

## Article original / Original article

# Influence du site de prélèvement sur l'étude cinétique et métabolique de l'éthanol

## *Influence of the sample site on kinetic and metabolic studies of ethanol*

Olivier Roussel<sup>1,2\*</sup>, Patricia Risède<sup>2</sup>, Frédéric J. Baud<sup>2,3</sup>, Pascal Houzé<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup> Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale, Rosny-Sous-Bois, France

<sup>2</sup> CNRS UMR 7157 - INSERM U705, Neuropsychopharmacologie des Addictions, Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, Paris, France

<sup>3</sup> Service de Réanimation Médicale et Toxicologique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe hospitalier Lariboisière-Saint Louis, Université Paris Diderot, Paris, France

<sup>4</sup> Laboratoire de Biochimie, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe hospitalier Lariboisière-Saint Louis, Université Paris Diderot, Paris, France

<sup>5</sup> Laboratoire de Chimie-Toxicologie Analytique et Cellulaire (EA 4463), Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie, Paris, France

**Résumé – Objectif :** L'analyste n'obtenant pas toujours les mêmes prélèvements sanguins, nous proposons d'étudier l'influence du site de prélèvement sanguin sur l'étude cinétique et métabolique de l'éthanol. **Méthode :** Sur un modèle animal, le rat mâle Sprague-Dawley âgé de 7 à 9 semaines, les cinétiques sanguines de l'éthanol, sériques de l'acétate et du lactate, artérielles et veineuses, sont déterminées respectivement par analyse de l'espace de tête en chromatographie en phase gazeuse et électrophorèse capillaire de zone. L'animal est cathétérisé soit au niveau d'une artère fémorale, soit au niveau d'une veine caudale. **Résultats :** Lors de la phase d'absorption, l'éthanolémie artérielle croît plus rapidement et plus intensément que l'éthanolémie veineuse ; après la phase de distribution, elles tendent à se confondre. Contemporainement, les acétates, métabolites de l'éthanol, apparaissent plus concentrés dans le compartiment artériel que veineux périphérique ; les lactates, produits indirects du métabolisme de l'éthanol, présentent une cinétique artérielle similaire à celle de l'acétate, les concentrations veineuses restant anormalement élevées pendant l'étude. **Conclusion :** Le sang veineux prélevé lors de cette étude n'a pas donné accès à la réalité cinétique et métabolique de l'éthanol. Ainsi, en comparaison avec le compartiment artériel, l'éthanol et l'acétate sont présents en quantité moindre dans le sang veineux, l'éthanol y apparaissant plus lentement. Le sang veineux prélevé s'est même avéré inadapté à l'étude cinétique des lactates. Cette étude confirme, si nécessaire, que les résultats et l'interprétation d'une analyse sont préconditionnés par le prélèvement lui-même, ce dernier n'étant pas toujours réalisé sous les indications d'un analyste.

**Mots clés :** Recueil de prélèvements sanguins/méthode, éthanol/sang, éthanol/métabolisme, acétates/sang, lactates/sang

**Abstract – Objective:** Because the analyst does not always obtain the same sampling of blood, we suggest studying the influence of the site of blood sampling on kinetic and metabolic studies of ethanol. **Method:** On an animal model, 7-to-9-week-old Sprague-Dawley male rats, arterial and venous blood kinetics of ethanol and serum kinetics of acetate and lactate were, respectively, determined by head-space chromatography analysis and capillary zone electrophoresis. The animal is catheterized either at the femoral artery, or at the caudal vein. **Results:** During the absorption phase, the arterial blood ethanol grew more quickly and more intensely than the venous; after the distribution phase, they tended to merge. At the same time, acetates, produced during ethanol metabolism, were more concentrated in the arterial compartment than the venous; lactates, indirect products of ethanol metabolism, presented an arterial kinetics similar to acetate, and venous concentrations remained abnormally high throughout the study. **Conclusion:** The venous blood samples taken during this study did not give access to the kinetic and metabolic reality of ethanol. So, compared with the arterial compartment, ethanol and acetate were present in lesser quantity in venous blood, ethanol appearing there more slowly. Venous blood samples were unsuited to kinetic study of lactates. This study confirmed, if necessary, that the

\* Correspondance : Olivier Roussel, [olivier.roussel@gendarmerie.interieur.gouv.fr](mailto:olivier.roussel@gendarmerie.interieur.gouv.fr)

analysis results and their interpretation were conditioned by the sampling itself, which is not always realized according to the analyst instructions.

**Key words:** Blood specimen collection/methods, ethanol/blood, ethanol/metabolism, acetates/blood, lactates/blood

Reçu le 8 juin 2012, accepté après modifications le 23 novembre 2012

Publication en ligne le 15 février 2013

## 1 Introduction

La concentration sanguine des xénobiotiques est souvent considérée, à tort, comme homogène dans le sang. Or, en raison de différences anatomiques, tissulaires, cinétiques ou chimiques, les concentrations sanguines peuvent différer d'un site de prélèvement à un autre, cette différence évoluant, elle-même, dans le temps. Ainsi, de nombreux composés montrent une différence artérioveineuse de concentration après administration : lors de la phase d'absorption et de diffusion, le sang artériel est généralement plus concentré ; lors de la phase d'élimination, c'est le sang veineux. Mais il existe aussi des différences entre les sites de prélèvement veineux, en fonction de la perfusion sanguine de la zone ou de la fonction de l'organe ou du tissu en amont. Ces différences peuvent avoir des implications pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Le sang prélevé, le plus souvent veineux, peut ne pas refléter l'activité de la substance, qui est souvent mieux corrélée à la concentration artérielle [1–3].

Cette différence artérioveineuse a déjà été abondamment étudiée pour l'éthanol en raison de ses implications toxiques et légales [4–9]. Par contre, l'étude d'une différence artérioveineuse de la concentration sanguine de ses métabolites a fait l'objet de moins de publications [10, 11]. Or, parmi ces métabolites : l'acétate [12] et l'acéto-acétate [13] participeraient aux acidémies ou acidoses observées après alcoolisation. Et, selon certains auteurs, le métabolisme hépatique de l'éthanol déplaçant l'équilibre du cofacteur  $\text{NAD}^+/\text{NADH}, \text{H}^+$ , les lactates hépatiques et sanguins seraient augmentés et participeraient aussi à cette acidose [10, 11, 14–17].

Ainsi, nous proposons d'étudier l'influence du site de prélèvement sur les cinétiques sanguines de l'éthanol, des acéto-acétates, des acétates et des lactates, à partir d'un modèle animal : le rat mâle Sprague-Dawley âgé de 7 à 9 semaines. Ce modèle animal a déjà été employé au sein de notre équipe pour l'étude des cinétiques de la méthadone [18] et pour l'analyse des gaz du sang [19–22]. Notre objectif est de vérifier l'intérêt et/ou les conséquences d'un prélèvement veineux lors de l'étude cinétique de l'éthanol ou d'un dosage à but diagnostique des anions organiques formés.

Les doses d'éthanol de 0,5, 1 ou 3  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  ont été choisies afin de provoquer des intoxications alcooliques modérées à graves, de telles doses ayant été éprouvées sur des modèles animaux similaires [23–25]. Les solutions éthanoliennes ont été administrées par voie intrapéritonéale, l'absorption par voie orale étant très variable chez un sujet alimenté [26] et le métabolisme de l'éthanol étant diminué chez des animaux à jeun [27]. Les échantillons de sang artériel fémoral ou veineux caudal ont été prélevés régulièrement pendant 4 heures. Les éthanolémies ont été déterminées par analyse de l'espace de

tête en chromatographie en phase gazeuse et les anions organiques ont été dosés par électrophorèse capillaire.

## 2 Matériels et méthodes

### 2.1 Réactifs

Trois anesthésiques différents ont été utilisés : la kétamine (RN 6740-88-1) (Clorketam<sup>®</sup>, Vetoquinol, Lure) et la xylazine (RN 7361-61-7) (Rompun<sup>®</sup>, Bayer-Pharma Santé Animale, Puteaux) pour la cathétérisation et le pentobarbital (RN 76-74-4) (Pentobarbital sodique, Ceva Santé Animal, Libourne) pour l'euthanasie. Les solutions éthanoliennes sont fabriquées par dilution d'éthanol absolu (RN 64-17-5) (VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois) dans du chlorure de sodium isotonique 0,9 % (RN 7647-14-5) (Fresenius Kabi France, Sèvres) aux concentrations de 50, 100 et 300  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Le tert-butanol (RN 75-65-0) (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier) dissous dans de l'eau ultrapure à 200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  est employé comme étalon interne pour le dosage de l'éthanol sanguin. L'eau ultrapure est produite par une centrale Milli-Q gradient A10 équipée d'une cartouche Quantum EX ; l'eau produite a une résistivité de 18,2  $\text{Mohms}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Millipore, Molsheim). Le chlorure de sodium (RN 7647-14-5) employé est de qualité pour analyses (VWR, Fontenay-sous-Bois). La gamme d'étalonnage est constituée par un *Cerilliant Multi-component alcohol calibration kit* (LGC Standards, Molsheim) et les contrôles internes par les *Medidrug Ethanol VB-plus 0.5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$*  et *Medidrug Ethanol VB-plus 1.1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$*  (LGC Standards, Molsheim). Les acides organiques sont dosés à l'aide de la trousse Anion Analyses Kit<sup>®</sup> (Ref. A53537, Beckman Coulter, Villepinte).

### 2.2 Expérimentation animale

#### 2.2.1 Animaux

Tous les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le Comité d'Éthique en matière d'Expérimentation Animale Paris Descartes (No. P2.FB.066.09 et No. P2-FB-135-10). Les rats Sprague-Dawley (Janvier, Le Genest-Saint Isle) utilisés étaient des mâles âgés de 7 à 9 semaines, pesant entre 244 et 348 grammes. À leur arrivée à l'animalerie et avant toute manipulation, les rats sont placés en quarantaine pendant une semaine dans des conditions adaptées de lumière et de température et avec un accès libre à la nourriture et à l'eau de boisson. Avant toute manipulation (chirurgie ou expérimentation), les animaux sont pesés puis distribués aléatoirement dans les

différents groupes. Les solutions éthanoliques sont administrées par voie intrapéritonéale (IP) à de  $10 \text{ mL.kg}^{-1}$ . Après les expérimentations, les animaux survivants sont euthanasiés par injection de pentobarbital.

## 2.2.2 Prélèvement artériel

Un jour avant l'expérimentation, les rats sont cathétérisés au niveau de l'artère fémorale gauche. Cette technique a été décrite précédemment [19]. Le délai de 24 heures est nécessaire à l'élimination complète des anesthésiques utilisés (kétabine  $70 \text{ mg.kg}^{-1}$ , demi-vie d'élimination 1 h [28] et xylazine  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ , demi-vie d'élimination 2-3 h [29]).

Les animaux sont distribués au hasard entre les 4 groupes ( $n = 5/\text{groupe}$ ) : le groupe témoin (qui reçoit du chlorure de sodium isotonique) et trois groupes « éthanol » à 0,5, 1 et  $3 \text{ g.kg}^{-1}$  d'éthanol dilué dans le chlorure de sodium isotonique. Pour l'expérimentation, le cathéter est libéré puis le rat placé délicatement dans la boîte de contention. Les échantillons sanguins ( $200 \mu\text{L}$ ) sont prélevés aux temps 0, 20, 40, 60, 120, 180 et 240 minutes. Le premier prélèvement est réalisé juste avant l'administration d'éthanol. Le volume sanguin total prélevé n'excède par le maximum admis [30] et  $0,5 \text{ mL}$  de sérum physiologique hépariné est administré juste après les prélèvements à 20, 60, 120 et 180 minutes pour éviter toute coagulation dans le cathéter et pour compenser les pertes sanguines. Pour éviter toute dilution par le contenu du cathéter, celui-ci est purgé avant tout prélèvement suivant l'administration de sérum physiologique.

Pour les analyses sanguines, les échantillons sont immédiatement congelés à  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ; pour les analyses sériques, les échantillons sont immédiatement centrifugés, le sérum recueilli est alors congelé à  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 2.2.3 Prélèvement veineux

Les animaux sont distribués au hasard entre les 4 mêmes groupes ( $n = 3/\text{groupe}$ ). Les rats non anesthésiés sont placés dans une boîte de contention et sont cathétérisés au niveau d'une veine caudale avec un cathéter court pour intraveineuse de 22G (Robé Médical, Remiremont). Seul le site de cathétérisme diffère de la méthode employée pour les prélèvements artériels.

## 2.3 Techniques analytiques

### 2.3.1 Détermination de l'éthanolémie

L'éthanol sanguin est dosé par chromatographie en phase gazeuse après prélèvement de l'espace de tête. Le chromatographe employé est un Thermofinnigan Trace GC (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne Hewlett Packard Blood-Alcohol de  $7,5 \text{ m} \times 0,32 \text{ mm} \times 20 \mu\text{m}$  (Chromoptic, Courtabœuf).

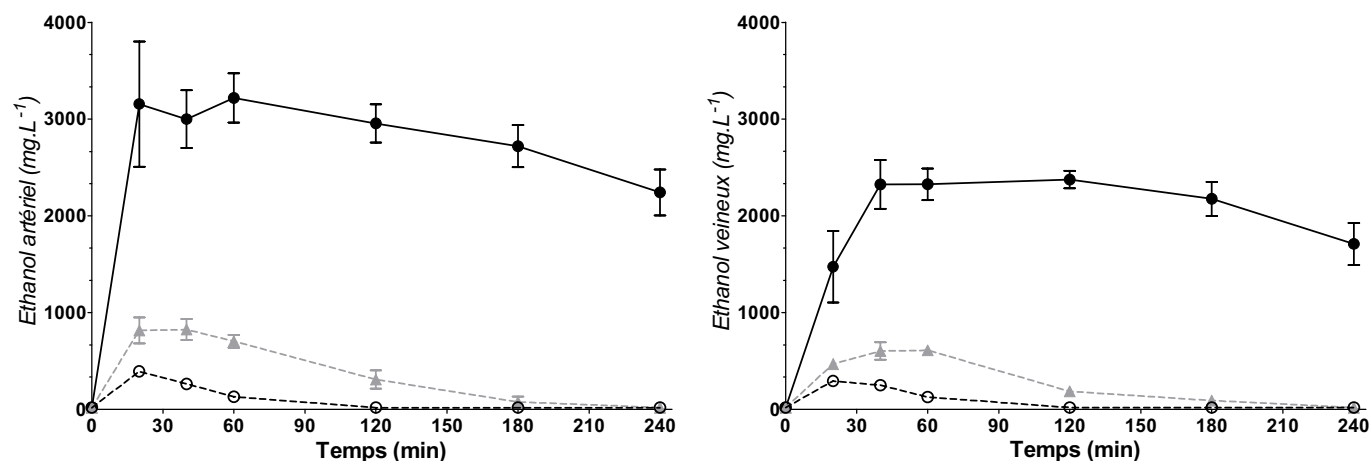
La méthode de dosage de l'éthanol a été adaptée à partir de celle enregistrée au plan Qualité de l'Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale [31], la différence consistant en la réduction de la prise d'essai :  $25 \mu\text{L}$  au lieu de  $50 \mu\text{L}$ . La prise d'essai,  $300 \mu\text{L}$  de l'étalon interne (Tert-butanol  $200 \text{ mg.L}^{-1}$ ) et  $1,25 \text{ mL}$  de chlorure de sodium solide sont placés dans le flacon de  $20 \text{ mL}$  adapté au prélèvement de l'espace de tête. Le flacon est agité et chauffé pendant 30 minutes au moins à  $85 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $1 \text{ mL}$  de l'espace de tête est injecté et élué au travers de la colonne HP BLOOD-ALCOHOL. L'éthanol est détecté par ionisation de flamme. L'éthanolémie est déterminée en fonction du rapport du signal de l'éthanol à celui du tert-butanol avec une gamme d'étalonnage externe fabriquée avec le *Cerilliant Multi-component alcohol calibration kit*. Lors de la série d'essais, deux solutions sanguines de contrôle sont analysées.

La méthode de dosage a été validée selon les règles en vigueur à l'Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale, sa limite de détection a été établie à  $60 \text{ mg.L}^{-1}$ , son domaine d'exactitude court de  $200$  à  $5000 \text{ mg.L}^{-1}$ , son incertitude maximale de mesure est de  $13 \%$ .

### 2.3.2 Détermination des acides organiques sériques

Les acéto-acétates, acétates et lactates sériques sont dosés par électrophorèse capillaire de zone à l'aide d'un Beckman Coulter P/ACE™ MDQ (Beckman Coulter, Villepinte) en utilisant une trousse d'analyses Anion Analysis Kit®.

Dans un tube Eppendorf,  $100 \mu\text{L}$  de sérum (échantillon, points de gamme et contrôles) sont précipités par  $200 \mu\text{L}$  d'acétonitrile contenant  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  de formiate (étalon interne). Après agitation et centrifugation ( $14\,000 \text{ tours.min}^{-1}$  pendant 5 minutes), le surnageant est décanté puis évaporé à sec dans un tube borosilicaté à température ambiante. Le résidu sec est repris par  $100 \mu\text{L}$  de tampon de séparation. Les solutions obtenues sont introduites dans le capillaire en mode hydrodynamique sous un temps variable (2 à 8 s). La séparation se fait selon le principe de l'électrophorèse de zone dans un capillaire de silice ( $75 \mu\text{m}$  de diamètre  $\times$   $50 \text{ cm}$  de longueur effective) dynamiquement recouvert d'une couche polycationique (*dynamic coating*) avant l'analyse de chaque échantillon, de façon à inverser le flux électro-osmotique (EOF). La séparation est réalisée sous un voltage de  $30 \text{ kV}$ , en polarité inverse à une température de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Les acides organiques sont détectés en mode UV indirect à  $254 \text{ nm}$ . Dans ces conditions de séparation, les temps de migration et les mobilités apparentes sont pour les formiates ( $3,60 \text{ min}$  :  $\mu\text{e} = -0,00053592 \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), les acétates ( $4,78 \text{ min}$  :  $\mu\text{e} = -0,00039133 \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), les acéto-acétates ( $4,88 \text{ min}$  :  $\mu\text{e} = -0,00038227 \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) et les lactates ( $4,94 \text{ min}$  :  $\mu\text{e} = -0,00037622 \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Pour tous les acides, la méthode est linéaire de  $15$  à  $4000 \text{ mg.L}^{-1}$  correspondant à une linéarité de  $0,25$  à  $67,8 \text{ mmol.L}^{-1}$  pour les acétates,  $0,15$  à  $39,2 \text{ mmol.L}^{-1}$  pour les acéto-acétates et de  $0,17$  à  $44,1 \text{ mmol.L}^{-1}$  pour les lactates. Les limites de détection et de quantifications sont respectivement de  $5$  et  $15 \text{ mg.L}^{-1}$  (sous une injection de  $8 \text{ s}$ ). Pour les trois acides, les coefficients de variation pour l'exactitude sont inférieurs à  $11 \%$ . Il n'y a pas d'interférence avec l'héparine, avec différents anions inorganiques physiologiques, soit parce qu'ils sont rapidement élués



**Fig. 1.** Cinétiques sanguines artérielles (gauche) et veineuses (droite) de l'éthanol dans les 240 minutes suivant l'administration intrapéritonéale pour les groupes : 0,5 g.kg<sup>-1</sup> (○), 1 g.kg<sup>-1</sup> (▲) et 3 g.kg<sup>-1</sup> (●). Les points représentent les concentrations observées ± l'erreur standard à la moyenne. Pour les cinétiques artérielles *n* = 5 ; pour les cinétiques veineuses *n* = 3.

**Tableau I.** Concentration maximale, temps du maximum et aires sous la courbe apparents pour les 3 groupes éthanol, pour les cinétiques artérielles *n* = 5 ; pour les cinétiques veineuses *n* = 3. Le coefficient de corrélation et le test de pente ont été réalisés lors d'une régression linéaire.

	C <sub>max</sub> artérielle mesurée (mg.L <sup>-1</sup> )	T <sub>max</sub> artériel observé (min)	AUC artérielle calculée	C <sub>max</sub> veineuse mesurée (mg.L <sup>-1</sup> )	T <sub>max</sub> veineux observé (min)	AUC veineuse calculée
3 g.kg <sup>-1</sup>	3634 ± 361	48 ± 20	659 483 ± 55 825	2605 ± 155	88 ± 27	493 134 ± 29 271
1 g.kg <sup>-1</sup>	848 ± 116	36 ± 7	83 140 ± 14 593	656 ± 42	47 ± 6	32 175 ± 1067
0,5 g.kg <sup>-1</sup>	391 ± 38	20	18 312 ± 1 933	292 ± 2	20	15 860 ± 11
Coefficient de corrélation : <i>r</i> <sup>2</sup>	0,9106	0,1533	0,9401	0,9612	0,3657	0,9631
Test de pente : <i>p</i>	<0,0001	0,1490	<0,0001	<0,0001	0,0487	<0,0001

(chlorures : 2,66 min), soit car ils ne sont pas détectés aux concentrations physiologiques (sulfates, phosphates, nitrates).

### 2.4 Analyse statistique

Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (*m* ± SEM). Afin d'analyser simultanément l'effet du temps et du traitement, les résultats sont comparés selon une analyse de variance à deux facteurs pour analyses répétées ; si l'interaction temps\*traitement est significative, un post-test de Bonferroni est effectué. Pour les paramètres cinétiques, un calcul de régression linéaire est réalisé. Ces calculs sont effectués à l'aide du logiciel Prism v5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California) et sont considérés significatifs pour une valeur de *p* inférieure à 0,05.

## 3 Résultats

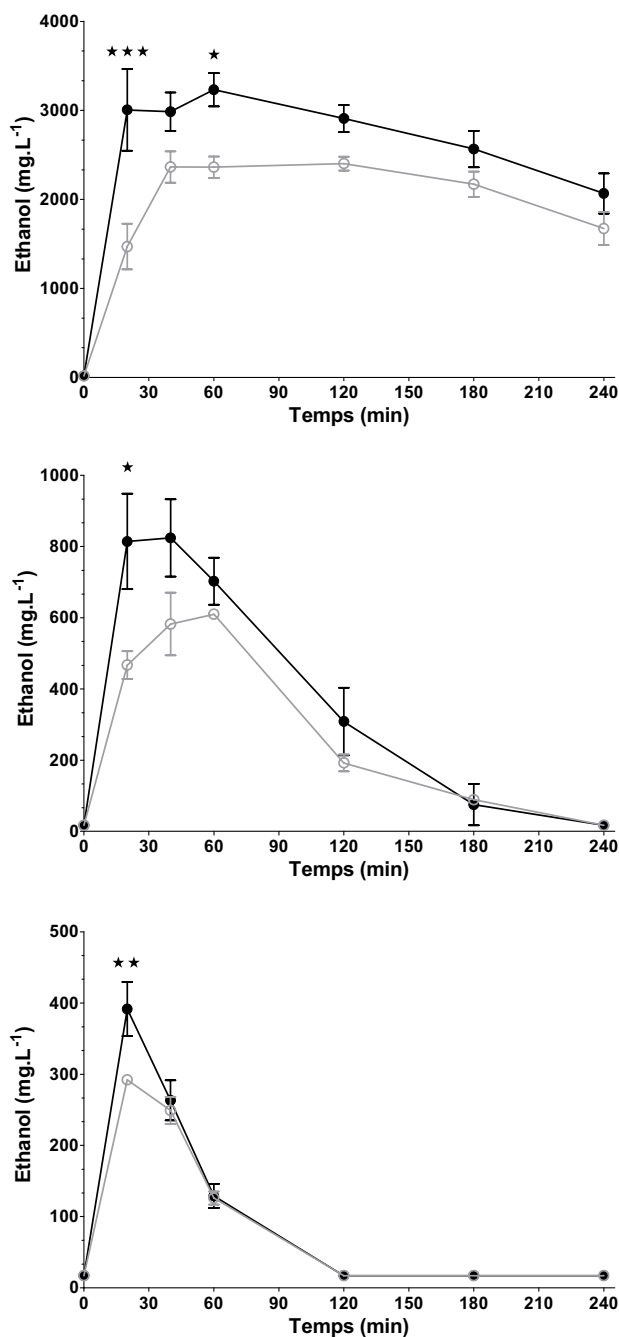
### 3.1 Éthanolémie

Les cinétiques d'éthanol présentent les phases attendues d'absorption et d'élimination (figure 1) qui diffèrent entre le sang artériel et veineux. La superposition des cinétiques artérielles et veineuses pour chaque groupe (figure 2) montre

que pour une même dose, l'éthanolémie croît plus rapidement et plus intensément dans le sang artériel (différences significatives à *t*<sub>20min</sub> pour toutes les doses, *p* < 0,05 à *p* < 0,001). Les différences maximales observées à 20 min sont de 1680 mg.L<sup>-1</sup> pour le groupe à 3 g.kg<sup>-1</sup>, de 350 mg.L<sup>-1</sup> pour celui à 1 g.kg<sup>-1</sup> et de 100 mg.L<sup>-1</sup> pour celui à 0,5 g.kg<sup>-1</sup>. Après cette phase d'absorption-distribution, l'éthanol est éliminé à la vitesse comparable entre le sang artériel et veineux (figure 2). Les concentrations maximales (C<sub>max</sub>), les temps des maxima (T<sub>max</sub>) et les aires sous la courbe (AUC) mesurés sont reportés dans le tableau I. À l'exception des T<sub>max</sub> veineux, tous ces paramètres croissent avec la dose.

### 3.2 Acides organiques sériques

Les acéto-acétates sériques n'ont été décelés dans aucun échantillon, leur concentration est restée inférieure à la limite de détection : 0,05 mmol.L<sup>-1</sup>. Les acétates présentent des cinétiques différentes pour chaque groupe quelque soit l'origine du sérum, ainsi le groupe 0,5 g.kg<sup>-1</sup> présente une augmentation significative entre 20 et 60 minutes, celui à 1 g.kg<sup>-1</sup> entre 20 et 120 ou 180 minutes et celui à 3 g.kg<sup>-1</sup> de 20 à 240 minutes (figure 3). Le sérum artériel contient plus d'acétates, la différence moyenne sur l'ensemble des résultats est



**Fig. 2.** Cinétiques sanguines artérielles (●) et veineuses (○) de l'éthanol après administration de 0,5 (en bas), 1 (au centre) et 3 g.kg<sup>-1</sup> (en haut) par voie IP chez des rats mâles Sprague-Dawley distincts, les cinétiques artérielles ayant été obtenues avec d'autres individus que les cinétiques veineuses.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$ .

de  $0,59 \pm 0,14$  mmol.L<sup>-1</sup>. La superposition des cinétiques artérielles et veineuses pour chaque groupe (figure 4) montre que pour une même dose, les acétates sont plus concentrés dans le sérum artériel (pour le groupe 0,5 g.kg<sup>-1</sup> de 20 à 60 min,  $p < 0,05$  à  $p < 0,001$ ; pour le groupe 1 g.kg<sup>-1</sup> de 120 à 180 min,  $p < 0,01$ ; pour le groupe 3 g.kg<sup>-1</sup> de 40 à 60 min,  $p < 0,05$  à  $p < 0,01$ ). Après la phase de formation-distribution, les acétates sont éliminés à la vitesse comparable

depuis le sang artériel et veineux, à l'exception du groupe à 1 g.kg<sup>-1</sup> (figure 4).

Les concentrations sériques artérielles en lactates ne diffèrent pas entre les groupes (figure 3), à l'exception du groupe 0,5 g.kg<sup>-1</sup> qui a présenté une concentration sérique en lactates différente et supérieure aux autres à 20 min ( $p < 0,05$ ). De même pour les lactates sériques veineux, seul le groupe 1 g.kg<sup>-1</sup> a présenté une concentration supérieure aux autres à t<sub>180</sub> et t<sub>240</sub>. Le sang veineux contient plus de lactate que l'artériel, la différence moyenne est de  $5,2 \pm 0,8$  mmol.L<sup>-1</sup> (moyenne sur l'ensemble des résultats). La superposition des cinétiques artérielles et veineuses pour chaque groupe (figure 5) montre que pour une même dose, les lactates sont moins concentrés dans le sérum artériel (ANOVA 1 facteur :  $p < 0,001$  pour tous les groupes).

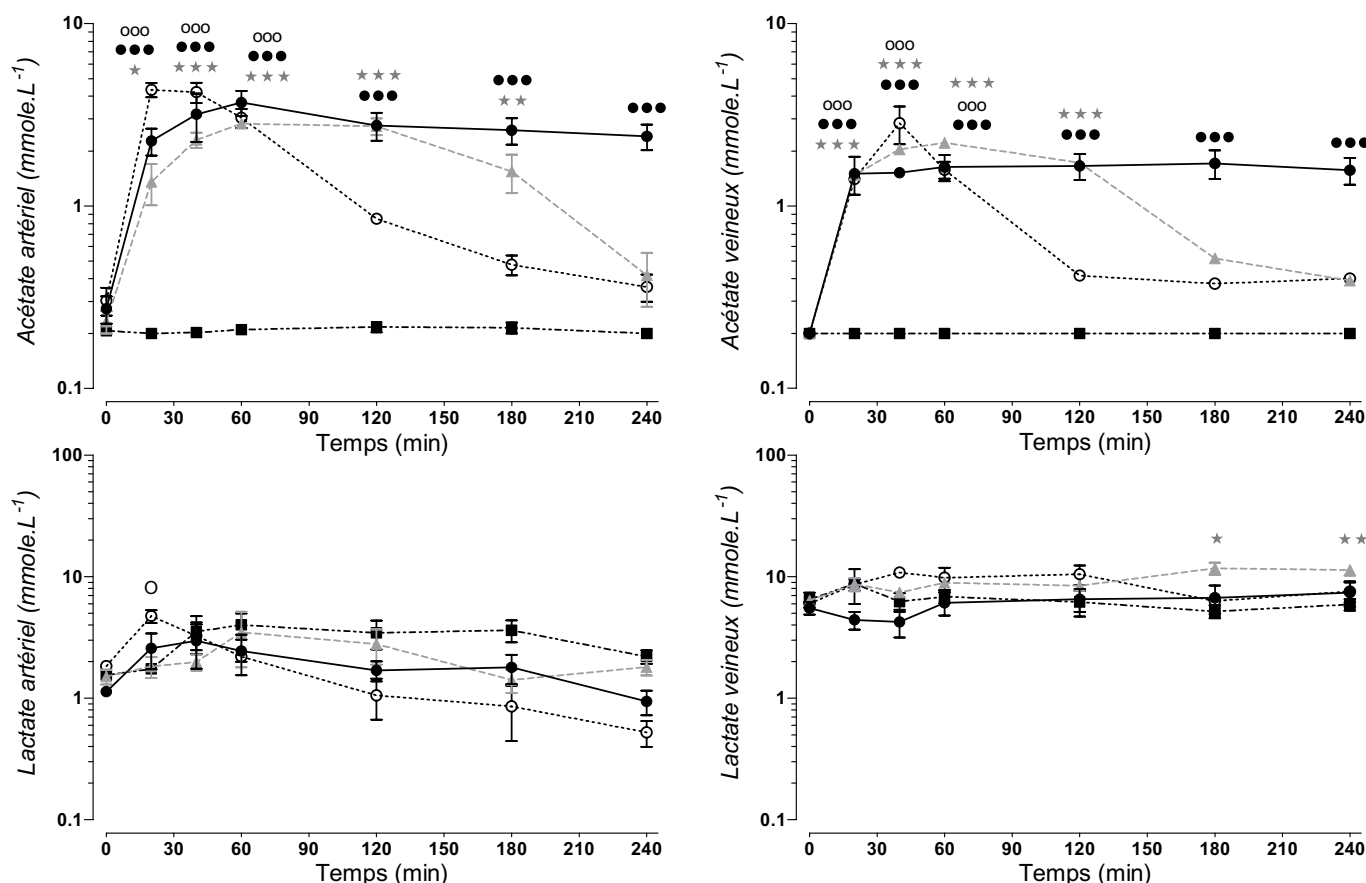
La superposition des profils cinétiques artériels et veineux de l'éthanol sanguin, des acétates sériques et des lactates sériques (figure 6) montre que :

- dans le compartiment artériel, les profils cinétiques de l'éthanol et des acétates sont assez similaires avec une augmentation des concentrations lors de la première heure. De plus, bien qu'elles ne soient pas significativement différentes de celle des témoins, les cinétiques des lactates artériels présentent un profil assez similaire à l'éthanol et les acétates avec un T<sub>max</sub> dans la première heure suivi d'une phase d'élimination ;
- dans le compartiment veineux, les profils cinétiques de l'éthanol et des acétates sont aussi similaires avec une T<sub>max</sub> dans la première heure et des C<sub>max</sub> inférieures à celles du compartiment artériel. Les lactates veineux ne présentent pas une évolution évidente.

## 4 Discussion

Pour toutes les doses d'éthanol, nous avons observé, avec notre modèle, une différence entre les éthanolémies artérielles et veineuses. Cette différence a déjà été décrite et étudiée pour l'éthanol [4, 5], en particulier par l'équipe de Jones [6, 7, 9]. Dans notre étude, elle croît avec les doses, pour atteindre, à 20 min, plus de 1,6 g.L<sup>-1</sup> pour la dose à 3 g.kg<sup>-1</sup>. L'alcool éthylique étant distribué avec l'eau corporelle [32, 33], cette différence aurait pour origine les différences entre les vitesses d'absorption, de distribution et de métabolisation de l'éthanol dans les différents tissus. Cette différence est alors plus intense lors des phases d'absorption et de distribution et peut provoquer une mésestimation de l'imprégnation alcoolique, en particulier, après analyse d'un échantillon veineux prélevé précocement lors de la phase d'absorption. Or, ce sont pendant ces phases que les effets toxiques de l'éthanol sont décrits comme maximum (effet de Mellanby) [8].

En revanche, la différence artérioveineuse est moindre lors de la phase d'élimination qui consiste essentiellement pour l'éthanol en sa métabolisation. Les mécanismes du catabolisme ont été clairement établis [13, 16, 34]. Principalement réalisés dans le foie, ils mettent en jeu différents systèmes enzymatiques : alcool-déshydrogénase (EC1.1.1.1 ou *alcohol: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase*) ; MEOS (*microsomal ethanol-oxidizing system* : système microsomal



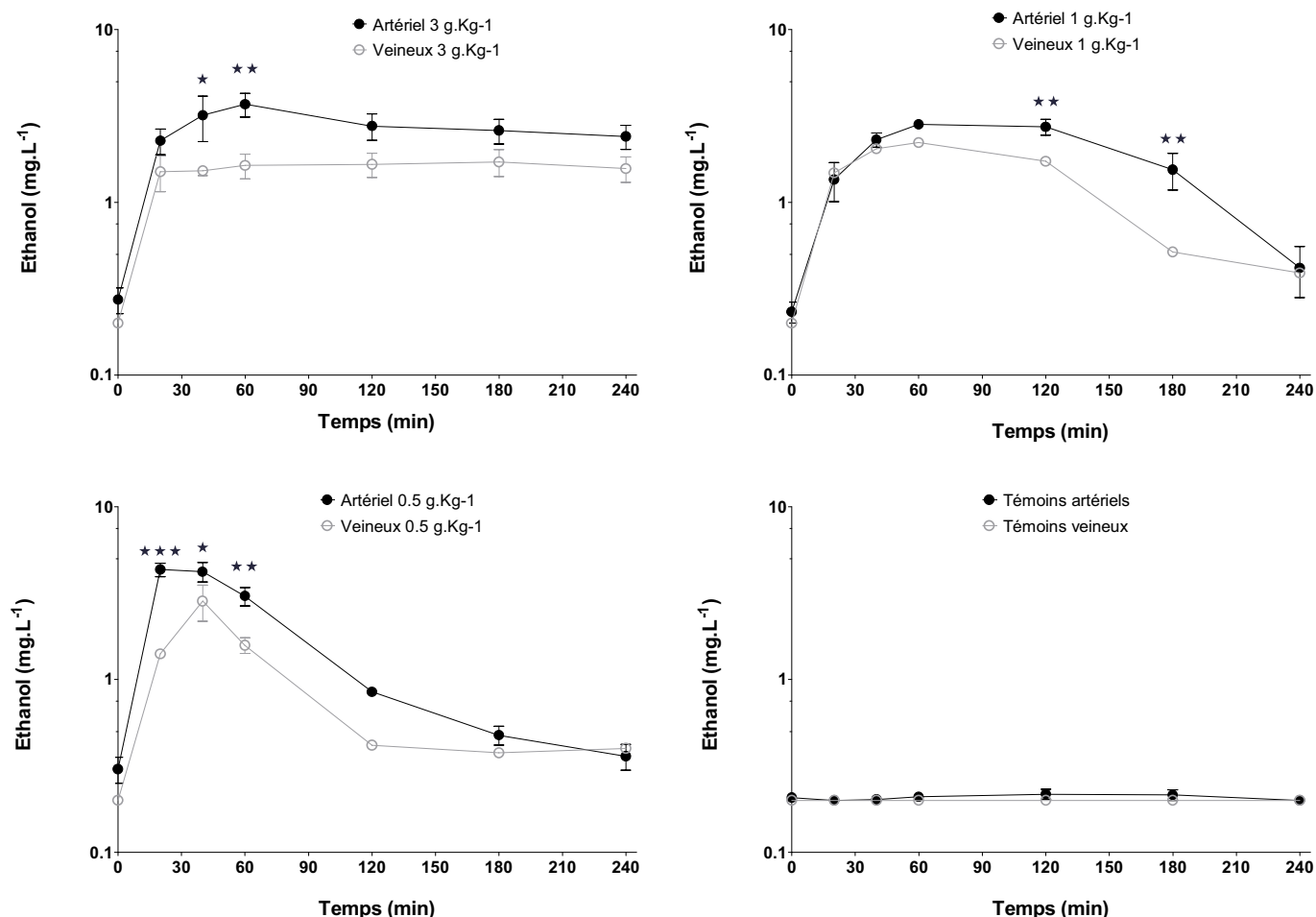
**Fig. 3.** Cinétiques plasmatiques artérielles,  $n = 5$ , ou veineuses,  $n = 3$ , des acétates et des lactates dans les 240 minutes suivant l'administration intrapéritonéale pour les groupes : témoins (■),  $0,5 \text{ g.kg}^{-1}$  (○),  $1 \text{ g.kg}^{-1}$  (▲) et  $3 \text{ g.kg}^{-1}$  (●).  
 \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$  en comparaison avec le groupe témoins;  $0,5 \text{ g.kg}^{-1}$  (○),  $1 \text{ g.kg}^{-1}$  (★) et  $3 \text{ g.kg}^{-1}$  (●).

d'oxydation de l'éthanol) (EC1.14.14.1 ou *substrate, reduced-flavoprotein: oxygen oxidoreductase*); catalase (EC1.11.1.6 ou *hydrogen-peroxide: hydrogen-peroxide oxidoreductase*); aldéhyde-déshydrogénase (EC1.2.1.3 ou *aldehyde: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase*), dans des proportions encore discutées [35,36]. L'acétaldéhyde, produit lors de la première étape, reste pratiquement indétectable dans les prélèvements sanguins, puisqu'il est très rapidement oxydé en acétate libre [15]. Ces acétates sont éliminés du foie par la veine sus-hépatique puis distribués via la circulation artérielle vers les organes extra-hépatiques capables de les assimiler, en particulier les muscles squelettiques [16]. Ceci corrobore la différence artérioveineuse de concentration en acétates observée : le sang artériel plus concentré distribue les acétates aux différents tissus qui les utilisent, le sang veineux est donc moins concentré. Seule une ponction de sang au niveau de la veine sus-hépatique aurait permis d'observer une concentration veineuse supérieure à la concentration artérielle.

À forte dose d'éthanol ( $3 \text{ g.kg}^{-1}$ ), les concentrations en acétates présentent un plateau traduisant une saturation des mécanismes enzymatiques de production (métabolisme de l'éthanol et de l'acétaldéhyde) [37, 38] et/ou d'élimination (métabolisme de l'acétate). Une action inhibitrice de l'éthanol sur l'alcool-déshydrogénase soit directe, soit par l'intermédiaire de son premier métabolite, l'acétaldéhyde,

a été rapportée [37, 39–41]. Cependant la vitesse d'élimination de l'éthanol ne semble pas corrélée aux concentrations d'acétaldéhyde [42] et la consommation des cofacteurs enzymatiques ne semblent pas, non plus, limiter le métabolisme de l'éthanol [37]. Plus récemment, l'hypothèse que l'alcool déshydrogénase puis l'aldéhyde déshydrogénase puissent limiter le métabolisme de l'éthanol a été avancée [38].

Les systèmes enzymatiques du métabolisme de l'éthanol et de ses métabolites pourraient être aussi influencés par la température corporelle [43–47]. Ainsi, dans notre étude (données non reproduites), les animaux recevant  $3 \text{ g.kg}^{-1}$  ont présenté une hypothermie plus marquée et significativement différente de celle des autres groupes. Or, certains auteurs ont incriminé les conséquences de l'hypothermie induite par l'éthanol dans la réduction de la vitesse d'élimination de celui-ci. MacGregor et coll. expliquent cette baisse du métabolisme par une réduction de la perfusion hépatique et du volume de distribution, conséquences de l'hypothermie [48]. Larsen et Krarup rapportent une modification de la perfusion intrahépatique et une baisse de l'excrétion biliaire provoquée par l'hypothermie. Ces modifications réduiraient les capacités fonctionnelles du foie et affecteraient ainsi l'élimination de l'éthanol [49,50]. Romm et Collins ont observé une baisse de l'élimination de l'éthanol chez la souris après avoir induit une hypothermie au phéno-barbital ou au di-isopropylfluorophosphate (un inhibiteur



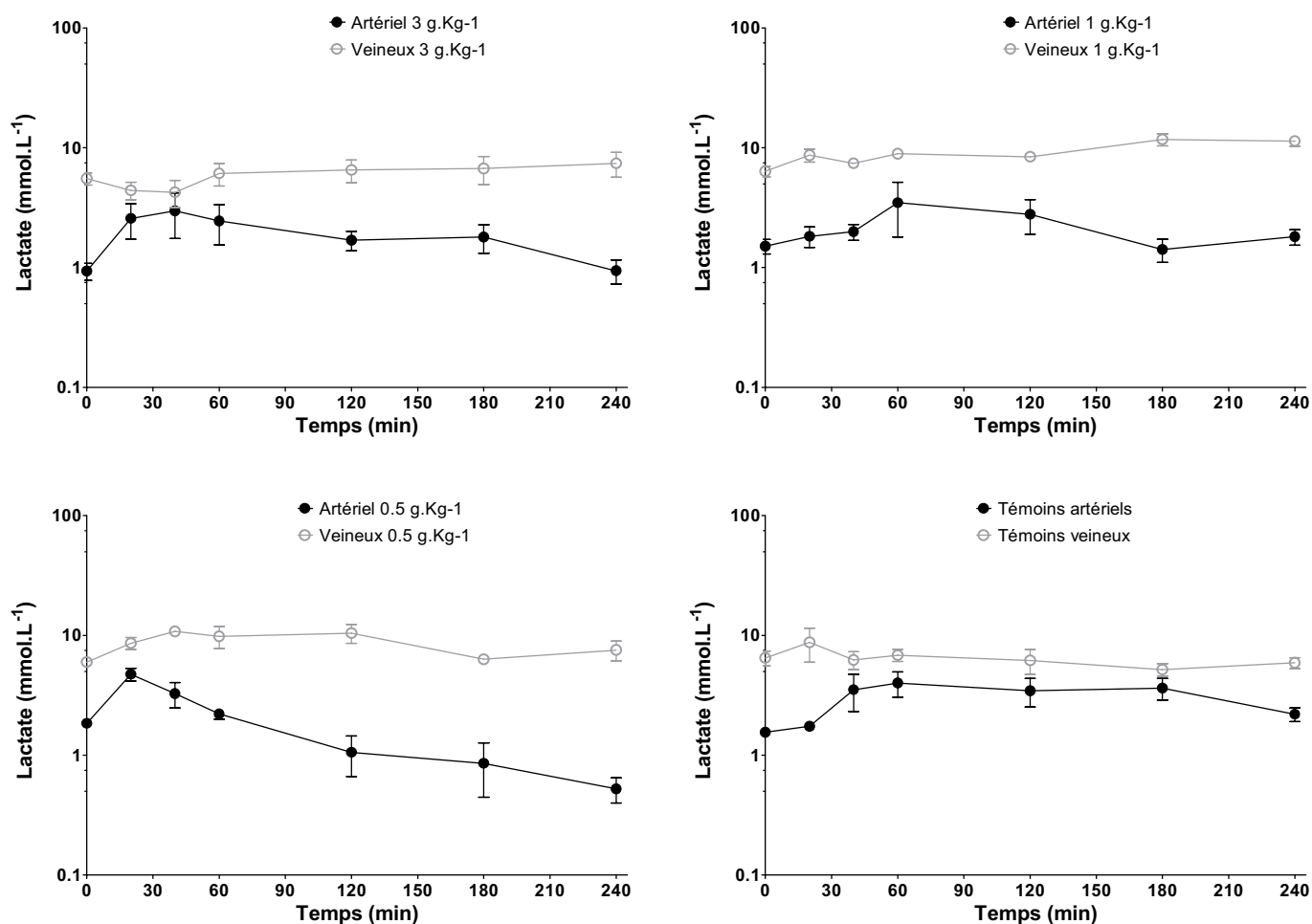
**Fig. 4.** Cinétiques sanguines artérielles (●) et veineuses (○) de l'acétate après administration de chlorure de sodium (témoins) ou de 0,5, 1 et 3 g.kg<sup>-1</sup> d'éthanol par voie IP chez des rats mâles Sprague-Dawley distincts, les cinétiques artérielles, *n* = 5, ayant été obtenues avec d'autres individus que les cinétiques veineuses, *n* = 3.

\* *p* < 0,05; \*\* *p* < 0,01 et \*\*\* *p* < 0,001.

irréversible des acétylcholinestérases) mais ces hypothermies sont moins efficaces que celle induite par l'éthanol. Cette observation est en faveur de la coexistence d'autres facteurs éthanol-dépendants : comme la modification de la perfusion sanguine de certains organes ou une inhibition du métabolisme [45]. Koren et coll. ont noté une réduction du volume de distribution et de la vitesse d'élimination de l'éthanol chez le porcelet et expliquent ces modifications par les conséquences de l'hypothermie : réduction du flux sanguin, séquestration d'eau dans les capillaires, diminution de la consommation en oxygène [46]. Enfin, Bejanian et coll. ont confirmé la réduction de la vitesse d'élimination de l'éthanol chez la souris et montré des différences de répartition de l'alcool entre le sang et le cerveau en fonction de l'intensité de l'hypothermie, ce qui corrobore la variation de perfusion des organes selon la température [47]. Lors d'une hypothermie, le sang est redistribué depuis le tube digestif, les extrémités, le foie et les reins vers les coronaires et le cerveau, le volume de sang éjecté par le cœur est réduit et l'eau est séquestrée. Toutes ces modifications contribuent à une réduction du volume intravasculaire de distribution [51]. Enfin, pour Mortensen et Dale qui ont travaillé directement sur le tissu hépatique, la température a une

influence directe sur plusieurs systèmes enzymatiques dont l'alcool déshydrogénase [52]. Si les autres auteurs ne l'ont jamais tout à fait exclu, la part relative de cet effet leur semble plus faible que celui des variations circulatoires.

Les concentrations basales en lactates retrouvées dans le sérum artériel (1,5 mmol.L<sup>-1</sup>) sont équivalentes à celles (1,1 mmol.L<sup>-1</sup>) rapportées chez des rats nourris [53]. Lors de notre étude, aucune variation significative des lactates artériels, à l'exception du groupe à 0,5 g.kg<sup>-1</sup> à 20 min, n'a été observée. Cette augmentation isolée à faible dose est surprenante mais l'hypothèse d'une action biphasique du métabolisme de l'éthanol sur la synthèse ou la libération des lactates peut être émise, avec augmentation de ceux-ci à faible dose et inhibition à plus fortes doses. En effet, selon certains auteurs, les variations de lactatémie observées après alcoolisation seraient indirectement dues au métabolisme de l'éthanol qui perturbe l'équilibre des cofacteurs enzymatiques NAD<sup>+</sup>/NADH, H<sup>+</sup> [15, 54-56]. Cette modification a des conséquences sur le cycle de Krebs [57], sur la glycolyse [54, 58], sur la néoglucogenèse hépatique à partir des lactates [54, 57, 59, 60] et sur la cétogenèse [61]. Les variations de lactatémie pourraient aussi être dues à des modifications



**Fig. 5.** Cinétiques sanguines artérielles (●) et veineuses (○) du lactate après administration de chlorure de sodium (témoins) ou de 0,5, 1 et 3 g.kg<sup>-1</sup> d'éthanol par voie IP chez des rats mâles Sprague-Dawley distincts, les cinétiques artérielles,  $n = 5$ , ayant été obtenues avec d'autres individus que les cinétiques veineuses,  $n = 3$ .

d'incorporation et d'utilisation des lactates lors du métabolisme de l'éthanol [16, 62, 63], auxquelles l'acétate pourrait participer [64]. Mais l'influence du métabolisme de l'éthanol sur les concentrations sanguines des lactates est encore discutée. Dans certaines études ou cas cliniques, la concentration est augmentée [10, 11, 14–17], ou se maintenait [65–67] ou encore baissait [58, 59]. Pour ces derniers auteurs, l'augmentation de la lactatémie après absorption d'éthanol pourrait être la conséquence de pathologies associées, d'un jeûne ou de la présence d'un autre toxique [65, 67].

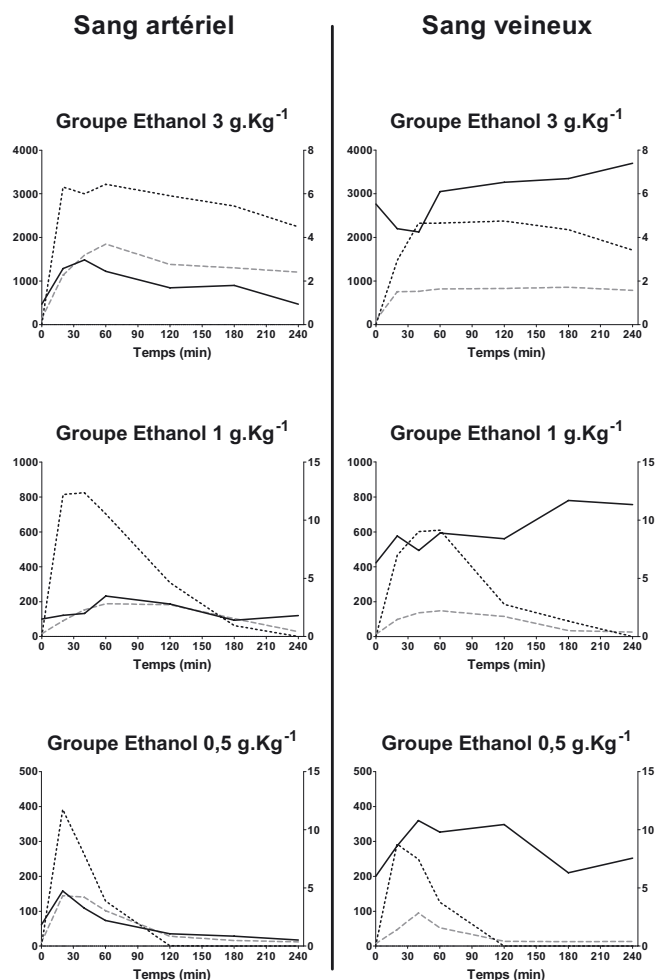
En revanche, les concentrations basales élevées des lactates veineux (6,1 mmol.L<sup>-1</sup>) dans tous les groupes, alors qu'aucune hémolyse n'a été décelée, et leur évolution cinétique ne semblent pas liées à l'administration d'éthanol. À l'exception du site de prélèvement, les conditions expérimentales et le traitement des échantillons sont identiques pour les deux protocoles et ne peuvent expliquer la différence, de près de 5 mmol.L<sup>-1</sup>. De telles lactatémies veineuses ont précédemment été rapportées chez des rats Wistar lors d'exercices physiques intenses [68, 69] or, dans notre étude, tous les animaux ont été placés en boîte de contention et leurs mouvements sont très réduits, seule la queue est libre, de plus les

lactatémies artérielles n'ont pas présenté d'augmentation inexplicable. La queue des rats, qui est un organe essentiellement osseux et tendineux et participe à la thermorégulation, a un débit sanguin variant en fonction de la température. Pour autant, une augmentation des concentrations liée à la réduction du flux sanguin, conséquemment à l'hypothermie, aurait provoqué un accroissement similaire des concentrations veineuses en éthanol et en acétate, ce qui n'a pas été observé. Seul le mode de prélèvement veineux de notre étude se distingue de celles pratiquées précédemment [68, 69], puisque nous ne pratiquons pas de saignée mais plaçons un cathéter court dans l'une des veines caudales latérales. Plusieurs hypothèses peuvent alors être émises. Soit l'emploi d'un cathéter, soit le réchauffement ou le massage de la queue, parfois nécessaires au recueil de sang, ont déclenché une libération locale de lactate.

## 5 Conclusion

L'étude rapportée nous rappelle que les conditions de prélèvement sanguin peuvent avoir d'importantes conséquences





**Fig. 6.** Profils cinétiques artériels et veineux de l'éthanol sanguin (pointillé noir, échelle de gauche), des acétates plasmatiques (tiret gris, échelle de droite) et des lactates plasmatiques (ligne continue, échelle de droite) après administration de 0,5, 1 et 3 g.kg<sup>-1</sup> d'éthanol par voie IP chez des rats mâles Sprague-Dawley distincts, axe vertical gauche éthanolémie en mg.L<sup>-1</sup>, axe vertical droit concentration en lactates ou acétates en mmol.L<sup>-1</sup>.

sur le résultat et son interprétation. Ainsi, dans le cas de l'éthanol et en raison de l'existence d'une différence artérioveineuse de concentrations, les prélèvements veineux peuvent, en fonction du site de prélèvement ou du délai de prélèvement, ne pas refléter l'imprégnation alcoolique ou l'activité enzymatique réelle. Certains sites, comme la veine caudale, interdisent même l'étude des lactates veineux chez le rat mâle Sprague-Dawley.

La différence artérioveineuse de concentration n'est pas propre à l'éthanol. D'autres substances en présentent une, le gradient de concentration pouvant être inversé et les mécanismes à l'origine différents. Dans la mesure du possible, il convient de s'assurer de la bonne corrélation entre les concentrations artérielles et veineuses d'une substance avant de proposer son étude ou son suivi par des dosages de sang veineux, surtout si les mécanismes impliqués peuvent présenter une variation individuelle importante.

## Références

1. Chiou WL. The phenomenon and rationale of marked dependence of drug concentration on blood sampling site. Implications in pharmacokinetics, pharmacodynamics, toxicology and therapeutics (Part I). *Clin Pharmacokinet.* 1989; 17(3): 175–199.
2. Chiou WL. The phenomenon and rationale of marked dependence of drug concentration on blood sampling site. Implications in pharmacokinetics, pharmacodynamics, toxicology and therapeutics (Part II). *Clin Pharmacokinet.* 1989; 17(4): 275–290.
3. Mather LE. Anatomical-physiological approaches in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet.* 2001; 40(10): 707–722.
4. Wilkinson PK, Rheingold JL. Arterial-venous blood alcohol concentration gradients. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1981; 9(3): 279–307.
5. Martin E, Moll W, Schmid P, Dettli L. The pharmacokinetics of alcohol in human breath, venous and arterial blood after oral ingestion. *Eur J Clin Pharmacol.* 1984; 26(5): 619–626.
6. Jones AW, Lindberg L, Olsson SG. Magnitude and time-course of arterio-venous differences in blood-alcohol concentration in healthy men. *Clin Pharmacokinet.* 2004; 43(15): 1157–1166.
7. Jones AW, Norberg A, Hahn RG. Concentration-time profiles of ethanol in arterial and venous blood and end-expired breath during and after intravenous infusion. *J Forensic Sci.* 1997; 42(6): 1088–1094.
8. Jones AW. Pharmacokinetics of ethanol in saliva: comparison with blood and breath alcohol profiles, subjective feelings of intoxication, and diminished performance. *Clin Chem.* 1993; 39(9): 1837–1844.
9. Jones AW, Jonsson KA, Jorfeldt L. Differences between capillary and venous blood-alcohol concentrations as a function of time after drinking, with emphasis on sampling variations in left vs. right arm. *Clin Chem.* 1989; 35(3): 400–404.
10. Juhlin-Dannfelt A. Ethanol effects of substrate utilization by the human brain. *Scand J Clin Lab Invest.* 1977; 37(5): 443–449.
11. Lundquist F, Sestoft L, Damgaard SE, Clausen JP, Trap-Jensen J. Utilization of acetate in the human forearm during exercise after ethanol ingestion. *J Clin Invest.* 1973; 52(12): 3231–3235.
12. Ræihæ N, Maeniaeae P. The influence of ethanol on the acid-base balance of the blood in man and rat. *Scand J Clin Lab Invest.* 1964; 16: 267–272.
13. Forsander OA, Raiha NC. Metabolites produced in the liver during alcohol oxidation. *J Biol Chem.* 1960; 235: 34–36.
14. Lien D, Mader TJ. Survival from profound alcohol-related lactic acidosis. *J Emerg Med.* 1999; 17(5): 841–846.
15. Sarkola T, Iles MR, Kohlenberg-Mueller K, Eriksson CJ. Ethanol, acetaldehyde, acetate, and lactate levels after alcohol intake in white men and women: effect of 4-methylpyrazole. *Alcohol Clin Exp Res.* 2002; 26(2): 239–245.
16. Lundquist F, Tygstrup N, Winkler K, Mellemgard K, Munck-Petersen S. Ethanol metabolism and production of free acetate in the human liver. *J Clin Invest.* 1962; 41: 955–961.
17. Lieber CS. Interference of ethanol in hepatic cellular metabolism. *Ann N.Y. Acad Sci.* 1975; 252: 24–50.
18. Chevillard L, Megarbane B, Baud FJ, Risede P, Declèves X, Mager D, Milan N, Ricordel I. Mechanisms of respiratory insufficiency induced by methadone overdose in rats. *Addict Biol.* 2010; 15(1): 62–80.

19. Villa AF, Houze P, Monier C, Risede P, Sarhan H, Borron SW, Megarbane B, Garnier R, Baud FJ. Toxic doses of paraoxon alter the respiratory pattern without causing respiratory failure in rats. *Toxicology*. 2007; 232(1-2): 37–49.
20. Pirnay SO, Megarbane B, Borron SW, Risede P, Monier C, Ricordel I, Baud FJ. Effects of various combinations of benzodiazepines with buprenorphine on arterial blood gases in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008; 103(3): 228–239.
21. Chevillard L, Megarbane B, Risede P, Baud FJ. Characteristics and comparative severity of respiratory response to toxic doses of fentanyl, methadone, morphine, and buprenorphine in rats. *Toxicol Lett*. 2009; 191(2-3): 327–340.
22. Duarte T, Martin C, Baud FJ, Laprevote O, Houze P. Follow up studies on the respiratory pattern and total cholinesterase activities in dichlorvos-poisoned rats. *Toxicol Lett*. 2012; 213(2): 142–150.
23. Silveri MM, Spear LP. Ontogeny of ethanol elimination and ethanol-induced hypothermia. *Alcohol*. 2000; 20(1): 45–53.
24. Huttunen P, Sampi M, Myllyla R. Ethanol-induced hypothermia and thermogenesis of brown adipose tissue in the rat. *Alcohol*. 1998; 15(4): 315–318.
25. Ristuccia RC, Spear LP. Autonomic responses to ethanol in adolescent and adult rats: a dose-response analysis. *Alcohol*. 2008; 42(8): 623–629.
26. Payne JP, Hill DW, King NW. Observations on the distribution of alcohol in blood, breath, and urine. *Br Med J*. 1966; 1(5481): 196–202.
27. Smith ME, Newman HW. The rate of ethanol metabolism in fed and fasting animals. *J Biol Chem*. 1959; 234(6): 1544–1549.
28. Rofael HZ, Abdel-Rahman MS. The role of ketamine on plasma cocaine pharmacokinetics in rat. *Toxicol Lett*. 2002; 129(1-2): 167–176.
29. Document consulté sur le site <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELPRDC5067085> le 26 juillet 2012.
30. Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, van de Vorstenbosch C. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol*. 2001; 21(1): 15–23.
31. Document consulté sur le site <http://www.cofrac.fr/annexes/sect6/8-2527.pdf> le 4 février 2012.
32. Kalant H. Pharmacokinetics of ethanol: absorption, distribution, and elimination. In: Begleiter H, Kissin B (eds.). *The pharmacology of alcohol and alcohol dependence*. Oxford: Oxford University Press 1996: 15–58.
33. Cunningham JJ, Molnar JA, Meara PA, Bode HH. *In vivo* total body electrical conductivity following perturbations of body fluid compartments in rats. *Metabolism*. 1986; 35(6): 572–575.
34. Jacobsen E. The metabolism of ethyl alcohol. *Pharmacol Rev*. 1952; 4(2): 107–135.
35. Mezey E. Ethanol metabolism and ethanol-drug interactions. *Biochem Pharmacol*. 1976; 25(8): 869–875.
36. Matsumoto H, Fukui Y. Pharmacokinetics of ethanol: a review of the methodology. *Addict Biol*. 2002; 7(1): 5–14.
37. Braggins TJ, Crow KE. The effects of high ethanol doses on rates of ethanol oxidation in rats. A reassessment of factors controlling rates of ethanol oxidation in vivo. *Eur J Biochem*. 1981; 119(3): 633–640.
38. Page RA, Kitson KE, Hardman MJ. The importance of alcohol dehydrogenase in regulation of ethanol metabolism in rat liver cells. *Biochem J*. 1991; 278(Pt 3): 659–665.
39. Zahlten RN, Jacobson CJ, Neijtek ME. Underestimation of alcohol dehydrogenase as a result of various technical pitfalls of the enzyme assay. *Biochem Pharmacol*. 1980; 29(13): 1973–1976.
40. Crabb DW, Yount EA, Harris RA. The metabolic effects of dichloroacetate. *Metabolism*. 1981; 30(10): 1024–1039.
41. Sharkawi M. *In vivo* inhibition of liver alcohol dehydrogenase by ethanol administration. *Life Sci*. 1984; 35(23): 2353–2357.
42. Inoue K, Fukunaga M, Kiriyama T, Komura S. Accumulation of acetaldehyde in alcohol-sensitive Japanese: relation to ethanol and acetaldehyde oxidizing capacity. *Alcohol Clin Exp Res*. 1984; 8(3): 319–322.
43. Ferko AP, Bobyock E. Physical dependence on ethanol: rate of ethanol clearance from the blood and effect of ethanol on body temperature in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1978; 46(1): 235–248.
44. Ferko AP, Bobyock E. Rates of ethanol disappearance from blood and hypothermia following acute and prolonged ethanol inhalation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1979; 50(3): 417–427.
45. Romm E, Collins AC. Body temperature influences on ethanol elimination rate. *Alcohol*. 1987; 4(3): 189–198.
46. Koren G, Barker C, Bohn D, Kent G, McGuigan M, Biggar D. Effect of hypothermia on the pharmacokinetics of ethanol in piglets. *Ann Emerg Med*. 1989; 18(2): 118–121.
47. Bejanian M, Finn DA, Syapin PJ, Alkana RL. Body temperature and ethanol pharmacokinetics in temperature-challenged mice. *Alcohol*. 1990; 7(4): 331–337.
48. MacGregor DC, Schoenbaum E, Bigelow WG. Effects of hypothermia on disappearance of ethanol from arterial blood. *Am J Physiol*. 1965; 208: 1016–1020.
49. Larsen JA. The effect of cooling on liver function in cats. *Acta Physiol Scand*. 1971; 81(2): 197–207.
50. Krarup N, Larsen JA. The effect of slight hypothermia on liver function as measured by the elimination rate of ethanol, the hepatic uptake and excretion of indocyanine green and bile formation. *Acta Physiol Scand*. 1972; 84(3): 396–407.
51. van den Broek MP, Groenendaal F, Egberts AC, Rademaker CM. Effects of hypothermia on pharmacokinetics and pharmacodynamics: a systematic review of preclinical and clinical studies. *Clin Pharmacokinet*. 2010; 49(5): 277–294.
52. Mortensen B, Dale O. Effects of hypothermia on the elimination of ethanol, diazepam and oxazepam in rat liver slice incubations. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1995; 39(2): 199–204.
53. Cohen RD, Woods HF. *Clinical and biochemical aspects of lactic acidosis*. Oxford, London, Edinburgh, and Melbourne: Blackwell Scientific Publications, 1976.
54. Forney RB, Harger RN. *Toxicology of ethanol*. *Annu Rev Pharmacol*. 1969; 9: 379–392.
55. Forsander OA, Maenpaa PH, Salaspuro MP. Influence of ethanol on the lactate/pyruvate and beta-hydroxybutyrate/acetoacetate ratios in rat liver experiments. *Acta Chem Scand*. 1965; 19(7): 1770–1771.
56. Forsander OA. Influence of the metabolism of ethanol on the lactate/pyruvate ratio of rat-liver slices. *Biochem J*. 1966; 98(1): 244–247.
57. Lopez CH, Constantin J, Gimenes D, Suzuki-Kemmelmeier F, Bracht A. Heterogenic response of the liver parenchyma to ethanol studied in the bivascularly perfused rat liver. *Mol Cell Biochem*. 2004; 258(1-2): 155–162.
58. Masson S, Desmoulin F, Sciaky M, Cozzone PJ. The effects of ethanol concentration on glycerol-3-phosphate accumulation in the perfused rat liver. A reassessment of ethanol-induced inhibition of glycolysis using <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy and HPLC. *Eur J Biochem*. 1992; 205(1): 187–194.

59. Nicholas PC, Kim D, Crews FT, Macdonald JM. <sup>1</sup>H NMR-based metabolomic analysis of liver, serum, and brain following ethanol administration in rats. *Chem Res Toxicol.* 2008; 21(2): 408–420.
60. Efthivoulou MA, Phillips JW, Berry MN. Abolition of the inhibitory effect of ethanol oxidation on gluconeogenesis from lactate by asparagine or low concentrations of ammonia. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1244(2-3): 303–310.
61. Lopez CH, Suzuki-Kemmelmeier F, Constantin J, Bracht A. Zonation of the action of ethanol on gluconeogenesis and ketogenesis studied in the bivascularly perfused rat liver. *Chem Biol Interact.* 2009; 177(2): 89–95.
62. Eiser AR. The effects of alcohol on renal function and excretion. *Alcohol Clin Exp Res.* 1987; 11(2): 127–138.
63. Kreisberg RA, Owen WC, Siegal AM. Ethanol-induced hyperlacticacidemia: inhibition of lactate utilization. *J Clin Invest.* 1971; 50(1): 166–174.
64. Topping DL, Snoswell AM, Storer GB, Fishlock RC, Trimble RP. Dependence on blood acetate concentration of the metabolic effects of ethanol in perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta.* 1984; 800(1): 103–105.
65. MacDonald L, Kruse JA, Levy DB, Marulendra S, Sweeny PJ. Lactic acidosis and acute ethanol intoxication. *Am J Emerg Med.* 1994; 12(1): 32–35.
66. Fulop M, Bock J, Ben-Ezra J, Antony M, Danzig J, Gage JS. Plasma lactate and 3-hydroxybutyrate levels in patients with acute ethanol intoxication. *Am J Med.* 1986; 80(2): 191–194.
67. Auzepy P, Boutron HF, Richard C, Riou B. [In France, is acute alcoholic intoxication in adults a metabolic emergency?]. *Rev Med Interne.* 1985; 6(4): 373–379.
68. Gobatto CA, de Mello MA, Sibuya CY, de Azevedo JR, dos Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001; 130(1): 21–27.
69. Manchado F de B, Gobatto CA, Voltarelli FA, Rostom de Mello MA. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2006; 31(6): 731–736.