CPG a augmenté de 30% depuis. Pour tous les niveaux de concentration, les résultats (écarts-types, coefficient de variation) sont améliorés par cette méthode mais pas pour les méthodes enzymatiques. Ces résultats plaident donc pour l'utilisation systématique de la CPG et la participation assidue à un contrôle externe de qualité.

MOTS-CLÉS

Contrôle externe de qualité, alcoolémie.

SUMMARY

Despite the use of ethylometers, numerous blood alcohol testing are done. Experts have to be careful because the A, B and C forms and the price (different with the method) have recently change. Only Cordebard's method and gas chromatography are officially allowed methods. The SFTA (French Society of Analytical Toxicology) and the CNBAE (National Assembly for Experts on Toxicology) have proposed to their members to take part in an external quality control for blood alcohol testing. The Quality Assurance Committee and the Finnish dealer of the samples took responsibility for preparing the samples and for analysing the results. We propose two samples twice a year, with different levels. One of them contains other aliphatic alcohols. This paper compares the results of the last three controls. Number of participants is 10% up each year. 25% are clinical labs, 32% forensic labs and 43% both. Use of GC was 39% up between 1996 and 1998. Standard deviation and C.V. are improving only for CG, not for enzymatic methods. So we plead for using gas chromatography and for participating to an external quality control.

KEY-WORDS

External quality control, blood, alcohol.

Introduction

Dès sa création en 1988, la Société Française de Toxicologie Analytique (SFTA) s'est préoccupée de promouvoir la bonne qualité des analyses toxicologiques. Ainsi depuis 1992, elle propose à ses adhérents un contrôle externe de qualité pour la recherche et le dosage de psychotropes et stupéfiants (licites et illicites) dans les urines. Ce n'est qu'en 1996 que la commission Assurance de Qualité de la SFTA a mis en place un contrôle externe de qualité pour l'alcoolémie.

En effet, malgré la multiplication des éthylomètres et la généralisation de leur utilisation, les dosages d'alcool dans le sang ont encore de beaux jours devant eux, ne serait-ce que du point de vue de la surveillance clinique. Concernant l'évaluation de l'imprégnation alcoolique des conducteurs, ne sont toujours officielles que la méthode chimique de Cordebard et la chromatographie en phase gazeuse. Les changements récents intervenus dans les fiches A, B, et C et les différentes tarifications selon la méthode employée imposent la plus grande vigilance aux experts en toxicologie et aux biologistes-experts [1, 2].

Législation actuelle

Depuis 1995, deux taux limites d'imprégnation alcoolique sont utilisés pour distinguer la contravention du délit de conduite en état alcoolique : si l'alcoolémie est supérieure ou égale à 0,5 g/l mais inférieure à 0,8 g/l il s'agit d'une contravention ; si elle est supérieure ou égale à 0,8 g/l, il s'agit d'un délit. Contrairement aux mesures faites dans l'air expiré par éthylomètre, aucune incertitude n'est tolérée officiellement [3].

Deux méthodes officielles ont été publiées au Journal Officiel (revue des textes législatifs dans [1]) : la méthode chimique de Cordebard après distillation qui date de 1955, intégralement décrite dans le Journal Officiel, rémunérée B 50, et la méthode par chromatographie en phase gazeuse (CPG), rémunérée B 120. Les arrêtés d'applications du décret autorisant cette méthode n'ont jamais été publiés, ce qui laisse le libre choix pour la colonne, le mode d'injection, la température, l'étalon interne. C'est pourtant du point de vue scientifique, la méthode de référence actuelle.

Les méthodes enzymatiques sont utilisées en clinique à cause de leur simplicité et de leur automatisation possible. Pour la Sécurité Sociale, un dosage par l'une de ces méthodes est coté B 50. Malheureusement, il en existe actuellement une quinzaine sur le marché qui n'ont pas toutes des performances identiques. Ces différences ont été bien étudiées par Mallandain [4]. Ces méthodes ne sont pas autorisées pour les dosages d'alcool dans le sang des conducteurs, et une enquête rapide a montré pourtant qu'environ la moitié des

alcoolémies effectuées dans un cadre médico-légal dans les laboratoires hospitaliers ou privés étaient effectuées par une technique enzymatique. Enfin, les contrôles externes de qualité pour l'alcoolémie ne sont pas obligatoires et les derniers résultats publiés datent de 1989 [5].

Pour remédier à cette situation, deux actions ont été menées : 1/ revalorisation de la CPG à B 120 [6], grâce aux efforts de G. Pépin, vice-président de la Compagnie Nationale des Biologistes et Analystes Experts (CNBE) et 2/ mise en place en 1996, conjointement avec la CNBE, d'un contrôle externe de qualité pour le dosage de l'éthanol et d'autres alcools aliphatiques dans le sang. Le succès fut immédiat et nous en décrivons ci-dessous les principaux résultats.

Organisation du contrôle

Les échantillons sont achetés au spécialiste finlandais du contrôle externe de qualité Labquality®. Il les prépare et les envoie directement par la poste à chaque participant. Le traitement statistique des résultats est effectué avec la Commission Assurance de Qualité de la SFTA. En 1996 et 1997, il y a eu un envoi de trois échantillons de sang total sur fluorure, avec trois taux différents d'éthanol. Un des échantillons contenait un ou plusieurs autres alcools aliphatiques. En 1998, le contrôle consistait en deux envois de deux échantillons. Il peut toujours y avoir un ou deux autres alcools aliphatiques. Le fabricant garantit et vérifie la stabilité des échantillons pendant 8 semaines.

Résultats

La répartition des participants est donnée dans le tableau I. Les trois méthodes (CPG, enzymatique et chimique) sont utilisées pour le dosage, mais seuls 1 à 2 laboratoires travaillent encore avec la méthode chimique. Cette méthode ne sera donc pas prise en compte par la suite. La répartition de leur utilisation est décrite dans le tableau II.

Tableau I : Répartition des participants au contrôle externe de qualité pour l'alcoolémie.

année	inscrits	taux de réponse
1996	71	97%
1997	84	99%
1998	94	94%
activité des laboratoires		
clinique	25%	
médicolégale	32%	
mixte	43%	

Tableau II : Répartition des méthodes utilisées pour le dosage de l'éthanol dans le sang.

méthode	1996	1997	1998
CPG	61%	63%	65%
Enzymatique	38%	36%	34%
Chimique	1%	1%	1%

Les figures 1 à 3 montrent l'évolution des écarts-types et des coefficients de variation pour les différentes concentrations et les différentes méthodes.

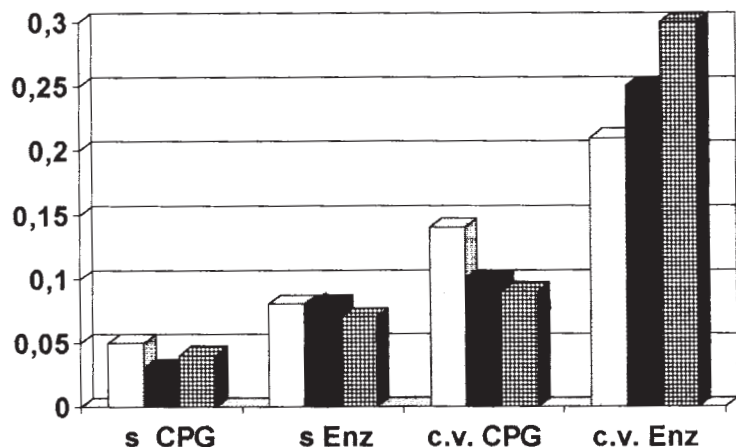


Figure 1 : Alcoolémie située entre 0,3 et 0,5 g/l. Évolution des écarts-types (s) et des coefficients de variation (c.v.) pour 1996, 1997, et 1998 pour la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et les méthodes enzymatiques (Enz).

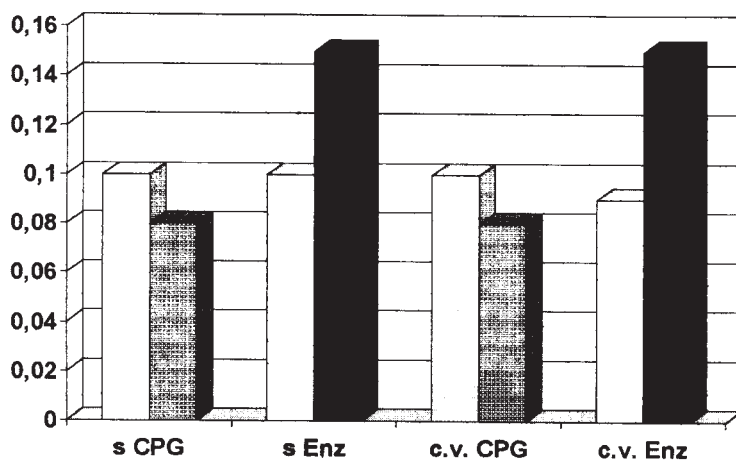


Figure 2 : Alcoolémie à 1 g/l. Évolution des écarts-types (s) et des coefficients de variation (c.v.) pour 1996 et 1997 pour la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et les méthodes enzymatiques (Enz).

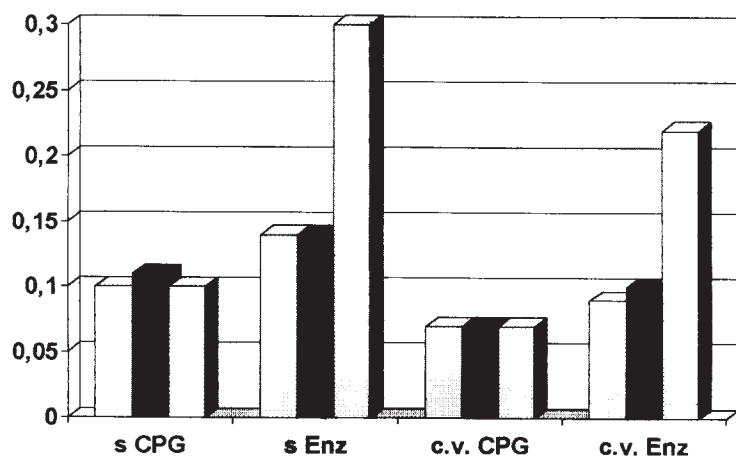


Figure 3 : Alcoolémie à 1,5 g/l. Évolution des écarts-types (s) et des coefficients de variation (c.v.) pour 1996, 1997 et 1998 pour la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et les méthodes enzymatiques (Enz).

Discussion et conclusion

Le nombre de participants aux contrôles externes de qualité pour le dosage de l'éthanol a progressé régulièrement : + 18 % de 1996 à 1997 ; + 12 % de 1997 à 1998. Le taux de réponse est stable, entre 94 et 99 %. En deux ans, l'utilisation de la CPG a fait un bond de 38 %. Le nombre d'utilisateurs de la méthode enzymatique baisse lentement.

L'examen des figures 1 à 3 montre que sur trois ans, les écarts-types et les coefficients de variation ont diminué pour la CPG, mais pas pour les méthodes enzymatiques. On peut donc estimer que le but de la commission Assurance de Qualité de la SFTA est atteint en partie, puisque spécificité et précision sont améliorées quand on utilise la CPG.

L'étude détaillée des premières données de 1998 (deux échantillons seulement) montre cependant qu'un facteur 3 sépare les écarts-types et les coefficients de variation obtenus par CPG et par les méthodes enzymatiques. Si on considère que les méthodes enzymatiques sont utilisées de préférence en biologie clinique et que la CPG est plutôt utilisée dans le cadre médico-légal, il apparaît justifié de suivre les recommandations du fabricant quant aux limites analytiques acceptables [3, 7]. Pour la médecine légale (et donc la CPG), on prendra la moyenne +/- 5 %. Pour la clinique, on prendra la moyenne +/- 10 %. Le tableau III montre clairement que la précision requise n'est pas atteinte, puisque les écarts-types sont toujours supérieurs aux fourchettes de 5 % et même de 10 %. Les laboratoires devront donc fournir un effort supplémentaire pour parvenir à une précision suffisante dans le cadre médico-légal.

Tableau III : Comparaison des écarts-types et des fourchettes de 5 % et 10 % de la valeur moyenne pour la CPG et pour les méthodes enzymatiques. Les valeurs de trois années sont prises en compte.

méthode	valeur cible (g/l)	s	10%	5%
CPG	0,30	0,09	0,03	0,01
	0,46	0,06	0,04	0,02
	0,98	0,08	0,09	0,04
	1,45	0,11	0,14	0,07
	1,47	0,16	0,14	0,07
Enz	0,31	0,14	0,03	0,01
	0,47	0,14	0,04	0,02
	0,99	0,15	0,09	0,05
	1,34	0,29	0,13	0,06
	1,44	0,21	0,14	0,07

Références

1. Deveaux M. Alcool éthylique. In : Toxicologie et pharmacologie médico-légales. Paris : Elsevier, 1998 ; 111-126.
2. Deveaux M., Rousseaux J., Amouroux H.V., Muller P.H. Le biologiste hospitalier et les dosages d'alcool dans le cadre de la lutte contre l'alcoolisme au volant. 7^{èmes} Journées Lilloises de Biologie Clinique, Le Touquet, 5 octobre 1989
3. Deveaux M., Gosset D., Commission Assurance de Qualité de la SFTA. Contrôle externe de qualité pour l'alcoolémie : limites analytiques acceptables. 42^{ème} Congrès International de Médecine Légale, Lille, 9-11 septembre 1998.
4. Mallandain H., Bourdon J.-H., Cano Y. et coll. Étude multicentrique du dosage automatisé de l'éthanolémie par méthode enzymatique. Toxicorama. 1997 ; IX/3 : 157-160.
5. Le Hénaff Y., Contrôle de qualité spécialisé : alcoolémie. Annales de contrôle de qualité. 1990 ; mai : 56-59.
6. Décret n° 97-525 du 26 mai 1997 modifiant le code de procédure pénale et relatif aux frais de justice. Journal Officiel de la République Française. 1997 ; 8077.
7. Deveaux M., Gosset D. Driving and blood alcohol testing in France : pitfalls, problems and solutions. Labquality News. 1998 ; 1 : 15-16.

Alcools et glycols : points communs et particularités des différents métabolismes

Alcohols and glycols : common and specific pathways

M. LHERMITTE, N. HOUDRET*

U.F. de Toxicologie, laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpital Calmette,
CHRU de Lille - 59037 LILLE Cedex

*Auteur à qui adresser la correspondance : Docteur Nicole HOUDRET, UF de Toxicologie,
Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpital Calmette, Boulevard du Professeur Leclercq
59037 LILLE Cedex - FRANCE - Tél : 03 20 44 49 67 - Fax : 03 20 44 47 29

RÉSUMÉ

Alcools et glycols, deux importantes familles de produits à l'origine d'intoxications graves chez l'Homme, subissent un processus de biotransformation hépatique oxydatif faisant intervenir de manière prépondérante : l'alcool déshydrogénase (ADH) puis l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). Ce processus concerne l'éthanol, le méthanol, l'éthylène glycol, le propylène glycol, l'isopropanol, certains éthers de glycols et aboutit à la production des métabolites acides correspondants dont certains sont bien plus toxiques que le produit d'origine : formiate, glycolate, oxalate lors d'intoxication par le méthanol ou l'éthylène glycol par exemple. Le traitement instauré lors de telles intoxications consiste donc à éviter la formation et l'accumulation de ces métabolites acides toxiques : -i- en détournant l'action de l'ADH par administration d'éthanol pour lequel l'ADH présente une affinité supérieure à celle des autres alcools et des glycols, -ii- en bloquant la première étape de biotransformation par inhibition de l'action de l'alcool déshydrogénase par le pyrazole ou ses dérivés alkylés (4-méthylpyrazole). C'est donc la connaissance du métabolisme des différents alcools et glycols qui permet de comprendre la toxicité de ces produits et qui contribue à donner les moyens éventuels de s'opposer à cette toxicité.

MOTS-CLÉS

Alcool déshydrogénase (ADH), aldéhyde déshydrogénase (ALDH), alcools, glycols, métabolisme.

SUMMARY

Alcohols and glycols, two families of organic compounds largely distributed in world may cause human acute poisonings. The metabolism of alcohols (including ethanol, methanol, isopropanol), glycols (including ethylene glycol, propylene glycol) and some glycols derivatives, involves oxidative pathways via alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH). Acidic metabolites (formiate, glycolate, oxalate) are often more toxic than the parent compound. Blocking the production of the metabolites is required for prevention of toxicity. That is why, the treatment of poisoned patients consists partially in the inhibition of alcohol dehydrogenase action by administration of : a competitive inhibitor, ethanol, or a selective inhibitor, pyrazole or alkyl derivative of pyrazole. The understanding of the metabolism of alcohols and glycols has permitted to highlight the accumulation of toxic metabolites and to manage treatment to regulate the metabolic pathways.

KEY-WORDS

Alcohol dehydrogenase (ADH), aldehyde dehydrogenase (ALDH), alcohol pathway, glycol pathway.

Les alcools et glycols représentent sur le plan de leur définition chimique deux importantes familles de produits, qu'il s'agisse d'alcools primaires et secondaires ou des glycols et leurs dérivés : esters et éthers de glycols. Parmi ces produits, l'éthanol, constituant principal d'un grand nombre de boissons, est l'alcool dont la consommation est la plus répandue. Il est à l'origine d'intoxications aiguës (ivresse) ou chroniques (éthylisme). Toutefois, les cas d'intoxications volontaires ou accidentelles par d'autres alcools : méthanol, isopropanol ou par des glycols : éthylène glycol, propylène glycol et certains éthers et esters de glycols ne sont pas rares étant donné la distribution très large de ces produits à usage industriel ou domestique. Conséquence logique, c'est donc le métabolisme de ces molécules les plus répandues qui est le mieux documenté chez l'Homme qui permet d'expliquer leur toxicité et que nous nous attacherons à développer.

Le processus essentiel de biotransformation d'une majorité d'alcools et glycols est un **métabolisme hépatique oxydatif** qui fait appel à une ou plusieurs étapes d'oxydation catalysées de manière prépondérante par deux familles d'enzymes :

1 - L'oxydation de la fonction alcool en fonction aldéhyde fait intervenir l'alcool déshydrogénase (ADH). Ce processus est commun notamment à l'éthanol, au méthanol, à l'éthylène glycol, au propylène glycol, à l'isopropanol (figure 1) et à certains éthers de glycols.

2 - L'oxydation de la fonction aldéhyde en fonction acide fait intervenir l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). C'est le cas de l'acétaldéhyde, du formaldéhyde, du glycoaldéhyde et du lactaldéhyde (figure 1).

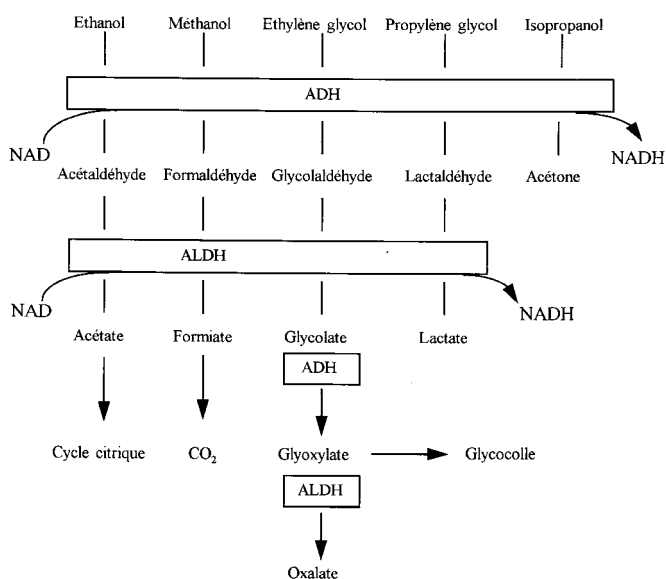


Figure 1 : Exemples de voies métaboliques hépatiques communes aux alcools et glycols.

Alcool déshydrogénase (ADH) et aldéhyde déshydrogénase (ALDH), deux familles d'enzymes clés(1,2)

L'alcool déshydrogénase (ADH) est une famille d'enzymes à zinc, NAD⁺ dépendantes, réparties en 5 classes définies par la structure primaire de l'enzyme (deux monomères et trois variétés), la mobilité électrophorétique des isoenzymes, l'affinité pour l'éthanol. Sur le plan génétique, on connaît chez l'homme 7 gènes codant pour des ADH, situation qui se complique encore par le fait qu'il existe un polymorphisme génétique au niveau des loci *ADH2* et *ADH3*. Sur le plan fonctionnel, chez l'homme, ce sont les isoenzymes de la classe I : $\beta_1\beta_1$, $\beta_2\beta_2$, localisés dans le cytosol des hépatocytes, qui ont le plus d'affinité pour l'éthanol (Tableau I), et qui sont inhibées par le pyrazole et ses dérivés alkylés (i.e. le 4-méthylpyrazole).

Tableau I : Les enzymes de la famille des ADH, et leur affinité pour l'éthanol (1).

Gène	classe	sous unité	K _M éthanol
<i>ADH 1</i>	I	$\alpha\alpha$	4,4
<i>ADH 2*1</i>		$\beta_1\beta_1$	0,019
<i>ADH 2*2</i>		$\beta_2\beta_2$	0,93
<i>ADH 2*3</i>		$\beta_3\beta_3$	36
<i>ADH 3*1</i>		$\alpha_1\alpha_1$	1,0
<i>ADH 3*2</i>		$\alpha_2\alpha_2$	0,63
<i>ADH 4</i>	II	$\pi\pi$	36
<i>ADH 5</i>	III	$\chi\chi$?
-	IV	$\mu\mu$	27

L'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) correspond à un groupe d'enzymes de détoxification, NAD⁺ dépendantes, catalysant la transformation d'un aldéhyde en l'acide correspondant, selon un processus irréversible. Ces enzymes existent sous plusieurs formes avec des localisations tissulaires et subcellulaires variées. Douze gènes des ALDH sont actuellement connus (tableau II) qui codent pour des enzymes dont les formes actives sont des homodimères ou des homotétramères. Ces enzymes présentent une spécificité de substrat large vis-à-vis de divers aldéhydes aliphatiques et aromatiques. Chez l'homme, l'existence d'isoenzymes de l'ALDH est à l'origine des variations de susceptibilités individuelles lors de l'ingestion de boissons alcoolisées, conduisant notamment à l'accumulation d'acétaldéhyde dans le sang et au syndrome de *flushing* des populations asiatiques.

Tableau II : Classification et principales caractéristiques des enzymes de la famille des ALDH (2).

Gène	Enzyme	Tissu	Substrat principal
<i>ALDH1</i>	ALDH1	foie, estomac,... (cytoplasme)	rétinal
<i>ALDH2</i>	ALDH2	foie, estomac,... (mitochondries)	acétaldéhyde
<i>ALDH3</i>	ALDH3	estomac, poumon,... (cytoplasme)	aldéhydes gras et aromatiques
<i>ALDH4</i>	ALDH4	foie, rein (mitochondries)	glutamate γ semialdéhyde
<i>ALDH5</i>	ALDH5	testicules, foie (mitochondries)	propionaldéhyde
<i>ALDH6</i>	ALDH6	glandes salivaires, estomac, foie, (cytoplasme)	aldéhydes aliphatiques rétinal
<i>ALDH7</i>	ALDH7	rein, poumon (microsomes)	aldéhydes aliphatiques, et aromatiques
<i>ALDH8</i>	ALDH8	parotide (microsomes)	?
<i>ALDH9</i>	γ ABDH	foie, rein, muscle (cytoplasme)	aldéhyde amine
<i>ALDH10</i>	F ALDH	foie, cœur, muscle (microsomes)	aldéhyde gras et aromatiques
<i>SSDH</i>	SSDH	cerveau, foie, cœur (mitochondries)	semialdéhyde succinique
<i>MM SDH</i>	MM SDH	rein, foie, cœur (mitochondries)	semialdéhyde méthylmalonique

Une conséquence de l'oxydation hépatique des alcools : la production excessive de NADH.

Les deux étapes d'oxydation hépatique des alcools et glycols sensibles à l'action des ADH et ALDH entraînent la réduction en quantité importante lorsqu'il s'agit d'une intoxication aiguë, du cofacteur NAD^+ en NADH avec surproduction du NADH dans le cytosol hépatocytaire .

Pour que le processus d'oxydation des alcools et glycols puisse se poursuivre, il faut qu'il y ait réoxydation du NADH cytosolique en NAD^+ . Ceci se réalise principalement grâce à la réduction du pyruvate en lactate catalysée par la LDH cytosolique (figure 2) entraînant une hyperproduction de lactate au détriment du pyruvate avec pour conséquence l'élévation du rapport lactate/pyruvate observé au niveau des hépatocytes eux-

mêmes ainsi que dans le sang veineux.

Dans ce processus de régénération, d'autres enzymes cytosoliques ayant pour cofacteur le NADH peuvent intervenir : l' α -glycérophosphate déshydrogénase par exemple. Toutefois le potentiel d'oxydation du NADH par les enzymes cytosoliques est insuffisant en cas d'intoxication aiguë et les processus d'oxydation de la mitochondrie sont alors sollicités. La membrane mitochondriale étant imperméable au NADH, le transport du cofacteur réduit nécessite l'intervention de la navette malate-aspartate (figure 2). L'afflux de NADH dans la mitochondrie :

-i- retentit sur l'action de la chaîne d'oxydation phosphorylante entraînant une carence relative en NAD^+ indispensable au cycle citrique et au processus de β -oxydation des acides gras,

-ii- entraîne la réduction accrue d'acétoacétate en β -hydroxybutyrate (augmentation du rapport β -hydroxybutyrate/ acétoacétate dans le foie et le sang veineux).

En conséquence, les alcools et glycols transformés dans les deux premières étapes de leur métabolisme par

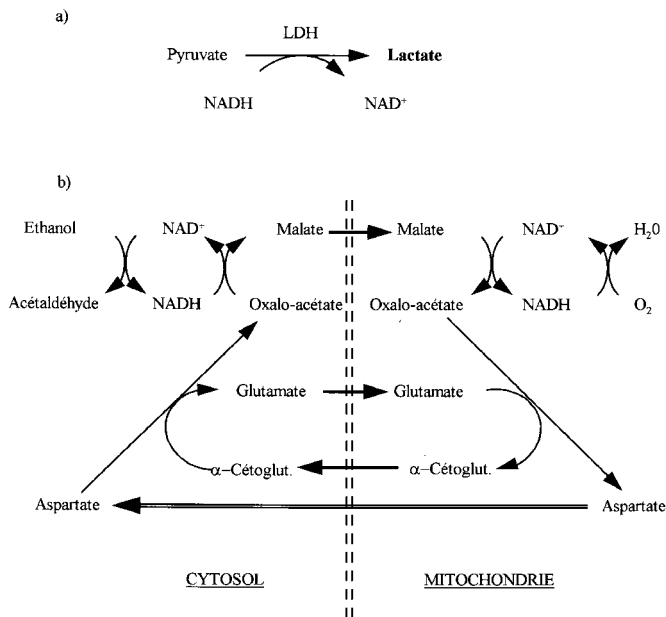


Figure 2 : Processus de réoxydation du NADH produit lors de l'oxydation d'un alcool ou un glycol (exemple de l'éthanol).

a) réoxydation cytosolique

b) réoxydation mitochondriale.

l'ADH et l'ALDH produiront les mêmes effets au niveau hépatique en terme de production de NADH et régénération de NAD et aussi d'accumulation de métabolites acides (signes d'acidose) à la toxicité reconnue pour la plupart d'entre eux.

Par contre, ce qui fait la *spécificité* de l'intoxication par un alcool ou un glycol, c'est la *toxicité liée aux métabolites* dont certains sont mesurables dans le sang et les urines.

Voies de biotransformation de quelques alcools

L'éthanol

Nous avons choisi d'évoquer ici très rapidement le métabolisme de l'éthanol et uniquement au cours de l'alcoolisme aigu, car il y a intervention de plusieurs systèmes d'oxydation. L'oxydation de l'éthanol absorbé (10 à 15% sont éliminés sans transformation au niveau pulmonaire et dans les urines) emprunte les voies de l'ADH et de l'ALDH (Figure 1). Mais d'autres voies enzymatiques annexes présentant une affinité moindre pour l'éthanol sont mises en jeu :

- un isoenzyme du système des monooxygénases à cytochrome P450 : le CYP2E1 (anciennement MEOS) qui fonctionne en présence de NADPH et présente un Km voisin de 8 à 10 mM pour l'éthanol. On sait que le

CYP2E1 présente un polymorphisme génétique, qu'il est induit par un certain nombre de substances : éthanol, isoniazide... et qu'il existe aussi d'autres formes de cytochrome P450 induites par l'alcool : CYP1A2, CYP3A4, deux fois moins actives que CYP2E1 (3).

- la catalase peroxysomale intervient selon les dispositions en H₂O₂ parvenant au peroxysome.

Ces voies annexes sont quantitativement plus importantes chez l'alcoolique. Ainsi lorsque l'éthanol sera administré comme antidote de blocage de l'ADH chez un alcoolique, il sera utilisé à un niveau d'éthanolémie plus élevé.

Le méthanol

Quel que soit le mode d'absorption (absorption digestive, pulmonaire ou cutanée) le méthanol diffuse rapidement dans l'organisme avec un volume de distribution de 0.6 l/kg de poids. Si une partie du méthanol absorbé est ensuite éliminée dans les urines sous forme inchangée (3 à 10 %) ou dans l'air expiré (10 à 30 %), le méthanol subit en large part un métabolisme oxydatif hépatique en trois étapes représentées sur la figure 3. Chez l'homme, le méthanol est d'abord transformé en formaldéhyde sous l'action de l'ADH (selon un processus plus lent que celui de l'oxydation de l'éthanol). Tous les auteurs s'accordent à dire que le formaldéhyde ne s'accumule pas car il est transformé en acide formique, *composé hautement toxique*, via l'action de l'ALDH selon Gossel et Bricker (4) ou via l'action successive d'une formaldéhyde déshydrogénase, glutathion dépendante, puis d'une thiolase selon Warnet (5). L'oxydation de l'acide formique en CO₂ se fait via un métabolisme tétrahydrofolate-dépendant (figure 3). Au plan de la régulation l'étape de détoxification du formiate en CO₂ est lente ; elle intervient après une étape de formation du formaldéhyde qui est rapide et ceci concourt à *l'accumulation du formiate* que l'on retrouve dans la circulation sanguine et dans les urines, où il est partiellement excrété. C'est la formation et l'accumulation de formiate, particulièrement diffusible, qui font la particularité et la gravité de l'intoxication par le méthanol, car, si le formaldéhyde est un inhibiteur enzymatique formant des bases de Schiff avec les groupements aminés des protéines enzymatiques, le formiate est un inhibiteur des enzymes à Fer, dont les cytochromes oxydases. Il en résulte un blocage énergétique des processus métaboliques au cours des intoxications aiguës. La diffusion de formiate au travers des vaisseaux choroïdes, l'accumulation dans le nerf optique, l'inhibition de la cytochrome oxydase expliquent la *démyélinisation* et *l'atteinte oculaire* qui en résulte.

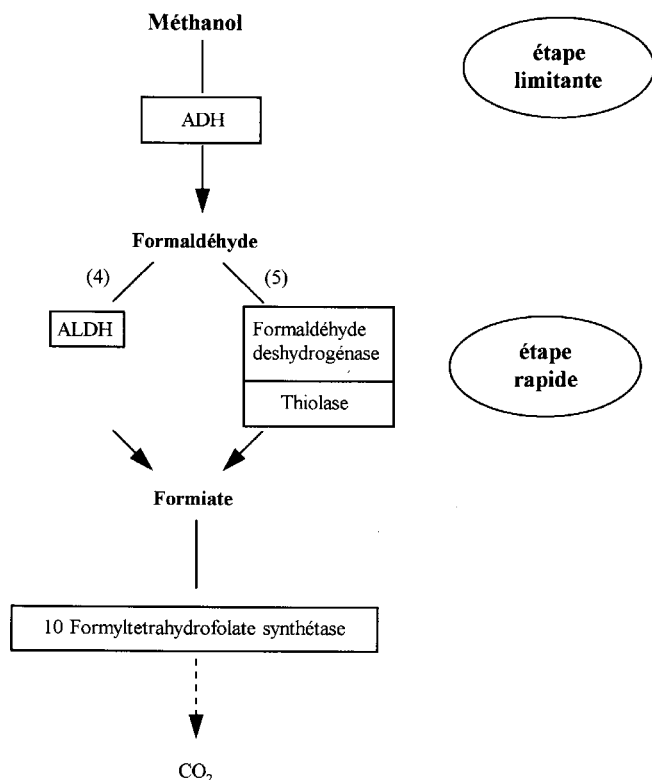


Figure 3 : Biotransformation hépatique du méthanol, proposée par GOSSEL et BRICKER (4) et par WARNET (5).

Le système catalase peut également intervenir dans l'oxydation du méthanol.

Il faut donc au plan thérapeutique éviter l'accumulation des métabolites toxiques. Deux stratégies sont possibles :

- le *blocage de l'oxydation du méthanol*, par un antidote : l'éthanol ou le 4- méthylpyrazole. L'éthanol (administré per os ou par voie intraveineuse) détourne l'action de l'ADH et de l'ALDH qui ont une affinité 9 fois plus importante pour l'éthanol que pour le méthanol. Le 4 -méthylpyrazole est un inhibiteur compétitif de l'alcool déshydrogénase.
- la *stimulation du catabolisme des formiates*, par l'administration d'acide tétrahydrofolique.

L'isopropanol

L'isopropanol ou 2-propanol est un solvant utilisé dans l'industrie et présent dans la formulation d'un certain nombre de produits cosmétiques et pharmaceutiques. Il est plus largement utilisé aux Etats-Unis qu'en France et il est à l'origine d'intoxications par inhalation ou ingestion, plus rarement par voie cutanée. Après ingestion, 80 % sont absorbés en 30 minutes et la distribution tissulaire est réalisée en 2 heures. 20 à 50 % sont éliminés sous forme inchangée dans les urines et dans

l'air expiré. 50 % subissent un métabolisme hépatique oxydatif classique via l'ADH (figure 1) avec formation d'un composé oxydé : l'**acétone**, composé volatil qui sera ensuite éliminé dans l'air expiré et dans les urines (apparition rapide : 3 heures après l'intoxication) ou sera réduit car l'ADH est capable d'agir réversiblement (un cas décrit par Jones et Andersson (6)) . La demi-vie de l'isopropanol est de 2.9 à 16,2 heures (7), celle de l'acétone de 7.6 à 26.2 heures (7). En cas d'intoxication on peut donc mesurer l'augmentation des deux composés dans le sérum. L'ingestion concomitante d'éthanol double la demi-vie apparente de l'isopropanol, mais est sans effet sur la demi-vie de l'acétone.

Voies de biotransformation de quelques glycols

L'éthylène glycol (EG)

C'est l'utilisation de l'éthylène glycol comme antigel qui est la source principale d'intoxications volontaires ou accidentelles par ce glycol. Les voies d'intoxications sont essentiellement digestives. L'absorption est suivie d'une diffusion rapide du produit dans l'organisme avec un volume de distribution de 0.7 à 0.8 l/kg. L'éthylène glycol subit à 97 % un métabolisme oxydatif hépatique des deux fonctions OH simultanément ou alternativement (figure 4). On retrouve dans les premières étapes d'oxydation, l'intervention successive de l'ADH et de l'ALDH aboutissant à la formation d'acide glyoxylique, à laquelle est associée l'hyperproduction de NADH puis de lactate, responsables de l'**acidose métabolique**. La transformation de l'acide glyoxylique suit plusieurs voies métaboliques (figure 4) :

- l'oxydation en **acide oxalique**, pour 2 à 3 % de l'éthylène glycol ingéré, qui peut précipiter sous forme de cristaux de sels de calcium se déposant dans la plupart des tissus et en particulier dans les cellules tubulaires rénales,
- la décarboxylation en formiate puis en CO₂ par analogie avec le métabolisme du méthanol,
- la transamination pyridoxine-dépendante, conduisant au glycolcolle, (à noter : la présence dans certains anti-gels d'acide benzoïque qui, associé au glycolcolle, formera l'acide hippurique),
- la condensation en oxalomalate, α -hydroxyglutarate et β -cétoglutarate qui bloquent le cycle citrique et contribuent à l'augmentation de lactate,
- la formation d'acides α -hydroxy- β -cétoadipique qui participe aussi au blocage du cycle citrique et à l'augmentation de lactate.

Les produits d'élimination urinaires, sont essentielle-

ment : l'éthylène glycol pendant quelques heures, l'acide glycolique sous forme de sels (30 à 44%) et plus tardivement l'acide oxalique.

En dehors de la toxicité propre de l'éthylène glycol (excitation puis dépression du système nerveux central), ce sont **les métabolites qui font la toxicité spécifique d'une intoxication par EG** : les acides contribuent à l'acidose métabolique, essentiellement l'acide glycolique, les aldéhydes inhibent la phosphorylation oxydative, la synthèse des protéines, la replication de l'ADN et l'ARN ribosomal, bloquent l'action des enzymes à fonction thiol.

Les traitements proposés dans les intoxications aiguës à l'EG consistent surtout à bloquer la première étape d'oxydation par l'ADH, par administration d'éthanol (10) ou de 4-méthylpyrazole (11,12).

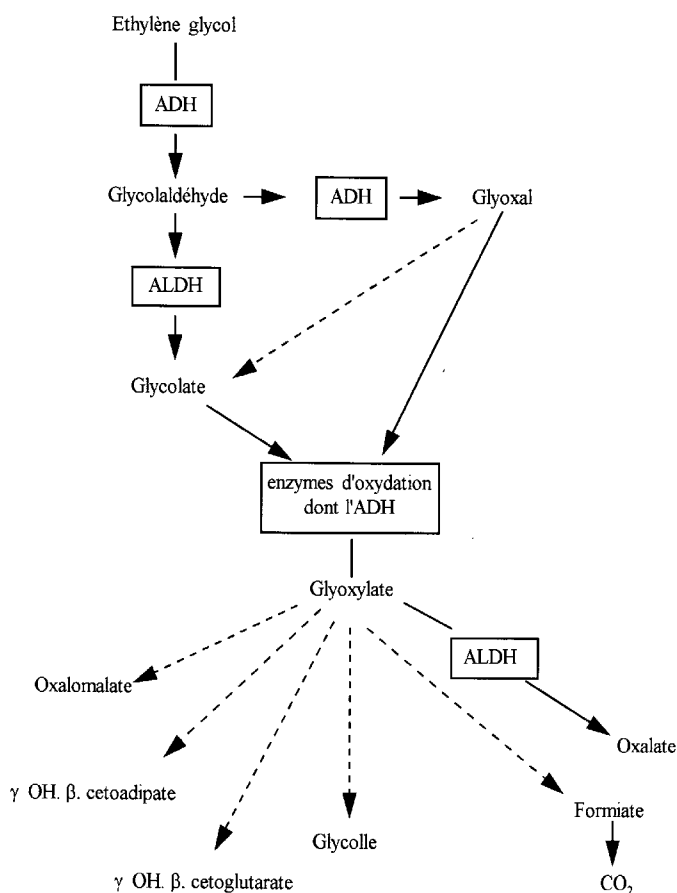


Figure 4 : Les voies de transformation de l'éthylène glycol d'après WINE (8) et WARNET (9).

Le propylène glycol

Le propylène glycol ou 1,2-propanediol est utilisé dans un grand nombre de préparations pharmaceutiques injectables, d'onguents et de cosmétiques. Considéré comme un produit peu toxique, il peut néanmoins être la cause d'intoxication grave chez l'enfant (13) et chez l'adulte (14). Sa biotransformation hépatique suit le classique processus d'oxydation en deux étapes : i- oxydation en lactaldéhyde ii- oxydation en lactate par l'ALDH (figure 1), puis oxydation en pyruvate conduisant à une acidose métabolique sévère.

Le diéthylène glycol : un mécanisme de biotransformation mal documenté

Le diéthylène glycol est un produit de condensation de l'éthylène glycol : sur le plan structural, il correspond à 2 molécules d'éthylène glycol reliées par une liaison éther. Il est logique d'imaginer chez l'homme une biotransformation faisant appel à un processus d'oxydation hépatique via l'ADH et l'ALDH, comme cela a pu être démontré chez le rat par la présence de l'acide 2-hydroxyéthoxy acétique (15) ou à une rupture de la liaison éther suivi du processus de biotransformation de l'éthylène glycol (16).

Peu d'études ont été réalisées chez l'homme : quatre ans après l'hypothèse émise par Spyker et Sullivan (16), à l'occasion d'intoxications par le diéthylène glycol dans une population d'enfants haïtiens en 1996 (30 cas mortels selon Scalzo (17)) en 1996, beaucoup plus selon Wolf (18), il n'a pu être prouvé qu'il existe bien une voie métabolique impliquant l'ADH et l'ALDH (absence des métabolites urinaires qui en résulteraient). Par ailleurs, l'efficacité de l'éthanol ou du 4-méthylpyrazole dans le traitement des intoxications n'a pas été prouvée par ces auteurs, alors que Borron *et al* en 1997 (19) signalent l'efficacité du 4-méthylpyrazole dans un cas d'intoxication associant le diéthylène et le triéthylène glycol.

Voies de biotransformation des autres dérivés de l'éthylène glycol et du propylène glycol : hypothèses et certitudes

En termes de nomenclature ces dérivés sont classés en éthers de glycol de la série E (dérivés de l'éthylène glycol), éthers de glycol de la série P (dérivés du propylène glycol) et en éthers-esters correspondants (le plus

souvent des acétates). Ils ont comme propriété essentielle d'être des "solvants à l'eau" très largement utilisés en milieu industriel et ils sont à l'origine d'intoxications professionnelles par inhalation ou par voie cutanée sensibles, pour certains d'entre eux, à un traitement par l'éthanol (20) ou par le 4-méthyl pyrazole (21).

Sur le plan métabolique, les esters (acétates) sont transformés en éthers via l'action d'estérases présentes dans le sang et la muqueuse nasale et sont ensuite transformés dans le foie, comme les éthers (figure 5). Les éthers de la série E sont métabolisés selon les deux étapes classiques d'oxydation, l'ADH conduisant à la formation de dérivés *alkoxy-acétaldéhyde* et l'ALDH à la formation de dérivés *alkoxy-acétate* (22), composés *hautement toxiques*. Les éthers de la série P, avec fonction alcool secondaire sont transformés via une O-déalkylase en propylène glycol (23), lui-même transformé en composés peu toxiques.

D'autres voies mineures ont été décrites : pour les éthers de la série E, une voie conduisant à la formation d'éthylène glycol (24,25), pour les éthers de la série P avec fonction alcool primaire, une voie d'oxydation conduisant à la formation de dérivés propionates (26).

Toutefois, le métabolisme de tous les dérivés des séries E et P est loin d'avoir été parfaitement établi chez l'homme, et les schémas généraux de biotransformation évoqués sur la figure 5 sont à confirmer pour chaque dérivé, par la caractérisation des métabolites urinaires lors d'intoxications reconnues.

Conclusion

Il est parfaitement démontré qu'un grand nombre d'alcools et glycols sont transformés selon un métabolisme enzymatique oxydatif au niveau hépatique, conduisant dans la majorité des cas d'intoxications à des signes cliniques communs sur le plan neurologique et digestif et à des signes biologiques tels que l'acidose métabolique. Par contre, les signes spécifiques sont la conséquence, soit de la toxicité directe de la molécule mère, soit de la toxicité des métabolites bien souvent supérieure à celle de la molécule mère et dont l'intérêt de la mesure est réel pour les plus toxiques d'entre eux, bien que souvent sous-estimés dans l'établissement d'un diagnostic d'intoxication et de sa gravité.

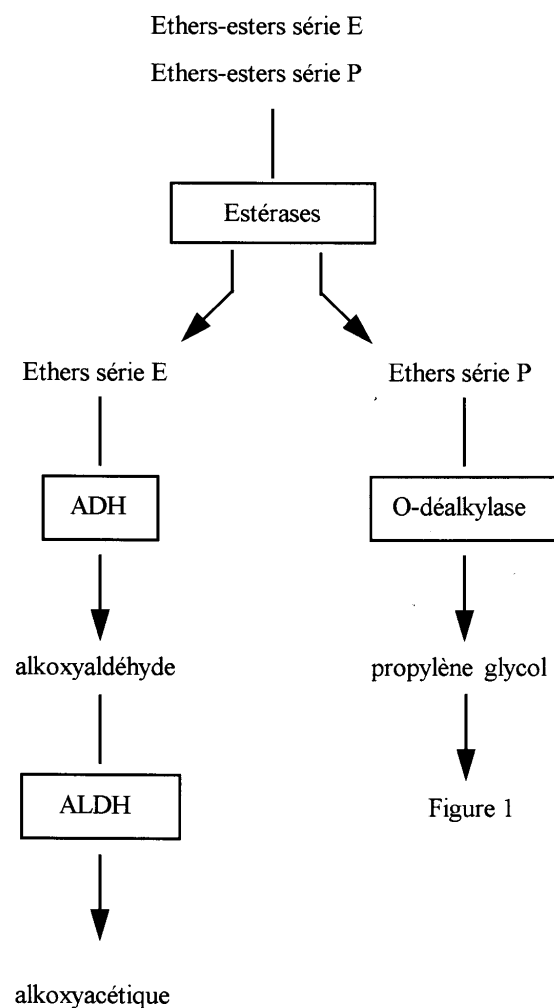


Figure 5 : Biotransformation des éthers et des éthers de glycol.

Références

1. Yin S.J., Han C-L., Lee A.I., Wu C.W. Human alcohol dehydrogenase family. Functional classification, ethanol/retinol metabolism, and medical implications. *Enzymol Molecular Biol. Carboxyl Metabolism 7* WEINER et al, eds, Academic/Plenum Publishers, New York, 1999.
2. Yoshida A., Rzhetsky A., Hsu L.C., Chang C. Aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur. J. Biochem.*, 1998, 251, 549-557.
3. Lieber C.S. Microsomal Ethanol-Oxidizing System (MEOS) : the first 30 years (1968-1998). A review. *Alcohol Clin Exp Res*, 1999, 23, 991-1007.
4. Gossel T.A., Bricker J.D. Alcohols, glycols and aldehydes. In : *Principles of Clinical Toxicology*, 3rd edition, Raven Press New York, 1999 ; 82-84.
5. Warnet J.M. Toxicologie de l'alcool méthylique. In : *Toxicologie*, tome 1, 2^{ème} édition, Moniteur de l'internat, 1999 ; 163-173.
6. Jones A.W., Andersson L. Biotransformation of acetone to isopropanol observed in a motorist involved in a sobriety check. *J. Forensic. Sci.*, 1995, 40, 686-687.
7. Pappas A., Ackerman B.H., Olsen K.M., Taylor E.H. Isopropanol ingestion : a report of six episodes with isopropanol and acetone serum concentration time data. *Clin. Toxicol.*, 1991 ; 29, 11-21.
8. Wine H. Ethylene glycol intoxication. *Semin. dialysis*, 1994, 7, 338-345.
9. Warnet J.M. Toxicologie de l'éthylène glycol. In : *Toxicologie*, tome 1, 2^{ème} édition, Moniteur de l'internat, 1999 ; 175-185.
10. Kowalczyk M., Halvorsen S., Overbo S., Bredesen J.E., Jacobsen D. Ethanol treatment in ethylene glycol poisoned patients. *Vet. Hum. Toxicol.*, 1998, 40, 225-228.
11. Harry P., Turcant A., Bouachour G., House P., Alquier P., Allain P. Efficacy of 4-methylpyrazole in ethylene glycol poisoning : clinical and toxicokinetics aspects. *Hum. Exp. Toxicol.*, 1994, 13, 61-64.
12. Wiley J.F. Novel therapies for ethyleneglycol intoxication. *Curr. Opin. Pediatr.*, 1999, 11, 269-273.
13. Glover M.L., Reed M.D. Propylene glycol : the safe diluent that continues to cause harm. *Pharmacotherapy*, 1996, 16, 690-3.
14. Lolin Y., Francis D.A., Flanagan R.J., Little P., Lascelles P.T. Cerebral depression due to propylene glycol in a patient with chronic epilepsy. The value of the plasma osmolal gap in diagnosis. *Postgrad. Med.J.*, 1988, 64, 610-613.
15. Wiener H.L., Richarson K.E. Metabolism of diethylene glycol in male rats. *Biochem. Pharmacol.*, 1989, 38, 539-541.
16. Spyker D.A. Sullivan J.B. Oxygenated compounds : alcohols, glycols, ketones and esters. In : *Hazardous Materials Toxicology*, Sullivan J.B., Krieger G.R., eds, Baltimore. 1992, 1108, 1111, 1113.
17. Scalzo A.J. Diethylene glycol toxicity revisited : the 1996 Haitian Epidemic. *Clin. Toxicol.*, 1996, 34, 513-516.
18. Wolf A.D. The haitian diethylene glycol poisoning tragedy. A dark wood revisited. *JAMA*, 1998, 279, 1215-1215.
19. Borron S.W., Baud F.J., Garnier R. Intravenous 4-methylpyrazole as an antidote for diethylene glycol and triethylene glycol. *Vet. Hum. Toxicol.*, 1997, 39, 26-28.
20. Nitter Hauge S. Poisoning with ethylene glycol monomethylether. *Acta Med.Scand.*, 1970, 188, 277-280.
21. Buckley N., Whyte I.M., Dawson A.H. Letters to the Editor : EGBE. *Clin. Toxicol.*, 1993, 31, 499-500.
22. Dean B.S., Krenzelok E.P. Clinical evaluation of pediatric ethylene glycol monobutyl ether poisonings. *Clin. Toxicol.*, 1992, 30, 557-563.
23. Cicoella A. Evaluation des risques pour la reproduction liés aux éthers de glycols. *Santé Publique*, 1997, 2, 157-183.
24. Browning R.G., Curry S.C. Clinical toxicology of ethylene glycol monoalkyls ethers. *Human and Exp. Toxicol.*, 1994, 13, 325-335.
25. Rambourg-Schepens M.O., Buffet M., Bertault R., Jaussaud M., Journe B., Gillet B., Fay R., Lamiable D. Aspects métaboliques de l'intoxication aiguë par ingestion de butylglycol. *Arch. mal. prof.*, 1987, 48, 121-122.
26. Johanson G. An overview of glycol ethers metabolism and toxicokinetics. *Occup. Hyg.*, 1996, 2, 5-24.

Classification, usages et épidémiologie des intoxications par les mono et dialcools

Classification, uses and epidemiology of mono and dialcohol poisonings

J. ARDITTI*⁽¹⁾, L. DE HARO⁽²⁾, J.H. BOURDON⁽¹⁾, A. BRUN⁽²⁾,
B. POUSSINEAU⁽¹⁾, J.M. DAVID⁽²⁾

(1) Laboratoire de Toxicologie et de Pharmacodépendance

(2) Information téléphonique, Centre Antipoison, Hôpital Salvator, 249, Bd Sainte Marguerite - 13009 MARSEILLE

*Auteur à qui adresser la correspondance : J. ARDITTI, Laboratoire de Toxicologie et de Pharmacodépendance, Centre Antipoison, Hôpital Salvator, 249, Bd Sainte Marguerite - 13009 MARSEILLE

RÉSUMÉ

La classification, les usages et l'épidémiologie des intoxications par les mono et dialcools représentent un vaste sujet, les alcools étant définis comme des substances organiques résultant du remplacement par le groupement OH d'un ou plusieurs atomes d'hydrogène d'un hydrocarbure. Ne pouvant aborder ce sujet dans son intégralité, nous en précisons les limites.

La classification reprenant la totalité des monoalcools et dialcools aliphatiques est présentée sous forme de tableaux.

Les usages et l'épidémiologie ne concernent que les monoalcools et les alcools aliphatiques les plus fréquemment rencontrés lors d'intoxications volontaires ou accidentelles chez l'homme : méthanol, alcool isopropylique, éthylène glycol, diéthylène glycol, polyéthylène glycol, propylène glycol.

Après un rappel des définitions des monoalcools et dialcools, les auteurs présentent l'épidémiologie des substances citées précédemment en utilisant les données historiques, les données du centre anti-poisons de Marseille et les données du rapport de l'année 1997 de l'association américaine des centres anti-poisons.

L'étude épidémiologique des intoxications par les mono et dialcools aliphatiques permet de préciser que ces intoxications ne représentent qu'un faible pourcentage des intoxications collectées par les centres anti-poisons français. Cependant leur gravité est à souligner puisque la mortalité de ces intoxications est bien supérieure au pourcentage de la mortalité toxique globale. La sévérité des intoxications est en relation directe avec les circonstances d'intoxication qui sont essentiellement chez l'adulte des tentatives de suicide, des déviations d'utilisation, des usages festifs, et chez l'enfant uniquement des erreurs thérapeutiques.

MOTS-CLÉS

Monoalcools, dialcools, méthanol, alcool isopropylique, éthylène glycol, diéthylène glycol, polyéthylène glycol, propylène glycol, épidémiologie.

SUMMARY

Classification, uses and epidemiology of mono and dialcohol represent a huge subject, as the definition of alcohols is organic molecules obtained by putting an OH group in place of one or several hydrogen atoms of hydrocarbons. As it is impossible to describe the whole subject, the authors will precise the limits of their approach. Classification of all the aliphatic monoalcohols and dialcohols are presented in tables. Uses and epidemiology are described for the most frequent aliphatic mono and dialcohols encountered during accidental or intentional human poisonings : methanol, isopropyl alcohol, ethylene glycol, diethylene glycol, polyethylene glycol, propylene glycol. After giving global definitions about monoalcohols and dialcohols, the authors precise for each molecule the epidemiology of intoxications using historical data, Marseilles poison centre experience and the 1997 report of the American Poison Centres Association. This study permits to precise two aspects of aliphatic mono and dialcohols poisonings : first, such intoxications are not frequent as poison centres collect few cases each year ; but second, the severity of those cases is important because the mortality is higher than the global toxic mortality. The severity of those poisonings is a consequence of the absorption circumstances : for adults, suicide attempts or feast uses, and for children, therapeutic mistakes.

KEY-WORDS

Monoalcohols, dialcohols, methanol, isopropyl alcohol, ethylene glycol, diethylene glycol, polyethylene glycol, propylene glycol, epidemiology.

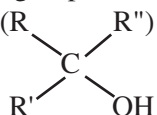
Introduction

Rédiger un article sur un sujet aussi vaste que la classification, les usages et l'épidémiologie des intoxications par les mono et dialcools nous a amené d'emblée à en préciser les limites.

Les usages et l'épidémiologie ne concernent que les monoalcools et les dialcools aliphatiques les plus fréquemment rencontrés lors d'intoxications volontaires ou accidentelles chez l'homme : méthanol, alcool isopropylique, éthylène glycol, diéthylène glycol, polyéthylène glycol, propylène glycol ; leur usage est présenté en annexe. La classification et les usages sont présentés par commodité sous forme de tableaux.

Les alcools sont des substances organiques résultant du remplacement par le groupement OH d'un ou plusieurs atomes d'hydrogène d'un hydrocarbure.

Ils sont classés en alcool primaire à groupement monovalent (R-CH₂OH), en alcool secondaire à groupement bivalent (R-CHOH-R'), en alcool tertiaire (R



Les monoalcools aliphatiques sont répartis en 3 familles, les Alcanols, les Alcénols, les Alcynols. Pour ces deux dernières familles, l'isomérisie de position entraîne de nombreuses possibilités de configuration chimique.

Les dialcools aliphatiques sont répartis en 3 familles principales : les ethanediols, les propanediols, les butanediols.

Épidémiologie

Le méthanol

Mis en évidence par Bayle en 1661 dans le produit de distillation sèche du bois, le méthanol a été synthétisé par Berthelot en 1856 par saponification du chlorure de méthyle. C'est cette même année que Mac Farlan rapporte la toxicité oculaire des vapeurs de méthanol chez des ébénistes l'utilisant comme solvant (1). En 1928 Jelliffe décrit les signes neurologiques de l'intoxication par le méthanol (2).

En fait le méthanol reste surtout célèbre par les épidémies historiques d'intoxication lors de son utilisation comme alcool frelaté : de 1911, où en Allemagne sont rapportés 111 cas d'intoxication par absorption d'alcool frelaté, à l'épidémie de pastis frelaté dans le Sud de la France en 1981, de nombreux cas d'intoxication ont été signalés entre ces deux périodes.

Hambourg en 1920, Buffalo en 1926, New York en 1928, Atlanta en 1953, Kentucky en 1958, Nouvelle

Guinée 1979, Michigan 1981, en soulignant la grande époque de "la prohibition" aux USA et au Canada où, de 1940 à 1948, l'alcool de contrebande était de l'alcool frelaté responsable d'intoxications sévères souvent mortelles.

Récemment, en Russie, il a été noté des décès dus à l'ingestion de Vodka frelatée, et au Cameroun des intoxications mortelles dues à la consommation d'Odontol ou d'Africagin, boissons obtenues par distillation du vin de palme sans séparation des deux alcools éthylique et méthylique.

Sur la période de 1980 à 1998, les centres anti-poisons français ont collecté 9461 cas d'intoxication par le méthanol et l'alcool à brûler dont 1975 cas au Centre Antipoison de Marseille.

Ces données confirment que l'intoxication par le méthanol est rare puisqu'elle ne représente que 0.5 % des intoxications. Dans notre série, les circonstances d'intoxications sont le plus souvent accidentelles (90 %). La symptomatologie est présente dans 8 % des cas. 26 % des patients ont été hospitalisés dont 4 % en réanimation.

L'évolution des intoxications a été majoritairement favorable, on note cependant 8 cas de séquelles neurologiques ou oculaires et un décès.

Le rapport de l'année 1997 de l'Association américaine des centres anti-poisons fait état de 2 580 intoxications dont 14 mortelles (3).

L'alcool isopropylique (Isopropanol)

En France cette intoxication est rare.

Au centre anti-poison de Marseille 1 cas d'intoxication a été signalé en 1997 chez un enfant de 2 mois pesant 2 kgs hospitalisé dans un service de néonatalogie. Des lingettes contenant de l'isopropanol (60 %) avaient été mises à la disposition du personnel soignant, lors d'une coupure d'eau. Lors de la toilette de l'enfant, la mère les utilise, les confondant avec les lingettes pour bébé. L'enfant a présenté des brûlures du 2^{ème} degré sur les zones de contact avec le produit, qui se sont étendues sur 60 % du corps, évoluant vers un syndrome de Lyell avec décès au 11^{ème} jour.

Cependant en Amérique du Nord, de nombreux cas d'intoxication ont été rapportés. Les circonstances les plus fréquentes sont les tentatives de suicide et les usages festifs de "rubbing alcohol" ou de "blue heaven".

Chez l'enfant des brûlures cutanées ont été décrites après application de pommade à base d'alcool isopropylique (4) (5).

Le rapport de 1997 de l'association des centres anti-poisons américains fait état de 29 226 intoxications

dont 4 mortelles.

L'éthylène glycol

Composant essentiel des antigels et des liquides de refroidissement, l'éthylène glycol est le glycol le plus souvent en cause dans les intoxications.

C'est en 1930 qu'un médecin de Nebraska rapporte les deux premiers cas mortels d'ingestions accidentelles chez deux jeunes gens.

De nombreux cas d'intoxications sont publiés dans la littérature après ingestion d'antigel ou de liquides de refroidissement. Il s'agit le plus souvent d'intoxications accidentelles, le produit étant souvent conditionné dans des bouteilles plastiques analogues aux bouteilles à usage alimentaire, sa saveur douceâtre favorise l'ingestion de doses importantes (6). La contamination de l'eau potable par les circuits de chauffage (7) ou la contamination de vins (autrichiens) par l'éthylène glycol sont des circonstances d'intoxication plus rarement rencontrées (8).

Les données des Centres Anti-poisons Français de 1980 à 1998 permettent de répertorier 2571 intoxications dont 537 au Centre Antipoison de Marseille soit 0.1 % des intoxications collectées durant cette même période.

Dans cette série, les intoxications sont principalement accidentelles (90 %), on note quelques tentatives de suicide (3 %) et des intoxications en milieu professionnel (7 %).

La symptomatologie est présente dans 43 % des cas nécessitant une hospitalisation dans les services de réanimation et de néphrologie.

Malgré les techniques de réanimation, d'épuration extra rénale et la mise en place d'un traitement antidotique, 13 décès ont été répertoriés dans cette série soit 2.4 % des cas.

Le rapport de l'année 1997, de l'association américaine des centres anti-poisons fait état de 6 174 intoxications dont 22 mortelles (3).

Le diéthylène glycol

Les observations d'intoxication par le diéthylène glycol publiées dans la littérature démontrent la toxicité de ce glycol.

En 1937, 105 personnes dont 34 enfants décèdent dans une période de 2 mois, à la suite de l'ingestion d'un sulfamide dont l'excipient était le diéthylène glycol. Cette épidémie d'intoxications a été appelée le "désastre de l'élixir Massengill" (9) et a entraîné la publication de la Federal Food, Drug and Cosmetic Act, qui modifiait la réglementation.

Plusieurs intoxications collectives ont été depuis rapportées. En 1969, en Afrique du Sud, 7 enfants décèdent à la suite d'un traitement par deux sédatifs le PRO-NAP® et le PLAXIN®, l'excipient, le propylène gly-

col, ayant été remplacé par du diéthylène glycol (10).

En 1979, 4 cas d'intoxications dans le Sahara sont rapportés après utilisation, pour stockage de l'eau de boisson, de containers ayant contenu du diéthylène glycol (11).

En Espagne, en 1987, le diéthylène glycol était présent dans la formule d'une pommade à base de sulfadiazine et qui, utilisée chez les grands brûlés, a été responsable de 5 décès (12).

Au Nigéria en 1990, le décès de 40 enfants âgés de 6 à 23 mois est secondaire à l'utilisation d'un sirop de paracétamol où le propylène glycol a été remplacé par le diéthylène glycol.

Aucun cas n'a été collecté au centre anti-poisons de Marseille.

Dans le rapport de l'année 1997 de l'Association américaine des centres anti-poisons, tous les glycols autres que l'éthylène glycol sont regroupés sans distinction ce qui rend impossible des statistiques par produit.

Les polyéthylènes glycols

Plus connus sous le nom de PEG, ils sont responsables d'intoxication quand le degré de polymérisation est faible. Ils ont été responsables d'intoxications humaines : en 1982 Bruns rapporte 3 décès chez des grands brûlés après application d'une pommade antiseptique qui contenait 99 % de PEG 300 (13).

Les PEG très polymérisés utilisés dans les préparations coliques ne sont pas absorbables.

Aucune intoxication n'a été répertoriée dans les centres anti-poisons français, cependant des intoxications sévères ont été signalées dans ces centres après utilisation de PEG 400 à la place de PEG 4000 par erreur de préparation.

Le propylène glycol

Classiquement considéré comme un glycol à faible toxicité, le propylène glycol, du fait de ses propriétés de solvants et de conservateur, est présent dans de nombreuses spécialités pharmaceutiques. Ainsi les observations publiées concernent essentiellement l'enfant et sont toujours d'origine médicamenteuse : préparation polyvitaminée mise dans l'alimentation parentérale d'un prématuré de 900 g, ingestion prolongée de vitamine D chez un enfant de 11 ans qui a présenté des crises convulsives, hypoglycémie chez un enfant de 15 mois qui a reçu 7.5 ml/jour (6).

Dans ces deux derniers cas le propylène glycol faisaient partie des excipients.

La toxicité iatrogène de ce glycol est certainement sous estimée, une étude reprenant les données de la littérature de 1970 à 1995 rapporte 17 cas d'intoxications, le propylène glycol faisant partie de la formulation d'une spécialité pharmaceutique prise par voie orale, injectable ou externe (14). Cependant, les centres anti-poisons français dans une étude de 1994 portant sur les données statistiques de 6 centres rapportent 28 cas d'in-

toxication en 3 ans (14)

Conclusion

L'étude épidémiologique des intoxications par les mono et dialcools aliphatiques permet de préciser que les intoxications ne représentent qu'un faible pourcentage des intoxications collectées par les centres anti-poisons français. Cependant leur gravité est à souligner puisque la mortalité de ces intoxications est bien supérieure au pourcentage de la mortalité toxique globale.

La sévérité des intoxications est en relation directe avec les circonstances d'intoxication qui sont alors essentiellement chez l'adulte des tentatives de suicide, des déviations d'utilisation, des usages festifs, et chez

Références

1. Mc Farlan. JF. The methylate spirit and some of its preparations. Pharm J transact 1855 ; 15 : 310-15
2. Jelliffe SE. Multiple neuritis in wood alcohol poisoning. Med News 1905 ; 86 : 387-90
3. Litovitz TL, Klein-Schwartz W. 1997 Annual report of the American Association of Poison Control Centers. Am. J Emerg Med 1998 ; 16 : 443-444
4. Schick JB, Milstein JM. Burn hazard of isopropyl alcohol in the neonate. Pediatrics 1981 ; 68 : 587-8
5. Weintraub Z, Iancu TC. Isopropyl alcohol burns. Pediatrics 1982 ; 69 : 506
6. Cottin C, David JM, Jouglard J. Circonstances d'intoxications par les antigels et les liquides de refroidissement. J.T.C.E 1989 ; 9,8 : 617-19
7. Zech P. Oxalose rénale au cours d'une tubulopathie aiguë anurique par intoxication accidentelle méconnue à l'éthylène glycol. Nouv. Presse Med 1974 ; 3 : 1009-12
8. Anonyme. Some Wine to break the ice. Lancet 1985 ; 254
9. Wax PM. Elixirs, diluents and the passage of the 1938 Federal Food, Drug and Cosmetic Act. Ann. Intern Med 1995 ; 122 : 456-61
10. Bowie M, Mc Kenzie D. Diéthylène glycol poisoning in children. S. Afr. Med. J 1972 ; 931-34
11. Litique P. A propos de 4 cas d'intoxications au diéthylèneglycol. Med. et Armées 1979 ; 7 : 629-34
12. Cantarell M.G, Fort J, Camps J, Sans M. Acute intoxication due to topical application of diethylene glycol. Ann. Intern. Med 1987 ; 106 : 478-9
13. Bruns D.E, Herold D.A, Rodeheauer GT, Edlich R.F. Polyethylene glycol intoxication in burnt patients. Burns 1982 ; 9748-52
14. Malandin H, Cano Y. Une méthode enzymatique de dosage du propylène glycol. Congrès SFTA 27-29 juin 1996 ; Poitiers

**Tableau I : LES MONOALCOOLS
ALCANOLS**

Méthanol	CH ₃ -OH	
Ethanol	CH ₃ -CH ₂ -OH	
Propanol	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -OH	Propane-1-ol
	CH ₃ -CH-OH-CH ₃	Propane-2-ol
Butanol	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH	Butane-1-ol
Pentanol	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH	Pentane-1-ol
	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CHOH-CH ₃	Pentane-2-ol
	CH ₃ -CH ₂ -CHOH-CH ₂ -CH ₃	Pentane-3-ol
Hexanol	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH	Hexane-1-ol
	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CHOH-CH ₃	Hexane-2-ol
	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CHOH-CH ₂ -CH ₃	Hexane-3-ol
Heptanol	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH	Heptane-1-ol
	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CHOH-CH ₃	Heptane-2-ol
	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CHOH-CH ₂ -CH ₃	Heptane-3-ol
	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CHOH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	Heptane-4-ol

ALCENOLS

Propéno	CH ₂ =CH-CH ₂ -OH	Prop-2-ène-1-ol
Buténo	CH ₂ =CH-CH ₂ -CH ₂ -OH	But-3-ène-1ol
	CH ₂ =CH-CHOH-CH ₃	But-3-ène-2 ol
	CH ₃ -CH=HC-CH ₂ -OH	But-2-ène-1ol
Penténo	CH ₂ =CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH	Pent-4-ène-1 ol
	CH ₂ =CH-CH ₂ -CHOH-CH ₃	Pent-4-ène-2 ol
	CH ₂ =CH-CHOH-CH ₂ -CH ₃	Pent-4-ène-3 ol
	CH ₃ -CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -OH	Pent-3-ène-1 ol
	CH ₃ -CH=CH-CHOH-CH ₃	Pent-3-ène-2 ol
Hexéno	CH ₂ =CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH	Hex-5ène-1 ol
	CH ₂ =CH-CH ₂ -CH ₂ -CHOH-CH ₃	Hex-5ène-2 ol
	CH ₂ =CH-CH ₂ -CHOH-CH ₂ -CH ₃	Hex-5ène-3 ol
	CH ₂ =CH-CHOH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	Hex-5ène-4 ol
	CH ₃ -CH=CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH	Hex-4ène-1 ol
	Etc...	

ALCYNOLS

Propynol	HC≡C-CH ₂ -OH	Prop-2-yne-1 ol
Butynol	HC≡C-CH ₂ -CH ₂ -OH	But-3yne-1 ol
	HC≡C-CHOH-CH ₃	But-3yne-2 ol
	H ₃ C-C≡C-CH ₂ -OH	But-2yne-1 ol
Pentynol	HC≡C-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH	Pent-4yne-1 ol
	HC≡C-CH ₂ -CHOH-CH ₃	Pent-4yne-2 ol
	HC≡C-CHOH-CH ₂ -CH ₃	Pent-4yne-3 ol
	H ₃ C-C≡C-CH ₂ -CH ₂ -OH	Pent-3yne-1 ol
	H ₃ C-C≡C-CHOH-CH ₃	Pent-3yne-2 ol
	H ₃ C-CH ₂ -C≡C-CH ₂ -OH	Pent-2yne-1 ol

**Tableau II : LES DIALCOOLS
ETHANEDIOLS**

Ethylène glycol 1,2 - ethanediol	OH-CH ₂ -CH ₂ -OH
Diéthylène glycol	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{OH} \\ \diagup \\ \text{O} \\ \diagdown \\ \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{OH} \end{array}$
Triéthylène glycol	H(O-CH ₂ -CH ₂) ₃ OH
Tétraéthylène glycol	H(O-CH ₂ -CH ₂) ₄ OH

BUTANEDIOLS

1,2 butanediol	CH ₃ -CH ₂ -CHOH-CH ₂ OH
1,3 butanediol	CH ₃ -CHOH-CH ₂ -CH ₂ OH
1,4 butanediol	CH ₂ OH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ OH
2,3 butanediol	CH ₃ -CHOH-CHOH-CH ₃
Polybutylène glycol	H(CH-CH-CHOH-CH ₂) _n OH

Tableau III : USAGE DES MONOALCOOLS

<p>Méthanol</p> <p>* usage domestique composant de l'alcool à brûler</p> <p>* usage pharmaceutique composant du "méthylène Régie" ou alcool dénaturé</p> <p>* usage industriel solvant d'extraction des huiles végétales ou animales, diluant des peintures, vernis, teintures, colorants pour émaux, carburant dans les machines à combustion interne.</p> <p>Alcool isopropylique</p> <p>* usage industriel synthèse de l'acétone et de dérivés isopropyliques solvant des peintures, vernis, encres, solvant d'extraction des cires, parfums.</p> <p>* usage domestique agent de nettoyage (lave vitres) et de dégraissage</p> <p>* usage pharmaceutique agent révulsif externe "rubbing alcohol" aux U.S.A (70 % d'alcool isopropylique)</p> <p>* usage abusif "blue heaven"</p>

PROPANEDIOLS

Propylène glycol	CH ₂ -CHOH-CH ₂ OH
Dipropylène glycol	O(CH ₂ -CHOH-CH ₂) ₂
Tripropylène diol	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}(\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_2)_3 \text{OH} \end{array}$
Triméthylène glycol 1.3 propanediol	CH ₂ -OH-CH ₂ -CH ₂ OH
Polypropylène glycol	H(O-CH ₂ -CHOH-CH ₂) ₂ OH

Tableau IV : USAGE DES DIALCOOLS

<p>Ethylène glycol</p> <p>* usage domestique Antigel (1/4 de la production) Liquide de refroidissement Assouplissant Produit de nettoyage Solvants de pesticides</p> <p>* usage pharmaceutique Topiques pour application cutanée (concentration < 5 %)</p> <p>Diéthylène glycol</p> <p>* usage domestique Antigel Assouplissant textile</p> <p>* usage industriel Lubrifiant, liquide de frein</p> <p>Propylène glycol</p> <p>* usage domestique Antigel</p> <p>* usage industriel Échangeur thermique Fluide hydraulique Solvant dans l'industrie pharmaceutique, alimentation, cosmétologie Conservateur de vitamines Humidifiant textile Assainisseur d'atmosphère</p> <p>Polyéthylène glycol</p> <p>* usage cosmétologique 200 à 600 = liquide visqueux 1 000 à 2 000 = liquide pâteux</p> <p>* usage pharmaceutique > 2 000 : préparation laxative du colon</p>
--

RÉPONSES aux CAS CLINIQUES

(présentés pages 21 à 23)

H. MALANDAIN, Y. CANO

Cas n°1

Dans l'ignorance initiale du type de produit "sniffé", la tendance à l'acidose métabolique peut faire craindre une participation du méthanol (qui est aisément absorbé par voie pulmonaire) : une éthanolisation préventive est donc décidée (le sujet n'étant pas protégé par sa propre éthanolémie). De fait, l'adolescent "sniffait" un nettoyeur de carburateur (43 % de toluène, 22 % de méthanol, 20 % de chlorure de méthylène, ..) pour l'effet euphorisant du toluène...et bien qu'un copain en soit décédé quelques semaines avant !

Les cristaux sont en faveur du toluène (toluène -> ac. benzoïque -> ac. hippurique) ; du fait de l'inhalation, ces cristaux n'étaient pas en faveur de l'éthylène glycol, mais il y a risque de confusion (cristaux en bâtonnets d'oxalate de Ca). La carboxyhémoglobine dérive du chlorure de méthylène.

La méthanolémie était à 180 mg/l à la 24^{ème} h. L'éthanolisation a été prolongée 36 heures. Pas de séquelles.

Il aurait été utile de vérifier dès l'admission que le léger affaissement des bicarbonates n'était pas du à du formiate ou du glycolate.

Cas n°2

Le dosage de l'éthylène glycol montre un taux élevé (146 mmol/l soit 9,0 g/l ; l'osmolalité était à 491 mOsmol/kg) : la dialyse est utile pour éliminer rapidement le glycol ainsi que le glycolate déjà formé.

En plus de symptômes évocateurs, on retient généralement les critères décisionnels suivants :

- éthylène glycol : traitement antidote (éthanolisation ou 4-méthylpyrazole) si >0,2-0,25 g/l (3-4 mmol/l)
hémodialyse dès 0,5-0,7 g/l (8-10 mmol/l) et/ou acidose / glycolatémie anormale
- méthanol : éthanolisation si >0,2 g/l (6 mmol/l)
hémodialyse si > 0,5 g/l (16 mmol/l) et/ou acidose / formatémie anormale

Le patient a été dialysé 18 h. En fin de dialyse, le taux d'éthylène glycol était de 4 mmol/l (0,25 g/l). Pas de séquelles du fait de la prise en charge rapide.

Le résultat du dosage de l'éthylène glycol importe ici pour la décision thérapeutique.

Cas n°3

Mr A est arrivé à l'hôpital psychiatrique en état d'acido-cétose alcoolique (pour l'instant compensée). Le trou osmolaire est élevé, mais la participation d'un autre alcool ou glycol n'est pas tranchée sur ce seul résultat.

De fait, le liquide contenait de l'éthanol et de l'éthylène glycol.

Les dosages du méthanol (<20 mg/l) et de l'éthylène glycol (6 mmol/l soit 0,37 g/l) ont permis de décider rapidement du traitement (injection de 4-méthylpyrazole pour bloquer le métabolisme de l'éthylène glycol). La créatininémie de Mr A est restée normale pendant le suivi.

Mr B est vu tardivement. A ce moment l'éthanol du liquide ingéré est déjà métabolisé depuis longtemps et l'acidose est constituée. Malgré la dialyse, la fonction rénale ne récupérera que lentement (419 µmol/l de créatinine à J10).

Le trou osmolaire de Mr B est trompeur. **Il est important de pouvoir expliquer l'origine de l'acidose** : le dosage du glycolate chez ce patient a donné 25 mmol/l (il était <1 mmol/l pour Mr A).

NB : L'hypocalcémie (ici 1,9 mmol/l) est en faveur de l'intoxication mais ce critère est peu fiable.

Cas n°4

Les troubles digestifs recommandent de **vérifier qu'il ne s'agit pas de méthanol ou d'éthylène glycol**. Une vérification des "corps cétoniques" a permis de confirmer une cétose sans acidose. Cette situation pourrait orienter vers une ingestion d'isopropanol, la méthode enzymatique utilisée pour l'"alcoolémie" étant interférée (méthode UV à l'ADH). La chromatographie gazeuse confirmera l'isopropanol (1,72 g/l) et son métabolite, l'acétone (0,47 g/l).

Le cousin interrogé indique la bouteille ayant servi à préparer le biberon et le père se souvient y avoir transvasé un produit pour les carreaux !

Cas n°5

La mesure de l'osmolalité a été faite avec un appareil à pression de vapeur (insensible aux composés volatils). Il faut utiliser le principe de l'abaissement de la température de congélation.

Un dosage en urgence du méthanol et du formiate auraient été plus informatifs que la pratique du trou osmolaire : la concentration élevée de méthanol et le début du creusement du trou anionique (il y avait 6 mmol/l de formiate) auraient permis de convaincre plus tôt le médecin hémodialyseur.

Cas n°6

Le dosage d'un métabolite acide, comme le formiate (les alcooliques ont souvent recours à des succédanés comme l'alcool à brûler qui contient du méthanol), permettrait d'exclure une intoxication comme cause (unique ou non) de l'acidose métabolique. Le patient est ici victime d'une acido-cétose alcoolique consécutive à un jeûne prolongé. La cétose est mal détectée car surtout à base de béta hydroxy-butyrate : les bandelettes réagissent mieux avec l'acéto-acétate et l'acéto-ne. Le béta hydroxy-butyrate (ici 10 mmol/l) est favorisé par un rapport NADH/NAD hépatocytaire élevé chez l'alcoolique.

La réhydratation et la vitaminothérapie ont corrigé le tableau en 48 heures.

Cas n°7

L'ingestion de formaldéhyde est probable du fait de l'atteinte muqueuse digestive. L'élévation de la formateémie est limitée par la liaison du formaldéhyde, sur son passage, par les protéines tissulaires. A noter cependant que le formol contient souvent du méthanol comme stabilisant (à env. 10 %).

Le dosage du méthanol est ici, bien sûr, indispensable pour le diagnostic et la prise en charge : un résultat très élevé fera pencher vers une intoxication au méthanol ; sinon, une intoxication au formol sera envisagée avec discussion de l'intérêt de bloquer l'ADH hépatique (NB : de même, l'ivresse du sujet ne le protège pas dans une intoxication au formaldéhyde).

Les suites ont été : gastrectomie en urgence, extubation à J16, réanastomose à J35 ; mais le patient décède à J56 dans un tableau de déchéance pulmonaire irréversible.

Cas n°8

Le calcul mental est souvent utilisé pour le trou osmolaire : ici $2Na + \text{urée} + \text{glucose}$ donnent 280 environ, soit un trou de 90 duquel il faut enlever l'éthanol (env. 20 pour chaque g/l). Le reste (soit 40 mOsmol/kg) justifie une thérapeutique s'il s'agit de méthanol. En fait, la patiente a une pseudo-hyponatrémie du fait de ses 50 g/l d'IgG : une mesure des ions en potentiométrie directe aurait montré une natrémie à 150 et un trou osmolaire normal.

Il aurait été utile que le laboratoire puisse doser en urgence le méthanol et l'éthylène glycol.

Cas n°9

La biologie de la seconde admission est peu évocatrice. Afin de lever le doute (signes digestifs, contexte, début d'acidose non lactique), **il aurait été utile de pouvoir doser au moins le formiate et le glycolate**. Les résultats auraient montré une intoxication par le méthanol méconnue lors de la première admission et qui s'est installée dès que l'éthanolémie a été $< 1-1,2$ g/l, soit peu avant la sortie le matin de l'hôpital.

Lors du second bilan, le trou osmolaire est creusé par la présence de propylène glycol. Celui-ci provient de l'excipient du Valium*. La lactatémie n'explique pas le creusement du trou anionique et, là encore, le dosage d'un métabolite acide est nécessaire (NB : la lactatémie peut provenir, en partie, du propylène glycol).

Cas n°10

Les résultats de l'analyse du LCR peuvent préciser une piste : la chlorurémie est elle aussi très élevée (137 mmol/l). Il faut envisager une intoxication par le brome (le plus souvent une auto-médication par le Calcibronat*) et une interférence de l'ion Br- sur les électrodes "sélectives" de Cl- (ainsi que sur Ektachem/Vitros*).

Le dosage spécifique du brome (ex. : par ICP-MS) a donné ici le taux de 690 mg/l soit env. 8,6 mmol/l ($N < 0,06$ mmol/l).
