

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

People's Democratic Republic of Algeria  
Ministry of Higher Education and Scientific Research  
University of M'Hamed Bougara-Boumerdes



**Faculté des Sciences**

**Département de biologie**

Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de

Master en sciences de la nature et de la vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie microbienne

**Thème**

---

**Facteurs pré-analytiques liés à la stabilité de la  
concentration d'éthanol pendant le stockage des  
échantillons d'alcoolémie ante-mortem**

---

Présenté par :

Melle BEDAIDA Sana & Melle BELKHIR Asma

**Devant le jury composé de :**

Mme. Yahiaoui Karima	Maitre de conférences à (UMBB)	Président
Mme. Kebbouche-Gana Salima	Professeur à (UMBB)	Encadreur
Mme. Bouanani	(INCC/GN)	Co-Encadreur
Mme. Khemili Talbi Souad	Maitre de conférences à (UMBB)	Examineur

**Année universitaire : 2019-2020**

# Dédicaces

Tout d'abord je tiens à remercier Dieu, le tout puissant, qui m'a donné la force, la volonté et la patience d'accomplir ce modeste travail que je tiens chaleureusement à le dédier :

## *A mes chers parents*

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagnera pour toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

Puisse Dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

## *A mon très cher frère Anis*

À mon cher petit frère, mon conseillé, mon ami fidèle les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour toi.

Merci pour l'aide que tu m'as apporté, tu m'as soutenu, réconforté et encouragé, je te suis très reconnaissante, et je ne te remercierai jamais assez.

En témoignage de mon affection fraternelle, je te dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur de santé et de réussite.

À *ma grand-mère*, qui m'a accompagné par ses prières, sa douceur, puisse Dieu lui prêter longue vie et beaucoup de santé et de bonheur.

À *la mémoire de mes très chers oncles Mustapha et Ahmed, ma grand-mère et mes grands-parents*, j'aurais tant aimé que vous soyez présents, que Dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde.

À *toi ma chère et adorable cousine Linda*, ma sœur de cœur, je te suis très reconnaissante, et je ne te remercierai jamais assez pour ton amabilité, ta générosité et ton aide précieuse.

À *mes chers oncles et tantes*, veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

A mon amie d'enfance et ma meilleure amie Zahida, ma sœur de cœur Sarah et mes chers amis Karim, Maïssa, Yasmine Amina et Chahinez.

*Un grand merci à ma binôme Sana*, ma partenaire de mémoire d'avoir eu le courage d'achever ce travail malgré tout ce qu'on a enduré, avec laquelle j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler, cette année fut riche en émotions et je tiens à te remercier pour ton soutien et ce lien tout particulier qui s'est créé entre nous.

À **toutes les personnes qui ont permis la réalisation de ce projet.**

*Asma Belkhir*

## Dédicaces

*À la mémoire de mon défunt père*, 6 ans que tu nous as quittés, mais tu es là, je te sens présent, que Dieu te garde dans mon cœur et dans ma mémoire à jamais. J'espère pouvoir te rendre fier de la personne que je suis devenue. Que Dieu nous réunisse un jour au paradis.

*À ma très chère mère*, Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu as su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances, tu n'as pas cessé de m'encourager durant toutes mes années d'études en me prodiguant de tes précieux conseils, j'espère pouvoir te rendre une petite partie de ton amour car tu es la personne la plus chère du monde.

*À ma sœur jumelle Abir*, a tous les moments d'enfance passés avec toi, en gage de ma profonde estime pour l'aide que tu m'as apporté. Tu m'as soutenu, réconforté et encouragé, puis nos liens se consolider et se pérenniser encore.

*Aux meilleurs frères du monde : Zaki, Billel, Amine et Imad* vous m'avez épaulé et accompagné, votre soutien est toujours précieux.

*À mes belles sœur Deborah, Amira et Katia*, pour leurs précieux encouragements et conseils. je vous aime infiniment.

*À mes neveux et mes nièces, Laith, Leila, Darine et Ismail* votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur, puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.

*À ma famille, mes oncles Said et Rabeh* particulièrement pour leur bienveillance et d'avoir toujours été présents à mes côtés.

*À mes meilleurs amis(es), Nabila, Meriem, Rahim et Nour* pour leur soutien permanent, leur aide et pour tous les beaux moments passés ensemble, continuons dans la voie de la consolidation de nos liens d'amitié. Bonne chance à nous tous.

*À ma binôme Asma*, pour ta résistance à toute épreuve et ton soutien moral, je ne saurais jamais t'exprimer mes sincères et profondes reconnaissances pour ta présence à mes côtés et ton aide, ainsi qu'à ta famille.

## ***Remerciements***

Ce mémoire s'appuie sur les travaux réalisés au sein de l'Institut National de Criminalistique et de Criminologie, il n'aurait pas été possible sans l'intervention, consciente, d'un grand nombre de personnes, nous souhaitons ici les remercier.

Nous tenons d'abord à remercier très chaleureusement notre encadrante « **Pr. KEBBOUCHE-GANA S** » qui a bien voulu diriger nos recherches. Merci pour votre permanente disponibilité, vos orientations et conseils et surtout votre patience tout au long du chemin. C'était un réel plaisir d'avoir travaillé avec vous.

Nous adressons aussi nos cordiaux remerciements à notre co-encadrante « **Dr. BOUANANI** » pour son attention, sa contribution, ses conseils avisés et sa précieuse aide. Merci de nous avoir fait partager vos brillantes intuitions, votre énergie, qui ont été des éléments moteurs pour nous lors de la réalisation de ce mémoire.

Nos remerciements les plus vifs vont également à tous le cadre de l'Institut National de Criminalistique et de Criminologie de la Gendarmerie Nationale (INCC/GN) et à toute l'équipe du département de toxicologie pour leur accueil, leur respect et leur gentillesse, ainsi que le fait de nous avoir guidé et appris beaucoup de choses dans ce domaine de la criminalistique.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous nos enseignants du département de biologie qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Enfin, nos remerciements les plus sincères vont à la présidente du jury « **Mme. Yahiaoui Karima** » ainsi qu'aux membres de jury « **Pr. Kebbouche-Gana Salima** » « **Mme. Khemili Talbi Souad** » « **Dr. Bouanani** » qui ont accepté de bien vouloir évaluer notre travail et nous honorer par leur présence à notre soutenance.

## 1. Sommaire

---

Dédicaces.....	ii
Dédicaces.....	iii
<i>Remerciements</i> .....	iv
Liste des figures : .....	viii
Liste des tableaux : .....	ix
Liste des abréviations : .....	x
Introduction.....	1
Chapitre I : Généralités.....	4
<b>1. Présentation de l'organisme d'accueil (INCC/GN) :</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1 Vocation et mission de l'INCC/GN :</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2 La direction générale de l'INCC/GC :</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3 La médecine légale :</b> .....	<b>5</b>
1.3.1 Domaines de la médecine légale : .....	6
1.3.2 Principales branches de la médecine légale : .....	6
<b>1.4 Le sang :</b> .....	<b>6</b>
1.4.1 Caractères généraux du sang : .....	6
<b>1.5 Prélèvements post mortem :</b> .....	<b>7</b>
1.5.1 Le sang : .....	7
<b>1.6 Prélèvement biologique chez le vivant :</b> .....	<b>9</b>
1.6.1 Prélèvements dans un contexte de sécurité routière : .....	9
<b>1.7 Ethanol :</b> .....	<b>13</b>
1.7.1 Définition : .....	13
1.7.2 Propriétés physico-chimiques : .....	13
<b>1.8 La fermentation :</b> .....	<b>13</b>
1.8.1 Types de fermentations : .....	14
1.8.2 Fermentations chez l'homme : .....	15
<b>1.9 Ethanol produit post-mortem :</b> .....	<b>15</b>
<b>1.10 Dosage de l'alcool :</b> .....	<b>15</b>
1.10.1 Définition de l'alcoolémie : .....	15
1.10.2 Dosage de l'éthanol dans le sang total : .....	16

<b>1.11</b>	<b>Les différents types d'erreurs pré-analytiques du dosage de l'éthanol :</b>	<b>17</b>
1.11.1	Les erreurs d'identification sur les personnes et les échantillons :	17
1.11.2	La désinfection à l'alcool sur le site de prélèvement :	17
1.11.3	Par formation d'un caillot de sang dans le flacon :	18
1.11.4	Par diffusion passive d'éthanol post-mortem :	18
1.11.5	Par oxydation lente in vitro de l'éthanol :	18
1.11.6	Par évaporation de l'éthanol par un flaconnage mal fermé :	18
1.11.7	Par production et/ou dégradation d'éthanol par un processus microbologique :	19
<b>Chapitre II : Matériel et méthodes</b>		<b>22</b>
<b>1.</b>	<b>Matériel</b>	<b>22</b>
1.1	Réactifs /produits chimiques :	22
1.2	Gaz	22
1.3	Solutions :	23
1.4	contrôles qualités Externes :	23
1.5	Matériel / appareils / Equipement :	23
1.5.1	Support :	23
1.6	Matériels biologiques :	28
1.6.1	Echantillon de sang :	28
<b>2.</b>	<b>Méthodes</b>	<b>28</b>
2.1	Préparation de la Solution Saline (Ss) :	28
2.2	Préparation Solution mère d'éthanol (S1) :	29
2.3	Préparation de la Solution mère de 1- Propanol (étalon interne) (S2) :	29
2.4	Préparation et analyse de la gamme de calibrage	29
2.5	Préparation des contrôles qualités Externes (QC-EXT-1 et QC-EXT-2) :	30
2.6	Contrôle microbiologique des tubes de prélèvement « isolement et dénombrement des levures et champignons » :	30
2.7	Contrôle et vérification des échantillons de sang :	33
2.8	Recherche du volume nécessaire a surchargé pour un volume de 4 ml d'échantillon de sang :	33
2.9	Préparation des échantillons de sang	34
2.10	Dosage de l'éthanol par chromatographie en phase gazeuse :	37
2.11	Principe de la chromatographie en phase gazeuse :	40
2.12	Prétraitement des échantillons pour l'analyse	41
2.12.1	Préparation du blanc :	41
2.12.2	Prétraitement des échantillons à analyser :	41

2.12.3	Prétraitement des échantillons à diluer : .....	42
2.12.4	Analyse chromatographique .....	42
<b>Chapitre III : Résultats et Discussions.....</b>		<b>43</b>
<b>3.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>43</b>
3.1	Résultats de la première chromatographie lancée (Jr1).....	43
3.2	Résultats de la deuxième chromatographie lancée (Jr3) :.....	45
3.3	Résultats de la troisième, quatrième et cinquième chromatographie lancée (Jr7), (Jr10) et (Jr14).....	48
<b>4.</b>	<b>Discussion Générale.....</b>	<b>55</b>
4.1	Études des échantillons de sang dans des conditions de stockages différentes : ....	55
4.1.1	Température ambiante à 22 °C avec K3 EDTA .....	58
4.1.2	Réfrigération à 5 °C avec K3 EDTA .....	59
4.1.3	Température ambiante à 22 °C avec fluorure oxalate.....	59
4.1.4	Réfrigération à 5 °C avec fluorure oxalate .....	60
4.1.5	Température ambiante à 22 °C avec EDTA Sodium Fluoride .....	60
4.1.6	Réfrigération à 5 °C avec EDTA Sodium Fluoride .....	60
4.1.7	Température ambiante à 22 °C avec Fluorure de Sodium et Oxalate de Potassium	60
4.1.8	Réfrigération à 5 °C avec Fluorure de Sodium et Oxalate de Potassium.....	61
<b>Conclusion Générale.....</b>		<b>62</b>
<b>Liste des références .....</b>		<b>64</b>
<b>Annexes .....</b>		<b>A</b>
<b>Résumé .....</b>		<b>M</b>

## Liste des figures :

<b>Figure 1</b> : préparation des échantillons de sang pour chaque type de tubes de prélèvement.....	35
<b>Figure 2</b> : Préparation des échantillons de sang surchargés.....	36
<b>Figure 3</b> : Protocole de recherche et dénombrement des levures et moisissures.....	32
<b>Figure 4</b> : Shema d'un chromatographe .....	37
<b>Figure 5</b> : Shema d'un injecteur .....	38
<b>Figure 6</b> : Schéma (en coupe) d'une colonne remplie (à gauche) et d'une colonne capillaire (à droite).....	39
<b>Figure 7</b> : Histogramme d'évaluation de la concentration d'éthanol du premier jour en fonction de la température et du conservateur .....	56
<b>Figure 8</b> : Histogramme d'évaluation de la concentration d'éthanol du troisième jour en fonction de la température et du conservateur .....	56
<b>Figure 9</b> : Histogramme d'évaluation de la conservation d'éthanol du septième jour en fonction de la température et du conservateur .....	57
<b>Figure 10</b> : Histogramme d'évaluation de la concentration d'éthanol du dixième jour en fonction de la température et du conservateur .....	57
<b>Figure 11</b> : Histogramme d'évaluation de la concentration d'éthanol du quatorzième jour en fonction de la température et du conservateur .....	58

## Liste des tableaux :

<b>Tableau 1</b> : Prélèvements chez le vivant.....	12
<b>Tableau 2</b> : fiche technique du tube Fluorure de Sodium et Oxalate de Potassium (Vacutest)...	24
<b>Tableau 3</b> : fiche technique du tube Fluorure Oxalate (Prommedi) .....	25
<b>Tableau 4</b> : fiche technique du tube EDTA/Sodium fluoride (Vacuette) .....	26
<b>Tableau 5</b> : fiche technique du tube K3 EDTA (Vacutest).....	27
<b>Tableau 6</b> : Gamme de calibrage .....	29
<b>Tableau 7</b> : Résultats de chromatographie (Jr1) .....	44
<b>Tableau 8</b> : Résultats de la chromatographie (Jr3) .....	46
<b>Tableau 9</b> : Résultats de la chromatographie (Jr7) .....	49
<b>Tableau 10</b> : Résultats de la chromatographie (Jr10) .....	50
<b>Tableau 11</b> : Résultats de la chromatographie (Jr14) .....	51

## Liste des abréviations :

**ADP** : Adénosine Diphosphate

**AT/MP** : Accident de Travail/Maladie Professionnelle

**ATP** : Adénosine Triphosphate

**AVP** : Accident de la Voie Publique

**COVID 19** : Corona Virus disease 2019

**CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse

**GC** : Gaz Chromatography

**GC/FID** : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme

**HPLC** : Chromatographie en phase liquide à haute performance

**INCC/GC** : Institut national de criminologie et de criminalistique de la Gendarmerie nationale

**ISO** : International Organization for Standardization

**ITT** : Incapacité Totale de Travail

**K3 EDTA** : éthylène diamine tetra-acétique tripotassique

**MGG** : May Grünwald Giemsa

**NaCl** : Chlorure de sodium

**NAF** : Fluorure de Sodium

**NAF + K<sub>2</sub>Ox** : Fluorure de Sodium et Oxalate de Potassium

**OGA** : Oxytetracycline Glucose Agar

**PE** : Polyéthylène

**PET** : Polytéraphthalate d'éthylène

**Pi** : Phosphate inorganique

**PP** : Polypropylène

**PPM** : Partie Par Million

**PTFE** : Polytétrafluoroéthylène

**QC-EXT-1** : Contrôle Qualité Externe 1

**QC-EXT-2** : Contrôle Qualité Externe 2

**RPM** : Rotation Par Minute

**SAL** : Sterility Assurance Level

**SST** : System Suitability Test

## Introduction

Récemment, le nombre croissant d'accidents de la route et de décès causés par des personnes qui conduisent sous l'influence de l'alcool a entraîné une augmentation du nombre de procédures médico-légales engagées pour établir la sobriété des accusés. Les résultats des déterminations de l'éthanol sanguin sont souvent le facteur décisif entre l'innocence et la culpabilité, ces valeurs doivent donc être exactes.

Le protocole standard exige qu'un phlébotomiste qualifié prélève du sang dans une veine antécubitale d'un conducteur dans les 2 heures suivant son arrestation. Le sang est prélevé directement dans un tube stérile sous vide contenant de l'oxalate de potassium comme anticoagulant et du sodium fluoride (NaF) comme inhibiteur<sup>1, 2</sup>. Le protocole prescrit que les échantillons doivent être conservés au frais pendant la période de transport vers le laboratoire, puis être stockés sous réfrigération à 5 °C jusqu'à l'analyse<sup>3</sup>. La concentration de sodium fluoride doit être supérieure à 1 % après le remplissage du tube avec le sang veineux, et cette concentration est systématiquement déterminée et signalée dans le rapport d'analyse de l'alcoolémie<sup>2</sup>.

La fiabilité des résultats des tests d'alcoolémie est remise en question par les équipes de la défense en raison des affirmations de la littérature selon lesquelles la concentration d'alcool peut augmenter avec le temps, comme le rapportent Chang et al. Et Blume et al. Sur le sang post-mortem. La pertinence des études utilisant le sang post-mortem pour tenter d'expliquer les changements des concentrations d'éthanol dans le sang ante-mortem est discutable. Dans l'étude présentée, le sang ante-mortem a été utilisé<sup>4, 5</sup>.

Cependant, on n'insiste guère sur le fait que la majorité des études trouvées dans la littérature utilisent soit du sang provenant d'une banque de sang, contenant du dextrose un substrat supplémentaire pour la croissance microbienne, soit du sang post-mortem, dont la biochimie du sang a changé<sup>6</sup>. Aucune de ces études ne simule adéquatement les échantillons de sang ante-mortem régulièrement obtenus pour l'analyse de l'alcoolémie. Néanmoins, les raisons des changements de la concentration d'alcool sont citées en littérature comme étant la contamination microbienne des échantillons de sang et l'oxydation non enzymatique. Les Contaminants microbiens possibles capables de produire de l'éthanol comprennent *Candida albicans*, *Proteus sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus sp*<sup>7</sup>.

La stabilité des concentrations d'alcool dans les échantillons de sang est d'une importance capitale. Si la concentration d'éthanol diminuait, cela ne serait que pour le benefit de l'accusé et la justice pourrait ne pas être rendue, tandis que si elle augmentait, ils pourraient être poursuivis

injustement. Il est donc impératif, pour obtenir un résultat fiable et précis de l'alcoolémie, que la concentration d'éthanol reste inchangée du prélèvement à l'analyse<sup>8</sup>.

Le fluor agit comme un puissant inhibiteur de l'énolase, l'une des enzymes de la voie de la glycolyse, grâce à laquelle un micro-organisme comme *Candida albicans* peut convertir le glucose sanguin en éthanol de manière anaérobie. Il convient toutefois de noter que, selon la littérature, l'absence d'agent de conservation (NaF) dans les échantillons de sang contaminés entraîne une diminution plus rapide du taux de glucose dans le sang total, ce qui élimine le principal substrat de la fermentation éthanolique<sup>9</sup>.

Dans cette étude, une chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme a été utilisée pour obtenir des informations sur la stabilité de la concentration d'éthanol dans les échantillons de sang ante-mortem surchargés à des concentrations de 0,2g/l et 0,5g/l d'éthanol. En plus d'être conservés à température ambiante ou sous réfrigération, les échantillons contenaient quatre conservateurs différents. L'incertitude de mesure élargie de la méthode d'analyse a été utilisée pour évaluer la signification de tout changement de la concentration d'alcool dans le sang.

# Partie Théorique

## Chapitre I : Généralités

### 1. Présentation de l'organisme d'accueil (INCC/GN) :

#### 1.1 Vocation et mission de l'INCC/GN :

L'INCC/GN est un établissement public à caractère administratif, créé par le décret présidentiel du 26/06/2004. Il relève du ministère de la défense nationale et il est placé sous la tutelle de la gendarmerie nationale. Il a pour mission de servir la justice et de soutenir les unités d'investigation dans l'exercice de la police judiciaire, à ce titre il est chargé de :

- Réaliser des expertises et des examens scientifiques.
- Assurer une assistance scientifique aux investigations complexe.
- Participer aux études et analyses, relative à la présentation et à la réduction de toute forme de criminalité.
- Concevoir et réaliser des banques de donnée conformément à la loi y compris celle des empreintes génétiques
- Initier et mener des travaux de recherche ayant trait à la criminalité
- Concevoir, assurer le suivi et évaluer les recherches confiées à des tiers (consultant, expert, organisme institutionnels et académiques).
- Participer à l'organisation de cycles de perfectionnement et de formations post-graduées dans les spécialités des sciences criminelles.

#### 1.2 La direction générale de l'INCC/GC :

La direction générale de l'INCC est scindée en quatre parties :

- A. Service organisation et méthodes :** charger des prélèvements sous toutes leurs formes et de leurs mises sous scellés ainsi que de développer les relations extérieures.
- B. Service administration et moyens :** assure la gestion financière, gestion des ressources humaine et le soutien technique de l'institut.
- C. Direction des études et de la recherche criminologique :** effectue des recherches se rapportant au phénomène criminel et au fonctionnement des institutions chargées de la lutte contre la criminalité.
- D. Direction criminalistique :** Réalise des expertises et des examens scientifiques sur réquisition des magistrats, à la demande des enquêteurs et des autorités habilitées.

**D.1 Sous-direction de Toxicologie :** Se compose des départements suivants :

### **D.1.1 Département de toxicologie Médico-légale :**

Le département de toxicologie médico-légale a pour mission :

- Dépister et doser l'alcool dans les milieux biologique
- Dépister et doser les drogues en milieu biologique, concernant les cas de soumission chimique, dopage, toxicomanie ou conduite automobile.
- Analyser les échantillons biologiques pour la recherche, l'identification et la quantification de produits, médicaments ou autres, responsables de l'intoxication présumée d'une victime.
- Contrôler et détecter toute contamination à caractère microbiologique des produits alimentaires et l'eau de consommation.

Ce département regroupe six laboratoires :

**D.1.1.1 Département des drogues de saisie :** Il assure l'analyse de la matière brute pour la recherche ainsi que l'identification et la quantification des stupéfiants.

**D.1.1.2 Département de défense alimentaire :** Il a pour mission le contrôle et la détection de toute contamination à caractère microbiologique et chimiques des produits alimentaires et l'eau de consommation.

**D.1.1.3 Laboratoire d'alcool :** Le laboratoire d'alcool a pour but la recherche du pourcentage d'alcool dans le sang dans le cadre de la sécurité routière.

**D.1.1.4 Laboratoire de médicaments :** son principe est la recherche et l'identification des toxiques organique dans les milieux biologiques (les urines, sang total, liquide gastrique).

**D.1.1.5 Laboratoire de microbiologie :** Le laboratoire de microbiologie a pour but de détecter toute contamination microbienne dans les cas des intoxications alimentaire.

**D.1.1.6 Le laboratoire d'alcool et de stupéfiants :** il assure l'analyse et l'identification des différentes drogue dans les milieux biologique.

## **1.3 La médecine légale :**

La médecine légale est une discipline médicale particulière située à l'interface de la pensée juridique et de la pensée biologique sa vocation est de prêter son concours aux autorités chargées de l'application des textes législatifs ou réglementaires concernant des personnes ou la société. Contrairement à la plupart des disciplines qui sont une vocation de santé publique, la Médecine Légale n'a aucune vocation de soin, mais une vocation Judiciaire<sup>10</sup>.

### 1.3.1 Domaines de la médecine légale :

Le domaine de la médecine légale est double : elle est une science auxiliaire du droit qui a pour vocation de mettre au service judiciaire des informations médicales permettant d'apprécier des faits criminels ou délictueux et leurs auteurs publics<sup>10</sup>.

### 1.3.2 Principales branches de la médecine légale :

**Médecine légale thanatologique (ou pathologie médico-légale) :** Investigations médico-légales des morts suspectes, violentes, subites, inattendues. Détermination de la cause, du mécanisme du décès :

- Levée de corps : examen non-invasif du cadavre sur les lieux de sa découverte qui permet le plus souvent d'obtenir des données qui évitent de recourir à l'autopsie.
- Autopsie : examen invasif complet du corps<sup>10</sup>.

### Médecine légale Clinique :

- Dans le domaine pénal : constatation des violences physiques, psychiques et sexuelles, identification de l'auteur d'une infraction, détermination de l'âge, de l'aptitude à la détention, responsabilité pénale psychiatrique<sup>10</sup>.
- Dans le domaine civil : évaluation du dommage corporel (AVP, Accident de Travail/Maladie Professionnelle (AT/MP), accidents divers...), mise sous tutelle, expertise en responsabilité médicale. Le médecin légiste est requis par l'autorité judiciaire pour déterminer la durée de l'Incapacité Totale de Travail (ITT) au sens pénal du terme<sup>1</sup>.

## 1.4 Le sang :

### 1.4.1 Caractères généraux du sang :

Le sang est composé de cellules sanguines en suspension dans le plasma. L'ensemble est contenu dans les vaisseaux sanguins. Le volume total du sang d'un adulte humain est de 5 litres ( $\approx 8\%$  du poids de son corps). Les cellules en suspension représentent 45% du volume total, ce qui correspond à l'hématocrite. Leur morphologie peut être étudiée sur un frottis coloré au May Grünwald Giemsa (MGG). Il existe plusieurs types cellulaires<sup>10</sup>:

- **Les globules rouges ou hématies :** Les globules rouges sont des cellules anucléées dont le constituant essentiel est une hémoprotéine de liaison de l'oxygène : l'hémoglobine (environ 14,5 g / 100 ml). Le rôle principal de ces cellules est d'assurer le transport de l'oxygène et du gaz carbonique entre les alvéoles pulmonaires et les tissus.

- **Les globules blancs ou leucocytes :** Ces cellules participant aux défenses spécifiques de l'organisme se répartissent en : polynucléaires ou granulocytes, monocytes, lymphocytes,
- **Les plaquettes :** c'est des fragments cellulaires anucléés de 2 à 5 µm de diamètre, Elles jouent un rôle fondamental dans les phénomènes initiaux de coagulation.
- **Plasma :** Cette partie liquide du sang est composée de 90 % d'eau et de 10 % de substances "dissoutes" (éléments minéraux, protides, lipides, anticorps, hormones...). Le plasma est de couleur jaunâtre et sert au transport des substances nutritives, des hormones, des anticorps, des gaz dissous et à l'évacuation des déchets. Toute modification de la composition du plasma entraîne de graves troubles de la santé.

### 1.5 Prélèvements post mortem :

En post mortem, les prélèvements peuvent être effectués soit au décours d'une autopsie, soit lors d'une levée de corps, Dans ce dernier cas, le prélèvement sera limité le plus souvent à un prélèvement sanguin, au niveau périphérique si possible<sup>10</sup>.

Douze prélèvements doivent être systématiquement effectués à chaque autopsie lorsqu'ils sont disponibles, quelle que soit leur utilisation ultérieure<sup>12</sup>.

Ces douze prélèvements sont le sang périphérique et le sang cardiaque, les urines, le contenu gastrique, l'humeur vitrée, la bile, les viscères (et plus particulièrement le poumon, le foie, le rein, le cœur et le cerveau) et enfin les cheveux.

Le médecin légiste doit parfaitement identifier les différents prélèvements pour le toxicologue qui aura à les analyser le sang périphérique et le sang cardiaque n'ont pas la même utilité analytique. Malgré cela, il est totalement impossible de distinguer ces deux matrices dans un tube si elles n'ont pas été clairement identifiées lors du prélèvement<sup>12</sup>.

#### 1.5.1 Le sang :

De tous les prélèvements réalisés le sang est le milieu le plus important lors d'une autopsie. C'est le seul milieu pour lequel les données de la littérature permettent de déterminer le niveau d'imprégnation d'une personne à une substance au moment du décès<sup>12</sup>. On connaît en effet, pour les substances médicamenteuses, les concentrations sanguines dites thérapeutiques ou usuellement rencontrées lors de traitement chronique par ces molécules. Pour un très grand nombre de ces substances, on connaît également les concentrations sanguines toxiques, pour lesquelles vont apparaître les premiers signes de toxicité, voire les concentrations létales lorsque ces substances peuvent engendrer directement le décès<sup>12</sup>. De la même manière, pour les substances non médicamenteuses ou illicites, les concentrations sanguines toxiques ou létales sont le plus souvent connues. Le médecin légiste a la possibilité de prélever le sang au niveau de deux sites différents, soit au niveau cardiaque, soit en périphérie (extracardiaque).

## Généralités

---

En théorie, dans les deux cas, il s'agit de sang. Or ces deux matrices ont un intérêt très différent pour le toxicologue, et la méconnaissance de l'origine du sang peut amener le toxicologue à de graves erreurs d'interprétation sur les survenues d'un décès. Il est donc indispensable de correctement mentionner sur les prélèvements s'il s'agit de sang cardiaque ou de sang périphérique<sup>12</sup>.

### 1.5.1.1 Sang cardiaque :

C'est le sang le plus facile à prélever. Il est présent en grande quantité lorsque le cadavre est relativement frais, et devient difficile à prélever si l'autopsie est réalisée plus de 4 à 5 jours après le décès. Une quantité de 10 ml est suffisante pour l'analyse toxicologique. Son intérêt est qualitatif<sup>13</sup>. Il va servir au toxicologue pour effectuer les criblages, c'est-à-dire des recherches larges non spécifiques. Il ne doit pas être utilisé pour un résultat quantitatif car les résultats peuvent être rendus à tort en excès pour deux raisons :

- **la première**, la plus importante, est due au relargage *post mortem* des molécules à tropisme cardiaque ou à forte diffusion tissulaire. En effet, les molécules présentes à forte concentration dans la cellule myocardique vont, au fur et à mesure de la lyse cellulaire survenant en *post mortem*, libérer leur contenu dans le sang de la cavité cardiaque<sup>13</sup>. Ainsi, à moins d'effectuer le prélèvement intracardiaque dans les minutes qui suivent le décès, le sang cardiaque va progressivement s'enrichir en molécules contenues avant le décès dans les cellules myocardiques. La concentration sanguine au niveau cardiaque peut donc révéler des concentrations toxiques au moment de l'autopsie alors qu'au moment du décès, cette concentration pouvait être thérapeutique. Le toxicologue peut ainsi répondre à tort que la cause du décès est une intoxication à cette substance. Ce phénomène de relargage *post mortem* est particulièrement important pour les médicaments à fort tropisme cardiaque comme les antipaludéens, les Antidépresseurs<sup>13</sup>...

- **la seconde** est due à une redistribution *post mortem* depuis le contenu gastrique. En effet, lors de l'ingestion massive de substances, les concentrations observées dans le contenu gastrique sont très élevées par rapport à celles observées dans le sang. Du fait de la position horizontale des corps, les molécules à forte diffusion comme l'alcool peuvent migrer de la cavité digestive vers le cœur relativement proche et entraîner des concentrations sanguines cardiaques de plus en plus élevées au fur et à mesure que le délai *post mortem* augmente. Un moyen de limiter ce phénomène est de prélever le sang cardiaque à la seringue au niveau du cœur droit qui est moins contaminé que le cœur gauche. Une fois prélevé à la seringue, il est immédiatement transféré dans un pot en verre ou plastique sans coagulant ni conservateur et clairement étiqueté « sang cardiaque »<sup>13</sup>.

### 1.5.1.2 Sang périphérique :

Le sang le plus important à prélever. C'est le milieu qui permet de doser l'ensemble des molécules ayant pu entraîner le décès et de pouvoir interpréter le résultat sans risque d'erreur, le sang périphérique n'étant sujet ni au relargage *post mortem* des cellules cardiaques, ni à la diffusion *post mortem* depuis le contenu gastrique<sup>14</sup>.

Le prélèvement se fait au niveau des veines iliaque ou fémorale à la seringue. Le sang périphérique est souvent présent en plus faible quantité que le sang cardiaque. 10 ml sont suffisants, mais il n'est pas rare que la quantité disponible soit plus faible. Dans ce cas, il est conservé et utilisé exclusivement pour les dosages et non pour les criblages réalisés dans ce cas sur le sang cardiaque.

Une fois prélevé, le sang périphérique est réparti dans deux types de contenant : pour moitié dans un pot en verre ou plastique sans anticoagulant et conservateur (ou un tube sec sans gélose), et l'autre moitié dans un tube sans gélose contenant 0,1 % de fluorure de sodium (tube à bouchon gris en milieu hospitalier). Le sang prélevé sur tube à fluorure de sodium est utilisé pour un certain nombre de dosages dont la conservation nécessite cet inhibiteur enzymatique. Il s'agit du dosage de l'éthanol et des cyanures, sujet à une production bactérienne *in vitro*, et du dosage de la cocaïne<sup>14</sup>.

## 1.6 Prélèvement biologique chez le vivant :

Chez le vivant les prélèvements vont dépendre du contexte dans lequel la recherche toxicologique est demandée par le magistrat ou l'officier de police judiciaire.

### 1.6.1 Prélèvements dans un contexte de sécurité routière :

Quatre types de prélèvements peuvent être effectués dans ce contexte de sécurité routière : un prélèvement sanguin, un prélèvement urinaire, un prélèvement salivaire ou un prélèvement de cheveux<sup>14</sup>.

- a) **Prélèvement urinaire** : Lors d'un accident mortel ou corporel, mais également lors d'un accident matériel ou même uniquement sur réquisition d'un officier de police judiciaire. Les agents de police peuvent faire réaliser un prélèvement urinaire afin d'effectuer des épreuves de dépistage en vue d'établir si la personne conduisait en ayant fait usage de substances ou plantes classées comme stupéfiants. Ce prélèvement est réalisé par un médecin ou un biologiste<sup>14</sup>.

L'urine est prélevée dans un pot en plastique incassable et sans conservateur. Le prélèvement est conservé au réfrigérateur si le dépistage ne peut être réalisé dans les deux à trois heures qui suivent. Si le délai est supérieur à 24 heures, il est préférable de congeler les urines. Ce milieu biologique a l'avantage de contenir des concentrations importantes en métabolites. Or, les anticorps utilisés dans les recherches immunologiques sont dirigés contre les métabolites des différentes drogues (dérivés amphétaminiques, cannabis, cocaïne et héroïne). En revanche, l'élimination urinaire des métabolites est lente et le dépistage urinaire présente l'inconvénient de persister positifs plusieurs jours après une prise, ne permettant donc jamais de distinguer une prise récente d'une prise remontant à plusieurs jours<sup>14</sup>.

- b) **Prélèvement salivaire** : Ces prélèvements sont effectués dans les mêmes circonstances que les dépistages urinaires. Outre l'intérêt de pouvoir être réalisé sur le bord d'une route et non en milieu médical, ce prélèvement non invasif peut être effectué par les forces de l'ordre sous contrôle visuel pour éviter tout risque d'adultération. Il existe plusieurs manières de prélever la salive : cracher dans un récipient, badigeonner la cavité buccale avec un écouvillon (ou équivalent) ou après stimulation de la sécrétion par différents procédés<sup>14</sup>.

La salive est collectée avec un écouvillon ou un coton-tige inclus dans les kits de dépistage. Ce coton-tige est déchargé dans une solution tampon, dont quelques gouttes sont déposées sur un test de dépistage rapide de type immun-chromatographique. Le résultat ne peut être lu que plusieurs minutes plus tard. La salive comparée à l'urine contient plus de molécules mères et moins de métabolites et le dépistage salivaire présente l'avantage de ne rester positif que quelques heures après la dernière prise. Elle présente l'inconvénient d'être moins sensible en ce qui concerne le cannabis<sup>14</sup>.

- c) **Prélèvement sanguin** : En cas de positivité des tests de dépistage ou devant l'impossibilité de réaliser ces tests, un prélèvement de sang est réalisé pour confirmation et dosage par technique de référence (chromatographie couplée à la spectrométrie de masse). Deux tubes sous vide de 7 à 10 ml contenant de l'héparine de sodium sont prélevés. Le prélèvement est effectué par ponction veineuse. Les tubes sont théoriquement fournis par les forces de l'ordre<sup>14</sup>.

Il existe des kits spécifiques pour prélèvements réalisés chez un sujet vivant et d'autres pour sujets décédés (aiguille plus large et plus longue). Ces deux tubes doivent, en théorie, être complétés par deux tubes de 5 ml prélevés sur fluorure de sodium pour dosage de l'éthanol dans le sang si aucun dépistage sur l'air expiré n'a pu être réalisé, soit un total de quatre tubes. Deux de ces tubes sont destinés à la première analyse, les deux autres étant conservés au congélateur pour une éventuelle contre-expertise. Il peut arriver que seuls deux tubes soient prélevés, notamment chez les patients décédés

particulièrement difficiles à prélever. L'expert travaille alors sur un tube et prend le soin de garder le second pour la contre-expertise. Tous les tubes doivent être correctement étiquetés et placés dans les boîtes adéquates fournies avec les tubes afin de pouvoir être ensuite scellés. Ils sont acheminés rapidement vers un laboratoire spécialisé dans lequel exerce un expert judiciaire. Ils doivent être conservés au réfrigérateur avant l'analyse et au congélateur ensuite. La durée de conservation est de 9 mois pour les alcoolémies et d'un an pour les stupéfiants<sup>14</sup>.

- d) **Prélèvement capillaire** : Un sujet dont le permis de conduire a été suspendu pour conduite sous l'influence de stupéfiants ne peut en théorie en redispoper qu'après passage devant une commission. Le rôle de celle-ci est de vérifier que le sujet ne consomme plus de substances illicites depuis son retrait. Parfois, un dosage dans le sang, qui reflète les 24 heures précédentes, voire dans les urines, qui reflète quelques jours, est demandé par cette commission<sup>14</sup>. Cette analyse capillaire est faite afin de vérifier sur une période plus grande l'absence de consommation.

Tableau 1 : Prélèvements chez le vivant

Contexte	Prélèvements		Avantages/Inconvénients	conservation
<b>Sécurité routière</b>	Urine	10 ml dans flacon plastique sans conservateur	A : Fortes concentrations en métabolites qui sont souvent les substances recherchées en immunoanalyse I : Pas de distinction prise récente/prise ancienne ; peu pratique à réaliser sur bord de route	+ 4 °C si dépistage différé Congélation si délai > 24 h
	salive	Recueil par écouvillon badigeonné dans la cavité buccale	A : Facilité de dépistage ; présence des molécules mères ; plus spécifique d'une prise récente I : Moins sensible que les urines pour le THC	Le prélèvement salivaire est déposé sur les tests d'immunochimie dès son recueil
	sang	2 × 5 ml sur NaF 2 × 7 ou 2 × 10 ml sur tube héparinate de sodium	A : Alcoolémie : pas de production <i>in vitro</i> sur NaF Confirmation et dosage des stupéfiants : meilleure conservation des stupéfiants sur héparinate. I : Pas d'inconvénients.	Avant analyse : + 4 °C Après analyse : congélation Durée : 9 mois pour alcoolémie, 1 an pour les stupéfiants
	cheveux	1–2 mèches orientées prélevées en vertex postérieur	A : Pour la restitution du permis, permet de vérifier l'abstinence en stupéfiants sur plusieurs semaines. I : Pas d'inconvénients	Température ambiante

### 1.7 Ethanol :

Le terme alcool vient de l'arabe « al-kuhl » signifiant « antimoine pulvérisé », poudre appliquée sur les yeux. Le mot « alcohol » fut ensuite employé pour désigner une substance finement pulvérisée et raffinée, puis un composé volatil obtenu par distillation. Au fil du temps, « alcohol » perdit son « h » et son qualificatif. En langage usuel, le terme « alcool » est utilisé pour désigner une boisson produite par fermentation ou distillation. Il désigne également l'éthanol, substance psychoactive contenue dans ces boissons<sup>15</sup>.

#### 1.7.1 Définition :

L'éthanol est un liquide mobile, incolore, volatil, d'odeur plutôt agréable, décelable dès 84 ppm. L'éthanol est miscible à l'eau, le mélange se fait avec dégagement de chaleur et contraction du liquide : 1 vol d'éthanol + 1 vol d'eau donnent 1,92 vol de mélange. L'éthanol est également miscible à la plupart des solvants usuels. C'est un bon solvant des graisses et il dissout de nombreuses matières plastiques. Il peut être commercialisé sous forme anhydre (éthanol à 100 % en volume appelé aussi alcool absolu) ou à différentes concentrations dans l'eau, principalement à 95 % et, pour des usages antiseptiques, à 70 %.<sup>15,16</sup>

#### 1.7.2 Propriétés physico-chimiques :

L'éthanol ou alcool éthylique a été identifié au 19<sup>ème</sup> siècle. C'est un liquide, incolore, très mobile, volatil et inflammable, avec une odeur agréable caractéristique et une saveur brûlante. L'éthanol est un alcool primaire de formule brute  $C_2H_5OH$ <sup>15,16</sup>.

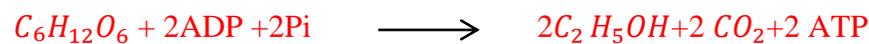
Etant une molécule polaire par sa fonction hydroxyle, l'éthanol est miscible à l'eau et à la plupart des solvants organiques. C'est également un solvant des graisses et des matières plastiques.

### 1.8 La fermentation :

La fermentation est un phénomène naturel, se produisant lors de la décomposition de la matière organique. C'est Pasteur, en 1857 qui établira que la fermentation alcoolique est due à l'activité métabolique de *Saccharomyces cerevisiae* (levure de bière). Il étudiera ensuite les fermentations acétique, butyrique et lactique, et démontrera que la fermentation est une réaction chimique et biologique, en cultivant les bactéries et levures mises en cause<sup>17</sup>.

### 1.8.1 Types de fermentations :

- a) **Fermentation alcoolique** : La fermentation alcoolique est un ensemble de réactions, effectuées par des microorganismes qui transforment les sucres dits « fermentescibles » en éthanol et anhydride carbonique et ce en anaérobie. L'équation globale de la réaction est la suivante <sup>18</sup> :



**Avec :**

$C_6H_{12}O_6$  : Hexose

$C_2H_5OH$  : éthanol

ADP : adénosine diphosphate

$CO_2$  : anhydride carbonique

Pi : phosphate inorganique

ATP : adénosine triphosphate

Les sucres fermentescibles sont le plus souvent des hexoses (glucose, fructose, mannose), le saccharose ou l'amidon après hydrolyse. Les microorganismes impliqués sont majoritairement des mycètes de la division *Ascomycota* tels que *Saccharomyces cerevisiae* (bière), *Saccharomyces ellipsoideus* (vinification), *Aspergillus*, *Penicillium* communément appelés levures et moisissures. En fonction de l'équipement enzymatique des microorganismes, les hexoses peuvent être métabolisés selon plusieurs voies pour aboutir au 3-phosphate glycéraldéhyde. Puis ce triose est transformé en acide pyruvique. Par décarboxylation, l'acide pyruvique est transformé en acétaldéhyde. Enfin l'acétaldéhyde est réduit en éthanol<sup>19</sup>. Le rendement de la fermentation alcoolique est de 95% dans les conditions normales, 5% des sucres étant transformés en produits divers.

- b) **Fermentations hétérolactiques** : Certaines bactéries des genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* dégradent les hexoses en dioxyde de carbone, éthanol et acide lactique, ainsi que les pentoses en éthanol et acide lactique<sup>20</sup>.
- c) **Fermentations mixtes** : Certaines bactéries anaérobies facultatives, comme *Escherichia coli*, dégradent le glucose en divers produits dont 16% d'éthanol <sup>11</sup>.
- d) **Fermentations butyriques** : Des bactéries du genre *Clostridium* (anaérobie stricte), tels que *Clostridium perfringens* et *Clostridium tetani*, dégradent l'amidon en divers<sup>20</sup>.

### 1.8.2 Fermentations chez l'homme :

#### Ethanol endogène :

L'éthanol endogène désigne l'éthanol produit par le corps selon deux principaux mécanismes. Il est produit spontanément à partir de l'acétaldéhyde au cours de divers processus métaboliques. L'éthanol peut également être synthétisé sous l'action de la flore intestinale par fermentation intra-intestinale des glucides. Ce phénomène est appelé syndrome d'auto-brasserie (auto-brewery syndrome). Le microorganisme le plus courant lors de cette fermentation est *Candida albicans*. Chez le sujet sain la concentration sanguine d'éthanol endogène est inférieure à 0.08 mg/dl (soit 0.0008 g.l-1), ce qui est sans importance et sans conséquence d'un point de vue médical<sup>21</sup>.

Des concentrations sanguines élevées d'éthanol endogène dues au syndrome d'auto-brasserie ont été décrites dans la littérature, chez des sujets présentant un métabolisme de l'éthanol lent, une pseudo-obstruction intestinale chronique associée à un traitement antibiotique<sup>12</sup> ou un syndrome de l'intestin court. Ces patients présentaient une forte colonisation intestinale par des levures et avaient consommé un repas riche en glucide auparavant<sup>21,22</sup>, facteurs favorisant la fermentation. De tels cas pathologiques sont cependant rares.

### 1.9 Ethanol produit post-mortem :

Lors de la putréfaction, les microorganismes du tube digestif prolifèrent rapidement et colonisent le système veineux portal et les vaisseaux lymphatiques puis tous les tissus et organes. De nombreuses bactéries et levures dont *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*... produisent de l'éthanol par fermentations, dont les divers types ont été évoqués précédemment. Dans des conditions favorables, la concentration d'éthanol ainsi produit peut atteindre 2 g.l-1<sup>23</sup>.

### 1.10 Dosage de l'alcool :

#### 1.10.1 Définition de l'alcoolémie :

L'alcoolémie représente le taux de l'alcool éthylique dans le sang. Elle s'exprime généralement en grammes par litre (ou en milligrammes par 100 ml ou en milli moles par litre de sang. Elle se mesure également, de façon indirecte, d'après la concentration d'alcool dans l'air expiré (il se mesure également en milligrammes par litre d'air)<sup>24</sup>.

La détermination de la concentration d'alcool chez un individu présente deux intérêts :

- a) **Un intérêt clinique** : afin de déterminer la gravité d'une intoxication éthylique aiguë et d'adapter au mieux le traitement
- b) **Un intérêt judiciaire** : afin de caractériser une infraction ou de déterminer dans quelles circonstances les faits se sont déroulés (mort suspecte, circonstance aggravante...) Lorsque le dosage est effectué à des fins judiciaires, des modalités particulières sont prévues par la loi au sujet des prélèvements (nombre d'échantillons, volume, conservation...), des techniques de dosage (recours à une méthode officielle), des laboratoires (accréditation)...<sup>25, 26</sup>.

Les analyses biologiques permettant de rechercher et de quantifier la présence d'alcool chez un individu sont réalisées en dosant l'éthanol et/ou ses métabolites directs spécifiques de la consommation d'alcool, à savoir : l'éthylglucuronide, l'éthylsulfate, le phosphatidyléthanol et les FAEE<sup>27</sup>.

L'éthanol peut être dosé dans de nombreux milieux biologiques<sup>28</sup>. Les ratios décrits dans la littérature permettent de convertir la concentration en éthanol du milieu étudié en éthanolémie (concentration de l'éthanol dans le sang total). Il est toutefois recommandé de ne pas effectuer cette conversion lors de l'interprétation des résultats en toxicologie médico-légale<sup>26, 29</sup> car de nombreux paramètres influencent ses ratios. Les milieux biologiques les plus couramment utilisés pour le dosage de l'éthanol sont le sang total et l'air alvéolaire expiré.

### 1.10.2 Dosage de l'éthanol dans le sang total :

#### 1.10.2.1 Prélèvement :

Selon Deveaux M, Carey, K.B et Viala A<sup>28, 30, 31</sup> Même si les solutions alcooliques antiseptiques n'interfèrent pas avec le dosage, il est recommandé de désinfecter la peau avant le prélèvement avec une solution ne contenant ni alcool ni substance volatile, pour éviter toute contestation. Chez le sujet vivant le prélèvement est effectué préférentiellement dans la veine cubitale et chez le sujet décédé dans la veine fémorale afin de recueillir du sang veineux périphérique. Les tubes utilisés lors du prélèvement contiennent de l'oxalate de potassium ou du fluorure de sodium, substances anticoagulantes et stabilisatrices.

### 1.10.2.2 *Techniques de dosage :*

Il existe trois types de techniques de dosage de l'éthanol : les méthodes chimiques, les méthodes enzymatiques et les méthodes chromatographiques <sup>29</sup>.

#### **A. Méthodes chimiques :**

Cette méthode est tout à fait satisfaisante pour l'examen des échantillons où l'éthanol est la seule substance réductrice volatile présente, mais elle n'est pas spécifique et nécessite des tests pour exclure la possibilité de la présence d'autres composés réducteurs volatils, par exemple l'acétone ou le méthanol.

#### **B. Méthode enzymatique :**

Les méthodes enzymatiques consistent à doser par spectrophotométrie les coenzymes ou les produits secondaires formés par oxydation enzymatique de l'éthanol.

#### **C. Méthodes de chromatographie en phase gazeuse :**

Concernant les méthodes chromatographies, la chromatographie en phase gazeuse est préférée à la chromatographie en phase liquide qui est moins sensible.

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

### 1.11.1 Les erreurs d'identification sur les personnes et les échantillons :

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 <sup>32</sup>.

### 1.11.2 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 Jonsson K.A <sup>32</sup>.

### 1.11.3 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. 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. 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<sup>32</sup>.

### 1.11.4 Par diffusion passive d'éthanol post-mortem :

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 locorégionaux. Ceci est particulièrement à craindre en cas de décès par traumatisme (thorax et abdomen)<sup>33</sup> C'est pourquoi il faut éviter 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<sup>34</sup>. Les veines périphériques et en particulier fémorales représentent le meilleur site de prélèvement pour le sang<sup>34</sup>. Elles doivent toujours être choisies préférentiellement.

### 1.11.5 Par oxydation lente in vitro de l'éthanol :

Cette cause de diminution in vitro de l'éthanolémie est mineure. Elle a été étudiée par deux auteurs Smalldon K.W. et Brown G.A.<sup>35</sup> selon ces auteurs la cinétique est de 2,9 mg/l 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 D'après Scaplehorn A.W.<sup>36</sup> la perte d'éthanol n'est augmentée quand le volume d'air augmente dans le flacon. Les inhibiteurs retenus pour limiter cette oxydation sont avant tout le froid. L'acide de sodium serait un meilleur inhibiteur que le fluorure de sodium.

### 1.11.6 Par évaporation de l'éthanol par un flaconnage mal fermé :

Cette cause de perte en alcool est décrite par Brown G.A.<sup>37</sup>, 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.

### 1.11.7 Par production et/ou dégradation d'éthanol par un processus microbiologique :

#### Modalités :

Un grand nombre d'espèces de micro-organismes (levures et bactéries) en présence de substrats fermentescibles : glucidiques endogènes ou de xénobiotiques comme le mannitol<sup>38</sup> ou de substrats protidiques ou apparentés (amines, purines, pyrimidines), 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<sup>39, 40</sup> 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 possible, cette inversion métabolique est en 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 donc que dégrader l'éthanol sans pouvoir en synthétiser (*Pseudomonas spp* par exemple).

Ces phénomènes de production et/ou de dégradation peuvent être quantitativement élevés et 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'humeur vitrée de l'œil, constitue un contrôle de choix pour la validation de l'éthanolémie<sup>34</sup> étant donné que ce dernier restant très généralement à l'écart d'une contamination microbienne.

- 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<sup>40</sup>.

## Généralités

---

- 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-gastro-intestinal<sup>40</sup>.

### 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.<sup>41</sup>. 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<sup>41</sup>.

### Germes de l'environnement responsable 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*<sup>41</sup>. 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.

### Principaux mécanismes en cause :

- Pour la synthèse : fermentation des glucides simples ou complexes : fermentation alcoolique pour les levures, fermentation acide mixte pour les entérobactéries<sup>42</sup>.
- 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*<sup>42</sup>.

# Partie Pratique

# Chapitre II : Matériel et méthodes

Dans ce deuxième chapitre nous allons aborder la partie pratique relative aux facteurs pré-analytiques (conservateurs, stress, microorganismes) liés à la stabilité de la concentration d'éthanol pendant le stockage des échantillons d'alcoolémie.

La pratique s'est déroulée au niveau de l'institut national de criminalistique et de criminologie (INCC).

Il est à noter que dans notre cas, la partie microbiologique n'a pas été achevée pendant notre période de stage, en raison des circonstances sanitaires suite à la pandémie du COVID19.

## 1. Matériel

### 1.1 Réactifs /produits chimiques :

- Ethanol  $C_2H_5OH$  99,9%, densité  $0,790 \text{ kg/m}^3$ , concentration pondérale 789,21 g/L.
- N-propanol (1-propanol)  $C_3H_7OH$ , 99,5%, densité  $0,785 \text{ kg/m}^3$ , concentration pondérale 784,21 g/L, qualité HPLC MERC.
- Sst : System suitability test : Acétone pour analyse, Acétaldéhyde pour analyse, Isopropanol pour analyse, Méthanol pour analyse.
- -Eau distillée ( $H_2O$ ).
- Eau distillée ( $H_2O$ ).
- Chlorure de Sodium (NaCl).
- Liquicheck TM Serum Volatiles Control (ref 383 et 384X) Level 1 0.48 g/l et 2 1.48g/l.
- Solution Standard d'Ethanol de concentration connue avec certificat de conformité.
- OGA : Oxytetracycline Olucose Agar : milieu sélectif utilisé pour la recherche et le dénombrement des levures et des moisissures

### 1.2 Gaz

- Gaz vecteur hélium (He), pureté = N55
- Air synthétique, pureté = N55
- Hydrogène ( $H_2$ ), pureté = N55

### 1.3 Solutions :

- Solution saline (Ss)
- Solution mère d'éthanol (S1)
- Solution mère de 1-Propanol (étalon interne) (S2)

### 1.4 contrôles qualités Externes :

- QC-EXT-1
- QC-EXT-2

### 1.5 Matériel / appareils / Equipement :

- Agitateur vortex VWR VV3 S40.
- Agitateur magnétique chauffant.
- Agitateur pour tube à hémolyse.
- Micropipette fixe (1000 µl), pour la préparation des solutions mères.
- Micropipette fixe (100 µl), pour le prélèvement du sang total.
- Micropipette fixe (100 µl), pour le prélèvement de l'étalon interne.
- Micropipette fixe (50 µl), pour la préparation du SST (Système Suitability Test).
- Flacons en verre d'une contenance de 10 ml pour dispositif Head-space avec bouchon métallique muni d'un septum en silicone/PTFE.
- Pince à sertir les Flacons Head-space.
- Pince à dessertir les Flacons Head-space.
- Fioles jaugées en verre à contenance de 200 ml.
- Fioles jaugées en verre ambré à contenance de 250 ml
- Fioles jaugées en verre à contenance de 1000 ml.
- Embouts pour Micropipette (100 µl).
- Barreaux magnétiques
- Boîte de pétri.

#### 1.5.1 Support :

Nous avons utilisé 4 types de tubes différents sous vide destinés au prélèvement d'échantillon sanguin pour l'analyse d'alcoolémie.

-La présentation du support est primordiale pour cette présente étude, elle est détaillée dans ce qui suit :

## Matériel et Méthodes

Tableau 2 : fiche technique du tube Fluorure de Sodium et Oxalate de Potassium (Vacutest)

<b>Description du 1 er Produit</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tube en PET, stérile, sous vide, 13x75 mm, avec Fluorure de Sodium et Oxalate de Potassium</li> <li>- Volume du tube : 5 ml Volume de vide : 4 ml</li> </ul> <p><b>Reference et couleur de bouchon :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Reference CML- ID : VK054SFX</li> <li>- Couleur de bouchon : gris</li> <li>- présentation de l'additif : liquide pulvérisé</li> </ul>	
<p><b>Bouchon perçable et bague de sécurité repositionnable</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Bouchon perçable en gomme de butyle</li> <li>-Bague de sécurité en PET contre les éclaboussures et les aérosols</li> <li>-Surface de préhension de sécurité de 20 mm pour protéger les laborantins</li> </ul>	
<p><b>Dimensions et spécifications :</b></p> <p>Tube en polytéréphthalate d'éthylène (PET), transparent, résistant aux chocs.</p>	
<p><b>Matériau :</b> Polytéréphthalate d'éthylène</p> <p><b>Diamètre :</b> 13 mm (dimension externe du tube)</p> <p><b>Hauteur :</b> 75 mm</p>	
<b>Additif</b>	
<p><b>Fluorure de sodium et oxalate de potassium</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Solution composée par 2,5 mg/ml de fluorure de sodium NaF et 2 mg/ml de d'oxalate de potassium <math>K_2O_x</math></li> <li>-Les ions fluorure (F-), présents dans l'anticoagulant, en agissant sur l'énolase, inhibe la glycolyse.</li> <li>-Le test peut ainsi être effectué plusieurs heures après que le prélèvement ait été réalisé.</li> </ul>	
<b>Application</b>	
<p>Tube destiné au prélèvement d'échantillons sanguins pour analyse de la glycémie.</p> <p>Il est recommandé de vérifier la compatibilité de l'anticoagulant avec la méthode analytique utilisée.</p>	
<b>Recommandations d'utilisation</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>-<b>Indications d'homogénéisation :</b> Immédiatement après prélèvement,retournez lentement l'échantillon 6 à 8 fois.</li> <li>- <b>Délai minimum avant centrifugation :</b> aucun</li> <li>- <b>Délai maximum avant centrifugation :</b> <math>\leq 48</math> heures après le prélèvement. Temps requis pour faire le test de glycémie</li> <li>- <b>Vitesse de centrifugation :</b> 1300 g pendant 10 minutes à 20-25 °C</li> <li>- <b>Conservation de l'échantillon avant la centrifugation :</b> garder à température ambiante ou à 2°- 8°C</li> </ul>	
<b>Stockage et conservation</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le tube conserve sur de longues durées doit être stokes dans un endroits sec a une température comprise entre +5°C et +25°C.Il doit être maintenu en position vertical, bouchon en haut.</li> </ul>	

## Matériel et Méthodes

<b>Etiquetage des tubes</b>
Étiquette papier adhésive à usage médical de dimension 40x20 mm, imprimée en 3 couleurs, mentionnant les : nom de la marque, référence, additif, volume de prélèvement, lot et date de péremption, symboles (Stérile R, DIV, CE et usage unique), indicateur de niveau, couleur de bouchon, nom du fabricant.
<b>Stérilisation</b>
Par irradiation selon les directives : EN 556-1 stérilisation des dispositifs médicaux : exigences relatives aux dispositifs médicaux en vue d'obtenir un produit stérile au stade terminal. En ISO 11737-2- Stérilisation des dispositifs médicaux par méthodes microbiologiques : la validation et la maintenance d'un procédé de stérilisation.
<b>Traçabilité et Mode d'élimination</b>
Numéro du lot : exemple : C0475, localisation : Carton, boîte et Date limite d'utilisation : 18 (dix-huit) mois à compter de la date de fabrication.  Après usage, ces produits sont considérés comme des déchets sanitaires potentiellement infectieux : CER 18 01 03 « Déchets dont la collecte et l'élimination font l'objet de prescriptions particulières vis-à-vis des risques d'infections ».

*Tableau 3 : fiche technique du tube Fluorure Oxalate (Prommedi)*

<b>Description du 2ème Produit</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- tube de prélèvement avec réactif Fluorure Oxalate</li> <li>- Tube en PET, sous vide</li> <li>- Volume de vide : 4 ml</li> <li>- Additif : fluorure oxalate</li> <li>- Couleur de bouchon : <b>Noir</b></li> <li>- Présentation de l'additif : liquide</li> <li>- Moyenne du volume de l'additif : 360-365 µl</li> <li>- <b>Matériau</b> : Polytéraphthalate d'éthylène</li> <li>- <b>Application</b> : tube destiné au prélèvement d'échantillons sanguins pour analyse de la glycémie.</li> <li>- <b>Etiquetage des tubes</b> : Étiquette papier adhésive à usage médical, mentionnant les : Aditif, indicateur de niveau de remplissage, nom de la marque : Prommedi Douera (Alger)</li> </ul>	

*Tableau 4 : fiche technique du tube EDTA/Sodium fluoride (Vacuette)*

<b>Description du 3ème Produit</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tube en PET, stérile, sous vide, 13x75 mm,</li> <li>- Les tubes VACUETTE® Glucose contiennent par ml de sang : 2,5 mg de fluorure de sodium (NaF) et 1,8 mg d'EDTA K<sub>3</sub>.</li> <li>- Couleur de bouchon : Gris</li> <li>- Présentation de l'additif : liquide pulvérisé</li> </ul> <p><b>Matériaux :</b> Les tubes VACUETTE® Glucose sont fabriqués à partir de PET (polyéthylène téréphtalate). Le bouchon est produit à partir de PE (polyéthylène) et est coloré à partir de pigments purifiés en accord avec la norme EN 71/3. Le caoutchouc intégré au bouchon est composé de bromobutyle qualité pharmaceutique garantie sans latex. La bague de stabilité est composée de PP (polypropylène).</p> <p><b>Diamètre :</b> 13 mm (dimension externe du tube) <b>Hauteur :</b> 75 mm</p>	
<b>Additif</b>	
<p><b>EDTA/sodium fluoride</b> Le fluorure de sodium et le mono-iodoacétate sont utilisés dans les tubes VACUETTE® Glucose comme inhibiteur de la glycolyse pour préserver le glucose quand il est associé avec un anticoagulant tel que l'EDTA, l'oxalate de potassium ou l'héparine.</p>	
<b>Application</b>	
<p>Les tubes VACUETTE® Glucose sont utilisés pour le dosage de glycémie ou d'alcoolémie</p> <p><b>Stérilité :</b> Stérilité interne au tube : SAL 10 (SAL = Sterility assurance level)</p> <p><b>Conformité :</b> ISO 6710 single use containers for venous blood specimen collection</p> <p><b>Conditionnement :</b> Les tubes sont conditionnés par portoir de 50 unités emballées dans une feuille de polyéthylène.</p> <p><b>Température de stockage :</b> Recommandation : de +4 à +25</p> <p>Remarque : le non-respect de la température de stockage peut conduire à une dégradation de la qualité du tube</p>	
<b>Centrifugation et conservation</b>	
<p>Temps maximum de centrifugation : Se reporter à l'études sur la stabilité des paramètres analytiques</p> <p>Condition de centrifugation : Vitesse : <b>1800 RPM ≤ V ≤ 2200 RPM</b> et Temps : <b>10 min ≤ t ≤ 15 min</b></p>	

Tableau 5 : fiche technique du tube K3 EDTA (Vacutest)

<b>Description du 4<sup>ème</sup> Produit</b>	
<p>- Tube en PET, sous vide, 13x75 mm, avec EDTA K<sub>3</sub>.                      - Volume du tube : <b>5 ml</b>, Volume de vide : <b>4 ml</b>  <b>Reference et couleur de bouchon</b> : Reference CML- ID : VK054STK de Couleur Lavande.  <b>Présentation de l'additif</b> : liquide pulvérisé  <b>Bouchon perçable et bague de sécurité repositionnable</b> :                      -Bouchon perçable en gomme de butyle.                      -Bague de sécurité en PET contre les aérosols.                      -Surface de préhension de sécurité de 20 mm.  <b>Dimensions et spécifications</b> :                      Tube en polytéraphthalate d'éthylène (PET), transparent, résistant aux chocs  <b>Matériau</b> : Polytéraphthalate d'éthylène.  <b>Diamètre</b> : 13 mm (dimension externe du tube).  <b>Hauteur</b> : 75 mm</p>	
<b>Additif</b>	
<p><b>EDTA K<sub>3</sub></b> : Sel tripotassique d'acide éthylène diamine tétracétique Film correspondant à environ 1,8 mg/ml de sang.</p>	
<b>Application</b>	
<p>Ce tube est destiné au prélèvement d'échantillons sanguins pour l'hématologie. Ce tube peut de même être utilisé pour des analyses cliniques du plasma. Dans ce cas, après prélèvement, retournez le tube lentement 6 à 8 fois au moins puis centrifugez-le en respectant les instructions de conservation de l'échantillon : Température et le délai maximum de conservation, Jusqu'à 24 °C (6 heures), de 2 à 4 °C (≤ 24 heures).</p>	
<b>Stockage et conservation</b>	
<p>Le tube conservé sur de longues durées doit être stocké dans un endroit sec à une température comprise entre +5 et +25°C. Il doit être maintenu en position verticale, bouchon en haut.</p>	
<b>Étiquetage des tubes</b>	
<p>Étiquette papier adhésive à usage médical – de dimension 40x20 mm, imprimée en 3 couleurs, mentionnant les : nom de la marque, référence, additif, volume de prélèvement, lot et date de péremption, symboles (Stérile R, DIV, CE et usage unique), indicateur de niveau, couleur de bouchon, nom du fabricant</p>	
<b>Stérilisation</b>	
<p>Par irradiation selon les directives :                      -EN 556-1 – Stérilisation des dispositifs médicaux et l'exigence relative aux dispositifs médicaux en vue d'obtenir des produits médicaux stérilisés au stade terminal.                      -EN ISO 11737-2 – Stérilisation des dispositifs médicaux par méthodes microbiologiques : la validation et la maintenance d'un procédé de stérilisation.</p>	
<b>Traçabilité et Mode d'élimination</b>	

Numéro du lot : exemple : C0475, localisation : Carton, boîte et tub Date limite d'utilisation : 18 (dix-huit) mois à compter de la date de fabrication.

Après usage, ces produits sont considérés comme des déchets sanitaires potentiellement infectieux.

### 1.6 Matériels biologiques :

#### 1.6.1 Echantillon de sang :

Du sang entier animalier de bovins a été récupéré des abattoirs d'EL HARRACH dans des flacons de prélèvement stérile, conformément aux normes éthiques, et a été utilisé comme matrice vierge tout au long de l'étude après vérification qu'il était négatif pour l'éthanol. Les échantillons ont été congelés à -18 °C pendant 3 jours maximum avant d'être utilisés. Les concentrations en glucose des échantillons de sang n'ont pas été déterminées, à savoir que la glycémie des bovins est comprise entre 0.7 et 1.2 g/l<sup>43</sup>.

**Remarque : en raison des conditions sanitaire actuelle "COVID 19" et la difficulté de prélèvement sur des volontaires sains l'étude a été réalisé avec du sang animalier**

## 2. Méthodes

Nous avons examiné les effets du temps, de la température et d'un agent de conservation (fluorure de sodium) sur les concentrations d'éthanol dans des échantillons de sang entier animalier provenant de bovins. Nous avons mesuré l'éthanol au cours du premier, troisième, septième, dixième et quatorzième jour de stockage, par chromatographie en phase gazeuse. Les échantillons ont été stockés à 22°C et à 5°C avec différents conservateurs.

### 2.1 Préparation de la Solution Saline (Ss) :

- Dans une fiole jaugée de 1000 ml, introduire 09 g de NaCl et compléter par de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.
- Introduire un barreau magnétique et placer la fiole sur l'agitateur magnétique pendant 5 min à vitesse 4. La solution finale obtenue, titre à une concentration en NaCl de 0.9%.
- La solution (Ss) est conservée à (+5°C±5).

### 2.2 Préparation Solution mère d'éthanol (S1) :

- Dans une fiole jaugée de 200 ml, introduire 1ml d'éthanol à 99,9 % et compléter par la quantité suffisante de la solution saline (Ss) pour un volume final de 200 ml
- Introduire un barreau magnétique et placer la fiole sur l'agitateur magnétique pendant 5 min à vitesse 4.
- La solution finale obtenue, titre à une concentration finale de 3,94 g/l
- Remplir un vial head-space préalablement identifié 'S1- date de préparation'
- Le reste de la solution (S1) est éliminé une fois les points de gamme préparés

### 2.3 Préparation de la Solution mère de 1- Propanol (étalon interne) (S2) :

- Dans une fiole jaugée de 250 ml introduire 100 µl de 1-propanol à 99,5% et compléter par la quantité suffisante de la solution saline (Ss) pour un volume final de 250 ml.
- La solution finale obtenue titre à une concentration finale de 0,31 g/L.
- La solution (S2) est répartie sur plusieurs flacons head-space préalablement identifiés (EI-Date de préparation), hermétiquement fermés et conservés à (+5°C ±5).
- La validité de la solution est conditionnée par les décisions de la validation analytique (TOX/A.02 en vigueur : Protocoles de management des résultats de recherche et dosage de l'éthanol).

### 2.4 Préparation et analyse de la gamme de calibrage

Dans des flacons pour Head-Space préalablement identifiés (C1-C6), introduire successivement afin d'obtenir les 6 points calibrant :

*Tableau 6 : Gamme de calibrage*

	Gamme de calibrage					
	C6 (3,94g/L)	C5 (1,97 g/L)	C4 (0,985 g/L)	C3 (0,492 g/L)	C2 (0,246g/L)	C1 (0,123 g/L)
<i>Solution saline (ml)</i>	0000	3000	3000	3000	3000	3000
<i>S1 (µl)</i>	3000	3000				
<i>C5 (µl)</i>			3000			
<i>C4 (µl)</i>				3000		
<i>C3 (µl)</i>					3000	

## Matériel et Méthodes

---

C2 (µl)						3000
---------	--	--	--	--	--	------

- Sertir les flacons.
- Agiter au vortex chaque vial à vitesse 4 pendant 30 secondes.
- Dans des vials pour head-space numérotés de C1 à C6, introduire :
  - 100 µl de chaque calibrant correspondant.
  - 100 µl de S2.
- Sertir avec les bouchons métalliques munis du septum en téflon et agiter chaque vial au vortex à vitesse 4 pendant 30 secondes.
- Placer chaque gamme dans un sac « à fermeture Zip » préalablement daté (Date de préparation) et stocker au réfrigérateur (+5°C ±5).
- La validité des gammes est conditionnée par les décisions de la validation analytique (Ref : Management des résultats).

### 2.5 Préparation des contrôles qualités Externes (QC-EXT-1 et QC-EXT-2) :

Il s'agit du Liquicheck TM Serum Volatiles Control (ref 38- 384X) Level 1 et 2.

- Faites ouvrir les deux flacons (Level 1 et 2).
- A partir de chaque flacon, prélever 100 µl d'échantillon et les introduire dans des vials pour Head-space préalablement identifiés QC-ext-1 et QC-ext-2.
- Faites ajouter à chaque vial 100 µl de S2.
- Sertir avec les bouchons métalliques et agiter chaque vial au vortex, à vitesse 4 pendant 30 secondes.
- Répéter l'opération jusqu'à épuisement des flacons (Level 1 et 2).
- Placer les vials de chaque QC dans son container respectif et stocker les au réfrigérateur (+5°C±5).

La validité des QC est conditionnée par les décisions de la validation analytique (Ref : Management des résultats).

### 2.6 Contrôle microbiologique des tubes de prélèvement « isolement et dénombrement des levures et champignons » :

#### Techniques :

**Méthode par écouvillonnage :** Écouvillon sec ou humidifié qui est frotté contre la surface des 4 types de tube. Cet écouvillon sert ensuite à ensemercer les milieux de cultures.

- Isolement et dénombrement des levures et moisissures :
  - Ensemencement sur un milieu solide
  - Milieu solide : gélose OGA / milieu sélectif utilisé pour la recherche et le dénombrement des levures et des moisissures. C'est un milieu liquide solidifié par addition d'Agar à une concentration de 1 à 1.7%

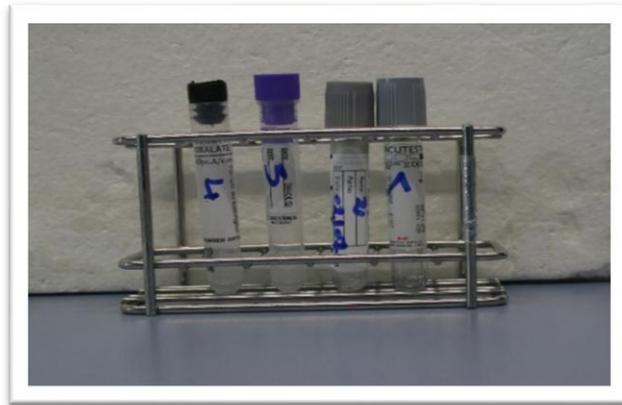
a) Milieu gélosé :

**Technique :**

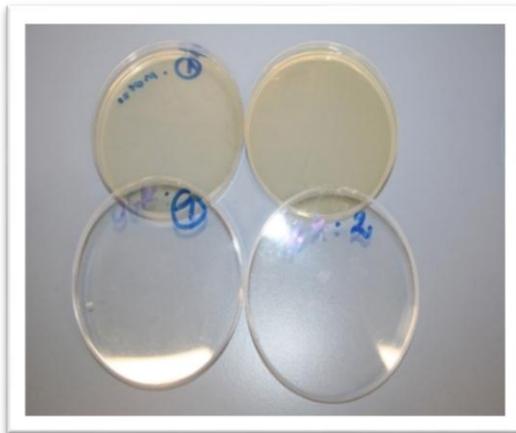
- Effectuer l'ensemencement dans des conditions d'asepsie rigoureuses à partir d'un prélèvement réalisé sur les tubes.
- Sur une boîte de pétri préalablement séchée et stérilisée contenant la gélose OGA effectuer des stries à l'aide de l'écouvillon.
- Incuber les boîtes de pétri à 28-32°C pendant 72 heures.

## Matériel et Méthodes

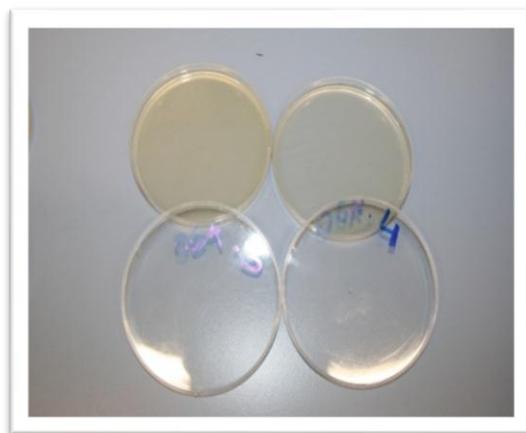
---



(A) : 1 : fluorure de sodium. 2 : NaF/EDTA. 3 : k3 EDTA. 4 : fluorure oxalate

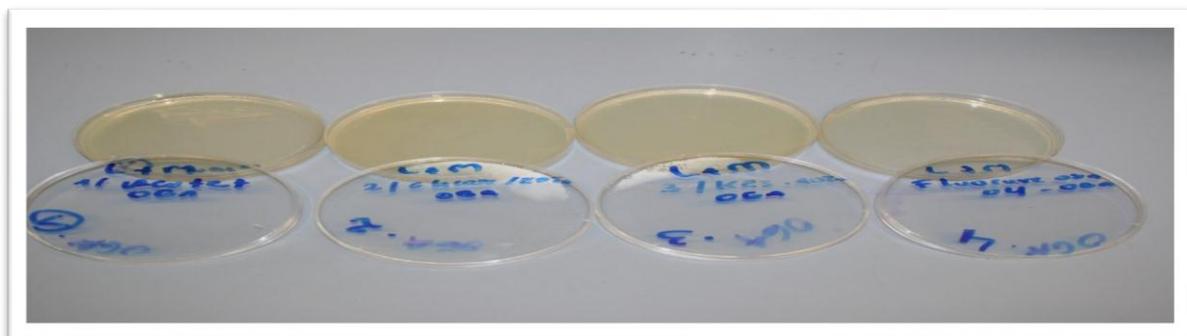


(B)



(C)

(B) + (C) : Ensemencement sur gélose OGA



(D) : recherche et dénombrement après 72 heures

*Figure 1: Protocole de recherche et de dénombrement des levures et moisissures.*

## Matériel et Méthodes

---

J1 : le jour de la récupération des échantillons de sang et la vérification de la présence ou de l'absence d'éthanol de source exogène ou endogène et le lancement de la chromatographie.

### 2.7 Contrôle et vérification des échantillons de sang :

- Etiqueter les tubes : date, stress, concentration surchargée.
- Introduire 4 ml de sang à l'aide d'une micropipette dans chaque série de tube jusqu'au trait de jauge correspondant à la quantité requise 4ml, et qui est destinée à la quantité du conservateur.

**Remarque : L'emplacement du trait de jauge du tube "OXALATE FLUORURE "ne correspond pas à la quantité requise 4 ml ce qui peut fausser les résultats de l'analyse.**

- Prélever 200 µl de sang destiné à une concentration de 0.2g/l et le remplacer par 200 µl de la solution mère d'éthanol(S1) 3.94 g/l
- Prélever 500 µl de sang destiné à une concentration de 0.5g/l et le remplacer par 500 µl de la solution mère d'éthanol(S1) 3.94 g/l.
- Agiter au vortex chaque tube de sang avant prétraitement pendant 30 secondes à vitesse 4. Puis chaque tube est agité par retournement manuelle (5 à 6 fois).

### 2.8 Recherche du volume nécessaire a surchargé pour un volume de 4 ml d'échantillon de sang :

Le choix des concentrations d'éthanol dans le sang pour l'étude était de 0,2 g/l et 0,5 g/l ce qui se rapproche aux limites légales d'alcoolémie en Algérie.

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

A savoir :

$C_i$  = concentration initiale de la solution mère d'éthanol (S1) 3,94 g/l

$V_i$  = volume initiale recherché

$C_f$  = concentration finale d'éthanol 0,2g/l - 0,5g/l

## Matériel et Méthodes

---

Vf = volume finale des tubes sous vide 4 ml

1- Pour une concentration de 0,2 g/l :

$$Vi = \frac{Ci \times Vf}{Ci} = \frac{0,2 \times 4}{3,94} = 0,20 \text{ ml} = 200 \mu\text{l}$$

2- Pour une concentration de 0,5 g/l :

$$Vi = \frac{Ci \times Vf}{Ci} = \frac{0,5 \times 4}{3,94} = 0,50 \text{ ml} = 500 \mu\text{l}$$

### 2.9 Préparation des échantillons de sang

Quatre séries d'échantillons de sang ont été préparées et étiquetées à chacune des trois concentrations limites légales d'éthanol (0g/l, 0,2g/l et 0,5g/l). Cet étiquetage doit comporter un certain nombre de mentions :

- Le nom du conservateur.
- La date du lancement de la première chromatographie (Jr).
- La température (22 °C et 5°C).
- Les concentrations surchargées.

Quatre types de chaque série à chaque concentration ont été conservés à 5 °C, tandis que les quatre de la série ont été conservées à 22 °C pendant 14 jours. Les échantillons de sang ont été analysés pendant ces jours : Jr3, Jr7, Jr10 et Jr14.



(A) : K3 EDTA



(B) : fluorure Oxalate



(C) : EDTA/fluorure de sodium



(D) : fluorure de sodium

Figure 2 : préparation des échantillons de sang pour chaque type de tubes de prélèvement

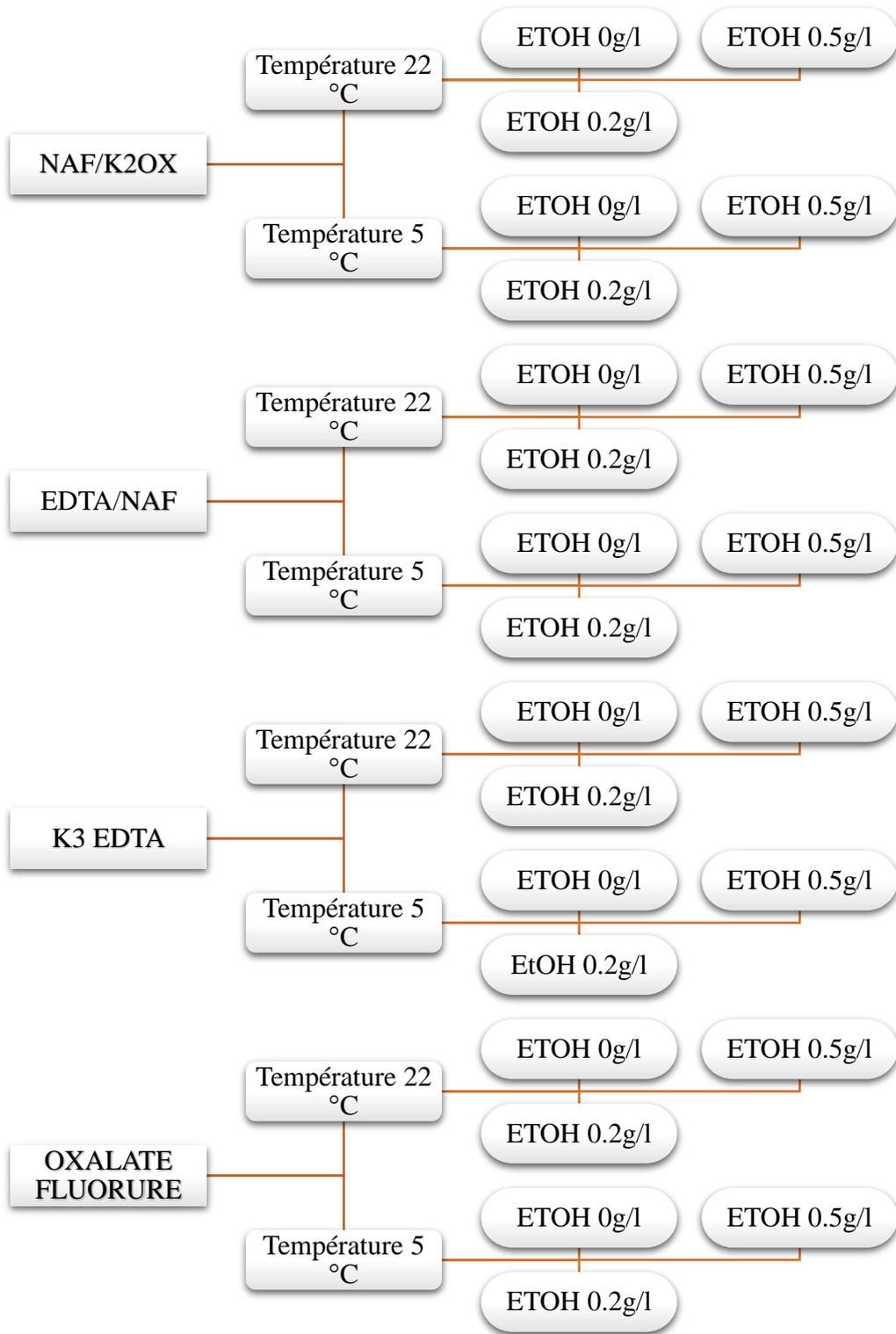


Figure 3 : Préparation des échantillons de sang surchargés

### 2.10 Dosage de l'éthanol par chromatographie en phase gazeuse :

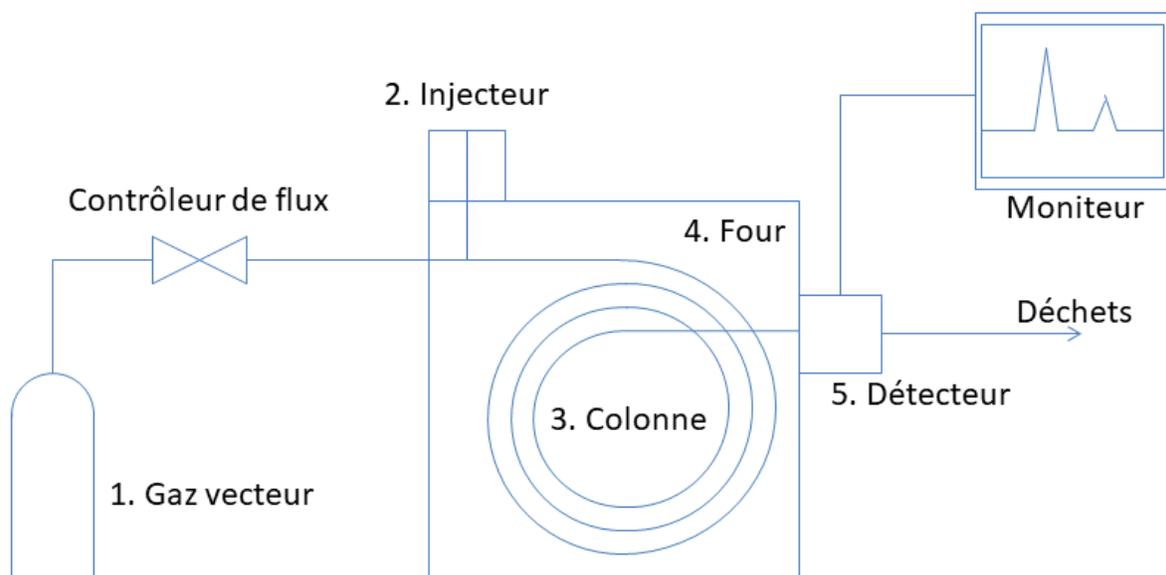
#### Définition :

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) (gas chromatography, GC, en anglais) est une technique de séparation d'un mélange de molécules volatiles, appelées ici « analytes ». Cette technique a été développée par A.J.P MARTIN et R.L.M. SYNGE. Elle est utilisée dans des domaines très variés, tels que la parfumerie, l'œnologie, l'industrie pétrolière, la biologie, la chimie fine et l'industrie des matières plastique<sup>44</sup>.

#### Appareillage :

L'appareil utilisé pour réaliser une analyse par chromatographie en phase vapeur est appelé chromatographe. Il comporte plusieurs éléments, comme indiqué sur le schéma ci-dessous :

Les numéros de la figure renvoient aux numéros des paragraphes suivants.



*Figure 4 : Schéma d'un chromatographe*

### 1. Le gaz vecteur (phase mobile) :

Le gaz vecteur est le gaz qui circule à l'intérieur du chromatographe, entraînant les analytes à travers la colonne, depuis l'injecteur jusqu'au détecteur. Son choix dépend du type de détecteur utilisé ; cela peut être par exemple de l'hélium, de l'azote, de l'argon ou de l'hydrogène.

Le débit de ce gaz vecteur est de l'ordre de 30 à 40 ml/min pour les colonnes remplies et de 0,2 à 2 ml/min pour les colonnes capillaires.

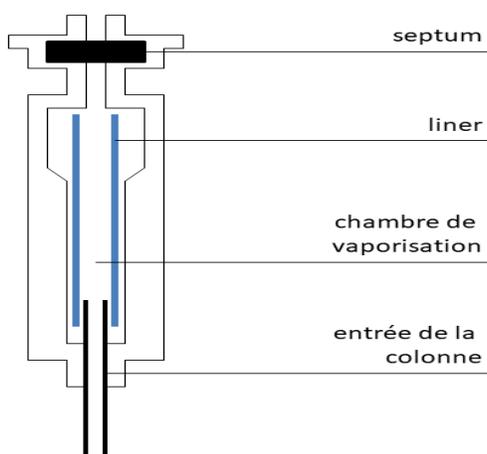
Le débit du gaz vecteur influe sur le pouvoir de résolution du chromatographe. Deux phénomènes, la diffusion longitudinale et la résistance au transfert de masse entre les phases mobile et stationnaire, ont des effets opposés sur le pouvoir de résolution de la colonne<sup>44</sup>.

### 2. Le système d'injection :

Ce système permet à la fois l'introduction de l'échantillon dans la colonne du chromatographe, ainsi que la volatilisation des analytes. La température de l'injecteur doit être réglée de manière à entraîner la vaporisation de tous les analytes de l'échantillon : elle est généralement maintenue à 50°C au-dessus de la température d'ébullition de l'analyte le moins volatil.

L'introduction se fait à l'aide d'une micro-seringue (le volume à injecter est généralement voisin de 1  $\mu\text{L}$ ) à travers un septum (qui assure l'étanchéité) dans un *liner* (typiquement un tube de verre rempli d'un petit morceau de coton).

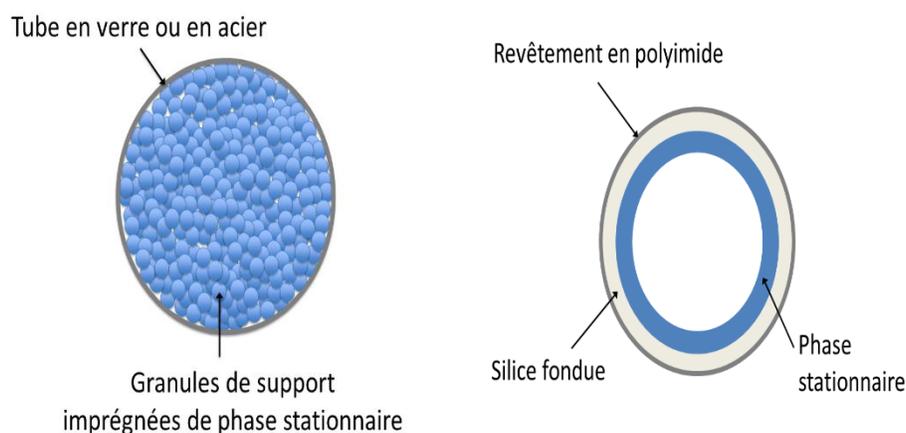
Si l'échantillon contient des espèces non-volatiles, celles-ci sont retenues sur le coton et donc non-injectées dans la colonne, ce qui permet de la protéger. Les espèces volatiles sont vaporisées et entraînées par le gaz vecteur vers la tête de la colonne<sup>44</sup>.



*Figure 5 : Schéma d'un injecteur*

### 3. La colonne (phase stationnaire) :

Il existe deux types de colonnes : les *colonnes remplies* et les *colonnes capillaires*. Les colonnes remplies ont un diamètre de quelques millimètres et une longueur de l'ordre du mètre. Elles sont remplies de granules de support inerte, généralement de la silice, dont la surface est imprégnée ou greffée avec la phase stationnaire. Elles sont aujourd'hui supplantées par les colonnes capillaires, dont le pouvoir de résolution est bien supérieur.



*Figure 6 : Schéma (en coupe) d'une colonne remplie (à gauche) et d'une colonne capillaire (à droite)*

Les colonnes capillaires sont de simples tubes d'acier inoxydable, de verre ou de silice fondue (matériau inerte vis-à-vis de la phase stationnaire et des échantillons) de diamètre intérieur compris entre 0,1 et 0,5 mm, et d'une longueur typique de plusieurs dizaines de mètres, pouvant aller jusqu'à 100 m. Pour tenir dans l'appareil, la colonne est enroulée, avec des spirales ayant 10 à 30 cm de diamètre. La surface interne de ce tube est recouverte d'un film de 0,1 à 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur constitué de la phase stationnaire<sup>44</sup>.

### 4. Le four

La colonne est contenue dans un four de type chaleur tournante, dont la température est précisément ajustable (typiquement entre 20 °C et 350 °C) et programmable. Les températures utilisables en pratique dépendent des domaines de stabilité en température de la colonne utilisée, et de ceux des composés analysés.

Plus la température du four (et donc de la colonne) est élevée, plus les analytes se déplacent rapidement dans la colonne, mais moins ils interagissent avec la phase stationnaire, et donc moins les analytes sont séparés. Plus la température du four est basse, meilleure est la séparation des analytes mais plus longue est l'analyse. Le choix de la température est donc un compromis entre la durée de l'analyse et le niveau de séparation désiré<sup>44</sup>.

### 5. Le détecteur

En sortie de colonne, les analytes rencontrent le détecteur, aujourd'hui généralement couplé à un enregistreur numérique du signal qui permet son traitement. Cet élément mesure en continu une grandeur proportionnelle à la quantité des différents analytes. Il en existe de nombreux modèles, dont :

- Le FID (en anglais *flame ionisation detector*, en français détecteur à ionisation de flamme), qui est le plus utilisé. La sortie de colonne traverse une flamme maintenue à une tension d'une centaine de volts. La pyrolyse ionise les composants, provoquant l'apparition d'un courant électrique entre les électrodes, ensuite amplifié. Typiquement utilisé avec les gaz vecteurs azote, hélium et hydrogène<sup>44</sup>.

## 2.11 Principe de la chromatographie en phase gazeuse :

C'est une technique qui permet de séparer des molécules d'un mélange éventuellement très complexe de nature diverses. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptible d'être vaporisés par chauffage sans décomposition.

L'alcool éthylique est recherché et dosé dans le sang total, après préparation de l'échantillon à analyser à l'aide du système espace de tête "Head-space".

L'échantillon à proportion égale avec l'étalon interne (1-Propanol) est placé dans un flacon en verre obturé hermétiquement par un bouchon métallique muni d'un septum en téflon, puis placé dans une enceinte chauffée du système "Head-space".

Après chauffage, le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée de la colonne qui renferme la phase stationnaire, puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz vecteur (Hélium), les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les

## Matériel et Méthodes

---

unes après les autres après un certain laps de temps qui est en fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules.

Le courant gazeux issu de la colonne arrive dans la flamme d'hydrogène, placée entre deux électrodes auxquelles est imposée une certaine polarisation, lorsque les molécules organiques sont présentées dans le gaz, la température de la flamme brûle la plupart d'entre elles. Le courant d'ions, proportionnel à leur nombre, est recueilli par les électrodes et transmis après amplification à l'enregistrement. Normalement quand le gaz est seul, peu d'ions sont formés et le courant de base est peu important.

L'identification des composés est obtenue par comparaison des indices de rétention standards de référence de produits témoins, mises en mémoire dans la bibliothèque du système informatique.

Le dosage s'effectue par une gamme de calibrage comprenant différentes concentrations du standard de référence (éthanol), analysées dans les mêmes conditions que l'échantillon.

### 2.12 Prétraitement des échantillons pour l'analyse

Avant de procéder au prétraitement des échantillons, disposer les contrôles externes, le SST et la solution S2 à température ambiante, pendant 30 minutes avant l'analyse.

#### 2.12.1 Préparation du blanc :

- Préparer un vial head-space vide et sertir avec un bouchon métallique.

#### 2.12.2 Prétraitement des échantillons à analyser :

- Agiter au vortex chaque tube de sang avant prétraitement pendant 30 secondes à vitesse 4. Puis chaque tube est agité par retournement manuelle (5 à 6 fois) afin de vérifier la présence de caillots (coagulation) et ou de putréfaction (coloration verdâtre, noirâtre...etc.).
- Dans des vials pour head-space identifiés, « D'affaire », introduire :
- 100 µl de l'échantillon correspondant.
- 100 µl de S2.
- Sertir avec les bouchons métalliques munis du septum en téflon et agiter chaque vial au vortex, à vitesse 4 pendant 30 secondes avant d'effectuer l'analyse.
- Conserver les tubes dans le réfrigérateur à une température de 5°C et à une température ambiante 22°C.

### 2.12.3 Prétraitement des échantillons à diluer :

- Cas des échantillons du sang avec un taux d'alcool supérieur à 3.94 g/l).
- Dans des tubes Eppendorff identifiés, introduire successivement
  - 100 µl de la solution (Ss).
  - Passer au vortex pendant 30 sec à vitesse 4.
- Dans des vials pour head-space identifiés, introduire successivement :
  - 100 µl de l'échantillon dilué.
  - 100 µl de S2.
  - Sertir avec les bouchons métalliques et passer au vortex pendant 30 sec à vitesse 4.

### 2.12.4 Analyse chromatographique

#### 2.12.4.1 Traitement des résultats :

- Remarque : le traitement des résultats s'effectue dans le menu OFFLINE
- Cliquer dans la barre de menu Ouvrir, puis sur Séquence et faites charger la Séquence, objet de traitement.
- Cliquer dans la barre de menu Séquence, puis sur Process et cocher la case Print method report et enfin cliquer sur Start.

#### 2.12.4.2 Paramètres d'identification et de quantification

- L'éthanol est identifié sur la base du temps de rétention du standard de référence.
- La concentration est calculée à partir de la gamme de calibrage.

La chromatographie a été lancée pendant les jours suivants : Jr3, Jr7, Jr10 et Jr14 afin d'étudier la stabilité des concentrations d'éthanol dans le temps. Il faut également considérer que l'éthanol est une substance volatile. En tant que tel, il est possible que l'évaporation puisse entraîner une diminution de la concentration d'éthanol, à cet effet le choix des jours s'est basé sur ce point.

### Chapitre III : Résultats et Discussions

Après avoir effectué l'analyse de l'éthanol avec la méthode analytique validée de chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur d'ionisation (GC/FID) nous allons exposer et discuter dans le présent chapitre les différents résultats que nous avons obtenus.

#### 3. Résultats

##### 3.1 Résultats de la première chromatographie lancée (Jr1)

Les différents résultats obtenus après avoir lancé la chromatographie sur les différentes concentrations surchargées sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 7 : Résultats de chromatographie (Jr1)

<i>Conservateurs</i>	<b>Volume m<sup>3</sup></b>	<b>Température</b>	<b>Références (Echantillons)</b>	<b>Concentration surchargée g/l</b>	<b>Concentration obtenue g/l</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Ecart en %</b>
<i>K3 EDTA</i>	<b>4</b>	<b>T 22 °C</b>	Vial 1	0	0	0	0%
			Vial 2	0.2	0.19	0.19	95%
			Vial 3	0.5	0.49	0.49	98%
<i>FLUORURE OXALATE</i>	<b>4</b>	<b>T 22 °C</b>	Vial 4	0.2	0.17	0.18	85%
			Vial 5	0.5	0.43	0.46	86%
<i>EDTA SODIUM FLUORIDE</i>	<b>4</b>	<b>T 22 °C</b>	Vial 6	0.2	0.19	0.19	95%
			Vial 7	0.5	0.48	0.49	96%
<i>NAF K2OX</i>	<b>4</b>	<b>T 22 °C</b>	Vial 8	0.2	0.19	0.19	95%
			Vial 9	0.5	0.49	0.49	98%

## Résultats et Discussions

---

### ⇒ Interprétation :

D'après les résultats présentés dans le tableau ci-dessus (tableau 3), Nous observons :

#### **Pour le premier conservateur K3 EDTA :**

- Nous remarquons que les concentrations obtenues sont presque similaire aux concentrations surchargées (0g/l, 0,2g/l, 0,5g/l) dans un stress de température ambiante.
- L'écart en pourcentage pour la concentration 0 g/l est nul, pour la concentration 0,2 g/l est estimé à 95%, et pour 0,5 g/l il est à 98%.

#### **Pour le deuxième conservateur FLUORURE OXALATE :**

- Nous remarquons qu'il y a une différence significative entre les concentrations surchargées (0,2g/l, 0,5g/l) et les concentrations obtenues (0,17g/l, 0,43g/l) à savoir qu'il a eu une diminution significative par rapport aux concentrations initiales à un niveau de 80% et 86% respectivement.
- L'écart en pourcentage pour la concentration 0,2 g/l est estimé à 85% et pour la concentration 0,5g/l il est à 86%.

#### **Pour le troisième conservateur EDTA/SODIUM FLUORIDE :**

- Nous remarquons que les concentrations obtenues sont presque similaire aux concentrations surchargées (0,2g/l, 0,5g/l) dans un stress de température ambiante.
- L'écart en pourcentage pour la concentration 0,2 g/l est estimé à 95%, et pour 0,5 g/l il est à 96%.

#### **Pour le quatrième conservateur NAF K2OX :**

- Nous remarquons que les concentrations obtenues sont presque similaire aux concentrations surchargées (0,2g/l, 0,5g/l) dans un stress de température ambiante.
- L'écart en pourcentage pour la concentration 0,2 g/l est estimé à 95%, et pour 0,5 g/l il est à 98%.

### **3.2 Résultats de la deuxième chromatographie lancée (Jr3) :**

Les différents résultats obtenus après 3 jours du lancement de la première chromatographie des différentes concentrations surchargées sont présentés dans le tableau ci-dessous :

## Résultats et Discussions

Tableau 8 : Résultats de la chromatographie (Jr3)

<i>Conservateurs</i>	Volume m <sup>3</sup>	Température	Références (Echantillons)	Concentration surchargée g/l	Concentration obtenue g/l	Moyenne	Ecart en %
<b><i>K3 EDTA</i></b>	<b>4</b>	<b>T 22 °C</b>	Vial 1	0	0	0	0%
			Vial 2	0.2	0.16	0.18	80%
			Vial 3	0.5	0.46	0.48	92%
		<b>T 5 °C</b>	Vial 4	0	0	0	0%
			Vial 5	0.2	0.19	0.19	95%
			Vial 6	0.5	0.49	0.49	98%
<b><i>FLUORURE OXALATE</i></b>	<b>4</b>	<b>T 22 °C</b>	Vial 7	0	0	0	0%
			Vial 8	0.2	0.15	0.17	75%
			Vial 9	0.5	0.39	0.44	78%
		<b>T 5 °C</b>	Vial 10	0	0	0	0%
			Vial 11	0.2	0.16	0.18	80%
			Vial 12	0.5	0.42	0.46	84%
<b><i>EDTA SODIUM FLUORIDE</i></b>	<b>4</b>	<b>T 22 °C</b>	Vial 13	0	0	0	0%
			Vial 14	0.2	0.17	0.18	85%
			Vial 15	0.5	0.47	0.48	94%
		<b>T 5 °C</b>	Vial 16	0	0	0	0%
			Vial 17	0.2	0.19	0.19	95%
			Vial 18	0.5	0.48	0.49	96%
<b><i>NAF+K2OX</i></b>	<b>4</b>	<b>T 22 °C</b>	Vial 19	0	0.004	0.002	0%
			Vial 20	0.2	0.16	0.18	80%
			Vial 21	0.5	0.45	0.47	90%
		<b>T 5 °C</b>	Vial 22	0	0	0	0%
			Vial 23	0.2	0.19	0.19	95%
			Vial 24	0.5	0.49	0.49	98%

### ⇒ **Interprétation :**

D'après les résultats présentés dans le tableau ci-dessus (tableau 3), Nous observons :

#### **Pour le premier conservateur K3 EDTA :**

- Température 22 °C et température 5 °C :
  - Pour les deux stress nous observons qu'il n'y a pas eu de production d'éthanol pour l'échantillons à blanc et qu'il n'y a pas eu une grande différence significative des concentrations d'éthanol pour les échantillons initialement dopés a 0,2g/l et 0,5g/l
  - L'écart en pourcentage pour la concentration 0 g/l est nul, pour la concentration 0,2 g/l est estimé à 80 % pour la température 22°C et 95% pour 5 ° C et pour la concentration 0,5 g/l il est à 92% pour la température 22°C et 98% pour la température 5°C.

#### **Pour le deuxième conservateur FLUORURE OXALATE :**

- Température 22 °C :
  - Nous remarquons qu'il n'y a pas eu de production d'éthanol pour les échantillons à blanc et qu'il y a une différence significative entre les concentrations surchargées (0,2g/l, 0,5g/l) et les concentrations obtenues (0,15g/l, 0,39 g/l), à savoir qu'il a eu une diminution significative par rapport aux concentrations initiales à un niveau de 75% et 78% respectivement.
- Température 5 °C :
  - Nous remarquons qu'il n'y a pas eu de production d'éthanol pour l'échantillon à blanc et il a eu une différence significative entre les concentrations surchargées (0,2 g/l, 0,5 g/l) et les concentrations obtenues (0,16, 0,42g/l) à savoir qu'il a eu une diminution significative par rapport aux concentrations initiales à un niveau de 80% et 84%.

### **Pour le troisième conservateur EDTA/SODIUM FLUORIDE :**

- Température 22 °C et température 5 °C :
  - Pour les deux stress nous observons qu'il n'y a pas eu de production d'éthanol pour l'échantillon à blanc et qu'il n'y a pas eu une grande différence significative des concentrations d'éthanol pour les échantillons initialement dopés à 0,2g/l et 0,5g/l .
  - L'écart en pourcentage pour la concentration 0 g/l est nul, pour la concentration 0,2 g/l est estimé à 85 % pour la température 22°C et 95% pour 5°C et pour la concentration 0,5 g/l il est à 94% pour la température 22°C et 95% pour la température 5°C.

### **Pour le quatrième conservateur NAF K2OX :**

- Température 22 °C et température 5 °C :
  - Pour les deux stress nous observons qu'il n'y a pas eu de production d'éthanol pour l'échantillon à blanc et qu'il n'y a pas eu une grande différence significative des concentrations d'éthanol pour les échantillons initialement dopés à 0,2g/l et 0,5g/l .
  - L'écart en pourcentage pour la concentration 0 g/l est nul, pour la concentration 0,2 g/l est estimé à 80 % pour la température 22°C et 95% pour 5 ° C et pour la concentration 0,5 g/l il est à 90% pour la température 22°C et 98% pour la température 5°C.

### **3.3 Résultats de la troisième, quatrième et cinquième chromatographie lancée (Jr7), (Jr10) et (Jr14)**

Les différents résultats obtenus après 7, 10 et 14 jours du lancement de la première chromatographie des différentes concentrations surchargés sont présentées dans les tableaux ci-dessous :

## Résultats et Discussions

Tableau 9 : Résultats de la chromatographie (Jr7)

Conservateurs	Volume m <sup>3</sup>	Température	References (Echantillons)	Concentration surchargée g/l	Concentration obtenue g/l	Moyenne	Ecart en %
<b>K3 EDTA</b>	<b>4</b>	<b>T 22 °C</b>	Vial 1	0	0	0	0%
			Vial 2	0.2	0.13	0.16	65%
			Vial 3	0.5	0.44	0.47	88%
		<b>T 5 °C</b>	Vial 4	0	0	0	0%
			Vial 5	0.2	0.19	0.19	95%
			Vial 6	0.5	0.49	0.49	98%
<b>FLUORURE OXALATE</b>	<b>4</b>	<b>T 22 °C</b>	Vial 7	0	0	0	0%
			Vial 8	0.2	0.11	0.15	55%
			Vial 9	0.5	0.31	0.4	62%
		<b>T 5 °C</b>	Vial 10	0	0	0	0%
			Vial 11	0.2	0.13	0.16	65%
			Vial 12	0.5	0.39	0.44	78%
<b>EDTA SODIUM FLUORIDE</b>	<b>4</b>	<b>T 22 °C</b>	Vial 13	0	0	0	0%
			Vial 14	0.2	0.16	0.18	80%
			Vial 15	0.5	0.47	0.48	94%
		<b>T 5 °C</b>	Vial 16	0	0	0	0%
			Vial 17	0.2	0.19	0.19	95%
			Vial 18	0.5	0.48	0.49	96%
<b>NAF+K2OX</b>	<b>4</b>	<b>T 22 °C</b>	Vial 19	0	0	0	0%
			Vial 20	0.2	0.14	0.17	70%
			Vial 21	0.5	0.39	0.44	78%
		<b>T 5 °C</b>	Vial 22	0	0	0	0%
			Vial 23	0.2	0.19	0.19	95%
			Vial 24	0.5	0.49	0.49	98%

## Résultats et Discussions

Tableau 10 : Résultats de la chromatographie (Jr10)

<i>Conservateurs</i>	Volume m <sup>3</sup>	Température	Références (Echantillons)	Concentration surchargée g/l	Concentration obtenue g/l	Moyenne	Ecart en %
<i>K3 EDTA</i>	4	T 22 °C	Vial 1	0	0	0	0%
			Vial 2	0.2	0.13	0.16	65%
			Vial 3	0.5	0.46	0.48	92%
		T 5 °C	Vial 4	0	0	0	0%
			Vial 5	0.2	0.17	0.18	85%
			Vial 6	0.5	0.46	0.48	92%
<i>FLUORURE OXALATE</i>	4	T 22 °C	Vial 7	0	0	0	0%
			Vial 8	0.2	0.07	0.13	35%
			Vial 9	0.5	0.22	0.36	44%
		T 5 °C	Vial 10	0	0	0	0%
			Vial 11	0.2	0.13	0.16	65%
			Vial 12	0.5	0.37	0.43	74%
<i>EDTA SODIUM FLUORIDE</i>	4	T 22 °C	Vial 13	0	0	0	0%
			Vial 14	0.2	0.16	0.18	80%
			Vial 15	0.5	0.47	0.49	98%
		T 5 °C	Vial 16	0	0	0	0%
			Vial 17	0.2	0.18	0.19	90%
			Vial 18	0.5	0.47	0.48	95%
<i>NAF+K2OX</i>	4	T 22 °C	Vial 19	0	0	0	0%
			Vial 20	0.2	0.13	0.16	65%
			Vial 21	0.5	0.36	0.43	72%
		T 5 °C	Vial 22	0	0	0	0%
			Vial 23	0.2	0.18	0.19	90%
			Vial 24	0.5	0.47	0.48	94%

## Résultats et Discussions

Tableau 11 : Résultats de la chromatographie (Jr14)

Conservateurs	Volume m <sup>3</sup>	Température	Références (Echantillons)	Concentration surchargée g/l	Concentration obtenue g/l	Moyenne	Ecart en %
<b>K3 EDTA</b>	<b>4</b>	<b>T 22 °C</b>	Vial 1	0	0	0	0%
			Vial 2	0.2	0.12	0.16	60%
			Vial 3	0.5	0.43	0.46	86%
		<b>T 5 °C</b>	Vial 4	0	0	0	0%
			Vial 5	0.2	0.16	0.18	80%
			Vial 6	0.5	0.45	0.47	90%
<b>FLUORURE OXALATE</b>	<b>4</b>	<b>T 22 °C</b>	Vial 7	0	0	0	0%
			Vial 8	0.2	0.02	0.11	10%
			Vial 9	0.5	0.12	0.31	24%
		<b>T 5 °C</b>	Vial 10	0	0	0	0%
			Vial 11	0.2	0.11	0.15	55%
			Vial 12	0.5	0.30	0.4	60%
<b>EDTA SODIUM FLUORIDE</b>	<b>4</b>	<b>T 22 °C</b>	Vial 13	0	0	0	0%
			Vial 14	0.2	0.14	0.17	70%
			Vial 15	0.5	0.46	0.48	92%
		<b>T 5 °C</b>	Vial 16	0	0	0	0%
			Vial 17	0.2	0.17	0.18	85%
			Vial 18	0.5	0.47	0.48	94%
<b>NAF+K2OX</b>	<b>4</b>	<b>T 22 °C</b>	Vial 19	0	0	0	0%
			Vial 20	0.2	0.09	0.14	45%
			Vial 21	0.5	0.28	0.39	56%
		<b>T 5 °C</b>	Vial 22	0	0	0	0%
			Vial 23	0.2	0.17	0.18	85%
			Vial 24	0.5	0.46	0.48	92%

⇒ **Interprétation des résultats des trois derniers tableaux (Jr7), (Jr10) et (Jr14) :**

**Pour le premier conservateur K3 EDTA :**

- Température 22 °C :
  - Nous observons qu'il n'y a pas eu de production d'éthanol pour les échantillons à blanc, et pour les échantillons surchargés à une concentration de 0.2 g/l et 0,5 g/l ont montré une diminution significative au cours de ces jours (Jr7, Jr10, Jr14).
  - L'écart en pourcentage pour la concentration 0g/l est nul pour les trois jours (Jr7), (Jr10) et (Jr14).
  - La moyenne de l'écart en pourcentage des échantillons surchargés à une concentration de 0,2g/l est de 63% pour les concentrations de 0,5 g/l elle est de 88%.
- Température 5 °C :
  - Nous observons que les concentrations sont restées stable pour les échantillons surchargés à une concentration de 0.2 g/l et 0,5 g/l au cours de ces jours (Jr7, Jr10, Jr14).
  - L'écart en pourcentage pour la concentration 0g/l est nul pour les trois jours (Jr7), (Jr10) et (Jr14).
  - La moyenne de l'écart en pourcentage des échantillons surchargés à une concentration de 0,2g/l est de 86% pour les concentrations de 0,5 g/l elle est de 93%.

**Pour le deuxième conservateur FLUORURE OXALATE :**

- Température 22 °C :
  - Nous remarquons qu'il n'y a pas eu de production d'éthanol pour les échantillons à blanc, et pour les échantillons initialement dopés à 0,2 et 0,5 g/l ont montré une baisse significative pour Jr7 et Jr10, par ailleurs nous observons pour le quatorzième jour un épuisement presque total de l'éthanol.
  - L'écart en pourcentage pour la concentration 0 est nul pour Jr7, Jr10 et Jr14.
  - La moyenne de l'écart en pourcentage des échantillons inoculés à une concentration de 0,2g/l est de 33%.
  - Les échantillons surchargés à une concentration de 0,5 g/l elle est de 43%.

## Résultats et Discussions

---

- Température 5 °C :
- Nous remarquons qu'il n'y a pas eu de production d'éthanol pour les échantillons à blanc et pour les échantillons initialement dopés à 0,2 et 0,5 g/l ont montré une diminution qui reste légère par rapport au échantillons soumis à un stress de température ambiante.
- L'écart en pourcentage pour la concentration 0 est nul pour Jr7, J10 et Jr14.
- La moyenne de l'écart en pourcentage des échantillons surchargés à une concentration de 0,2g/l est de 61%.
- Les échantillons surchargés à une concentration de 0,5 g/l elle est de 70%.

### **Pour le troisième conservateur EDTA/SODIUM FLUORIDE :**

- Température 22 °C :
- Nous observons qu'il n'y a pas eu de production d'éthanol pour les échantillons à blanc.
- Les échantillons surchargés à une concentration de 0,2g/l sont restés stables au cours des deux jours J7 et J10 puis ont légèrement diminué au quatorzième jour par rapport aux concentrations initiales.
- L'écart en pourcentage pour la concentration 0 est nul pour Jr7, J10 et Jr14.
- La moyenne de l'écart en pourcentage des échantillons surchargés à une concentration de 0,2g/l est de 76% et pour les concentrations de 0,5 g/l elle est de 94%.
- Température 5 °C :
- Nous observons que les concentrations sont restées stable pour les échantillons surchargés à une concentration de 0.2 g/l et 0,5 g/l au cours de ces jours (Jr7, Jr10, Jr14).
- L'écart en pourcentage pour la concentration 0g/l est nul pour les trois jours (Jr7), (Jr10) et (Jr14).
- La moyenne de l'écart en pourcentage des échantillons surchargés à une concentration de 0,2g/l est de 90% pour les concentrations de 0,5 g/l elle est de 94%.

### **Pour le quatrième conservateur NAF K2OX :**

- Température 22 °C :
  - Nous observons qu'il n'y a pas eu de production d'éthanol pour les échantillons à blanc et qu'il n'y a pas eu une grande différence significative des concentrations d'éthanol pour les échantillons initialement dopés à 0,2g/l et 0,5g/l pour les des deux jours J7 et J10 par contre il a eu une baisse significative lors du quatorzième jour.
  - La moyenne de l'écart en pourcentage des échantillons surchargés à une concentration de 0,2g/l est de 60%, et pour une concentration de 0,5 g/l elle est de 68% °C.
  
- Température 5 °C :
  - Nous observons que les concentrations sont restées stable pour les échantillons surchargés à une concentration de 0.2 g/l et 0,5 g/l au cours de ces jours (Jr7, Jr10, Jr14).
  - L'écart en pourcentage pour la concentration 0g/l est nul pour les trois jours (Jr7), (Jr10) et (Jr14).
  - La moyenne de l'écart en pourcentage des échantillons surchargés à une concentration de 0,2g/l est de 90% pour les concentrations de 0,5 g/l elle est de 94%.

### 4. Discussion Générale

#### 4.1 Études des échantillons de sang dans des conditions de stockages différentes :

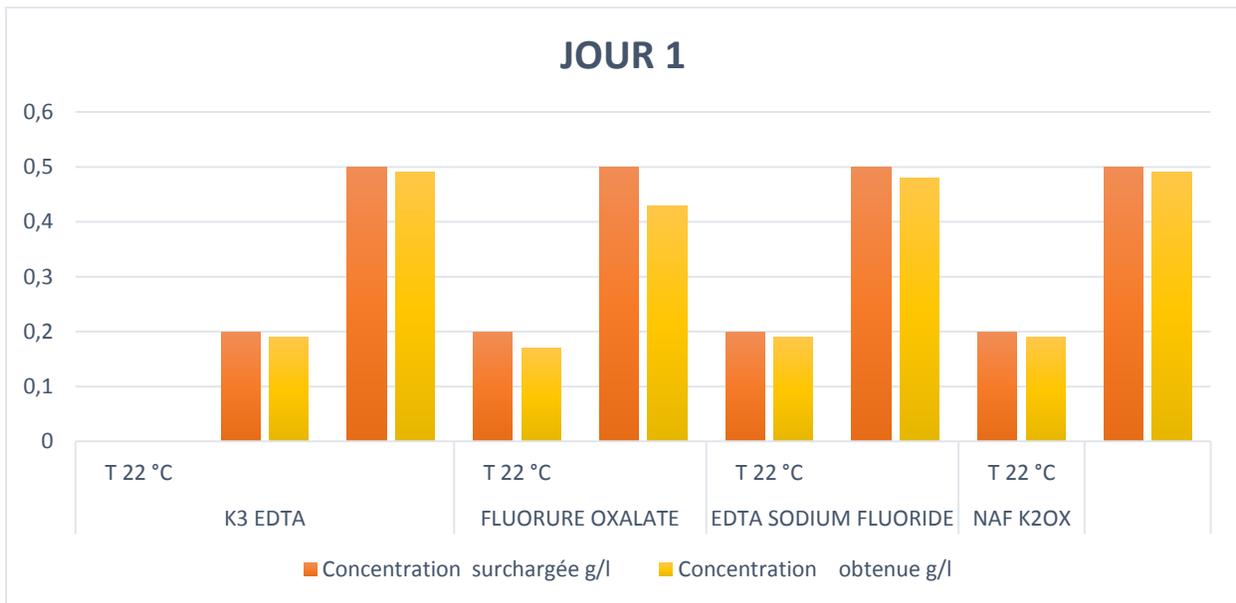
Les conclusions basées sur un seul résultat d'essais peuvent être incorrectes, car une variation aléatoire est inévitable. Il existe de nombreux rapports de littérature affirmant que des changements dans la concentration d'éthanol peuvent se produire pendant le stockage des échantillons entraînant soit une augmentation soit une diminution<sup>45,46</sup>

Il faut cependant noter que la majorité de ces études n'utilisent pas de sang ante-mortem mais plutôt du sang post-mortem ou du sang provenant de banques de sang qui contient du glucose supplémentaire.

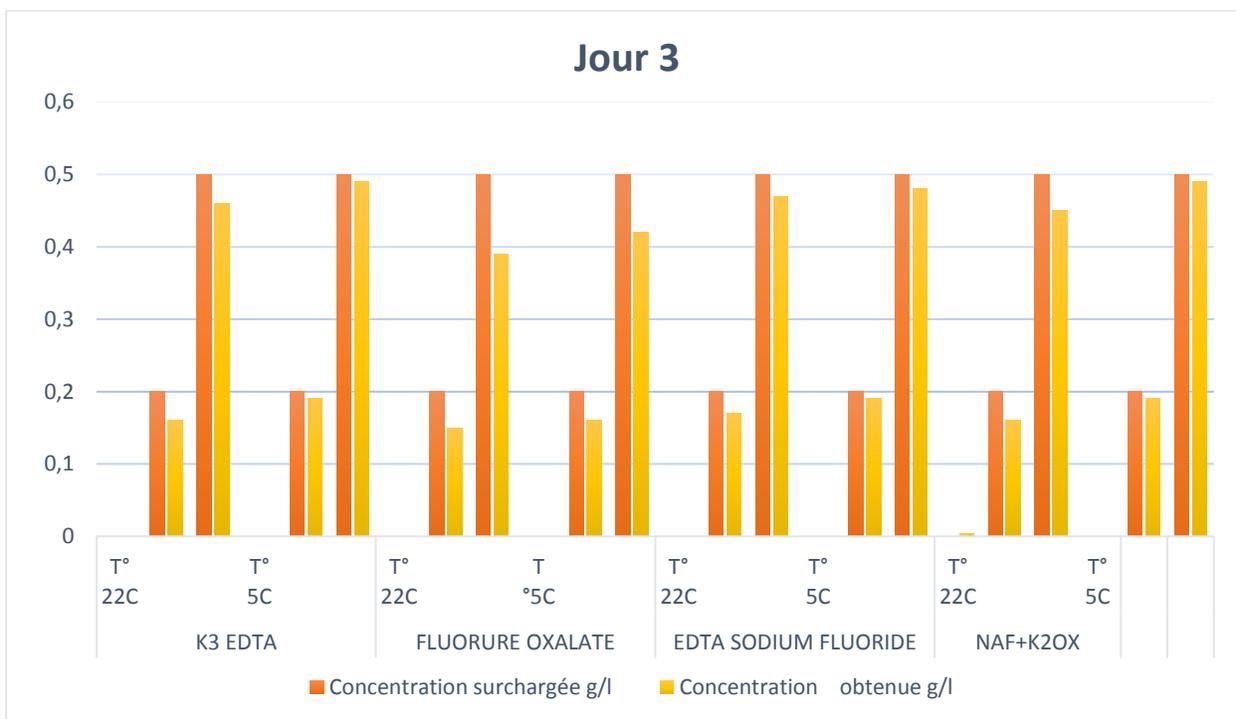
L'augmentation de la concentration d'éthanol pendant le stockage est actuellement utilisée comme moyen de défense pour les résultats de tests d'alcoolémie élevés en Algérie. Cependant, les conditions de stockage, telles que le temps, la température et la présence ou l'absence de NaF jouent un rôle dans la fiabilité des résultats. L'influence de la température sur les taux d'alcoolémie a été étudiée en conservant des échantillons de sang ante-mortem surchargés à l'éthanol stériles à 5° C et 22 ° C. Les échantillons ante-mortem de sang ne contenaient aucun additif à l'exception des conservateurs attendus NaF, K3 EDTA, Fluorure Oxalate, EDTA/sodium Fluoride.

Dans cette étude, les effets de la durée et de la température de stockage sur la concentration d'éthanol ont été étudiés. La première phase de cette étude était de contrôler des échantillons de sang surchargés d'éthanol et conserver dans deux températures jusqu'à 14 jours. Les échantillons ont été analysés quotidiennement du premier jour jusqu'au quatorzième jour. Les valeurs des concentrations d'éthanol dans le sang n'ont pas montré de changements significatifs du premier jour jusqu'au 7eme jour.

## Résultats et Discussions

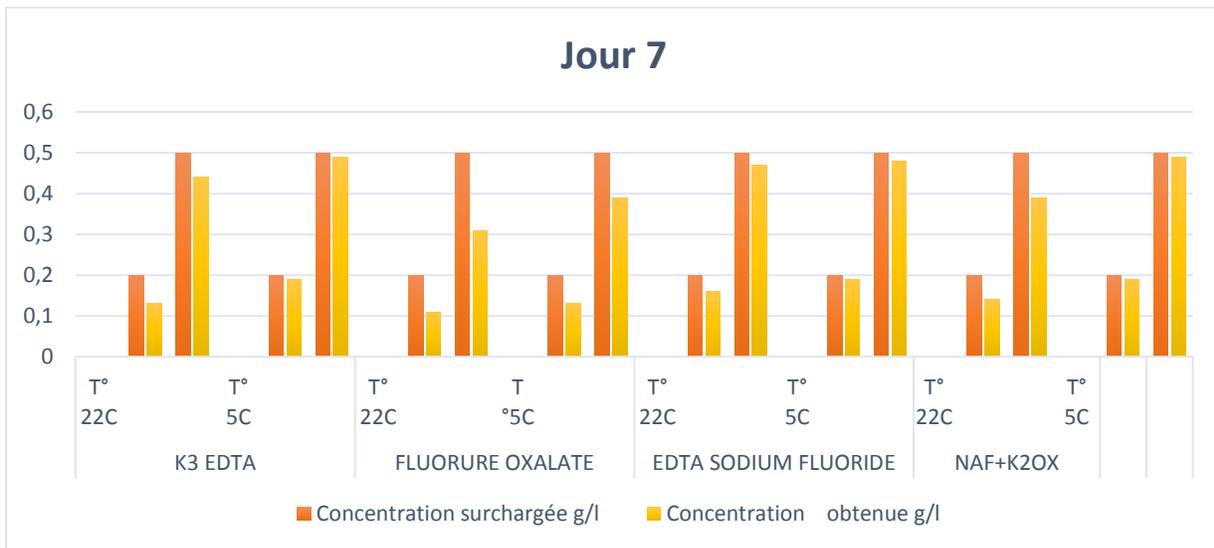


*Figure 7 : Histogramme d'évaluation de la concentration d'éthanol du premier jour en fonction de la température et du conservateur*

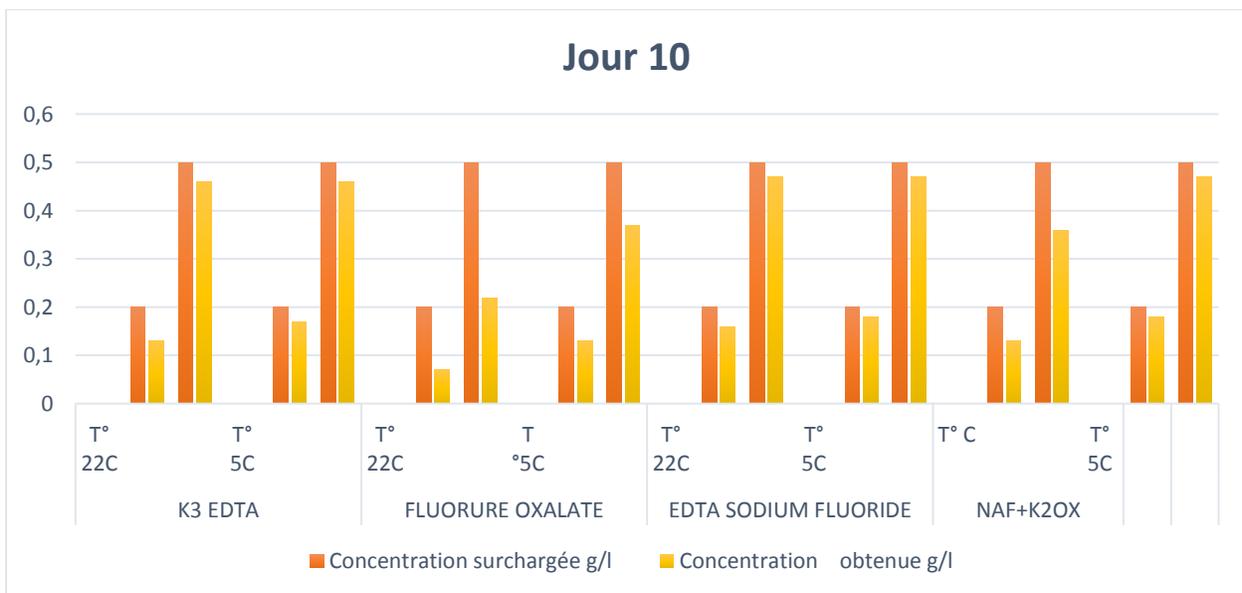


*Figure 8 : Histogramme d'évaluation de la concentration d'éthanol du troisième jour en fonction de la température et du conservateur*

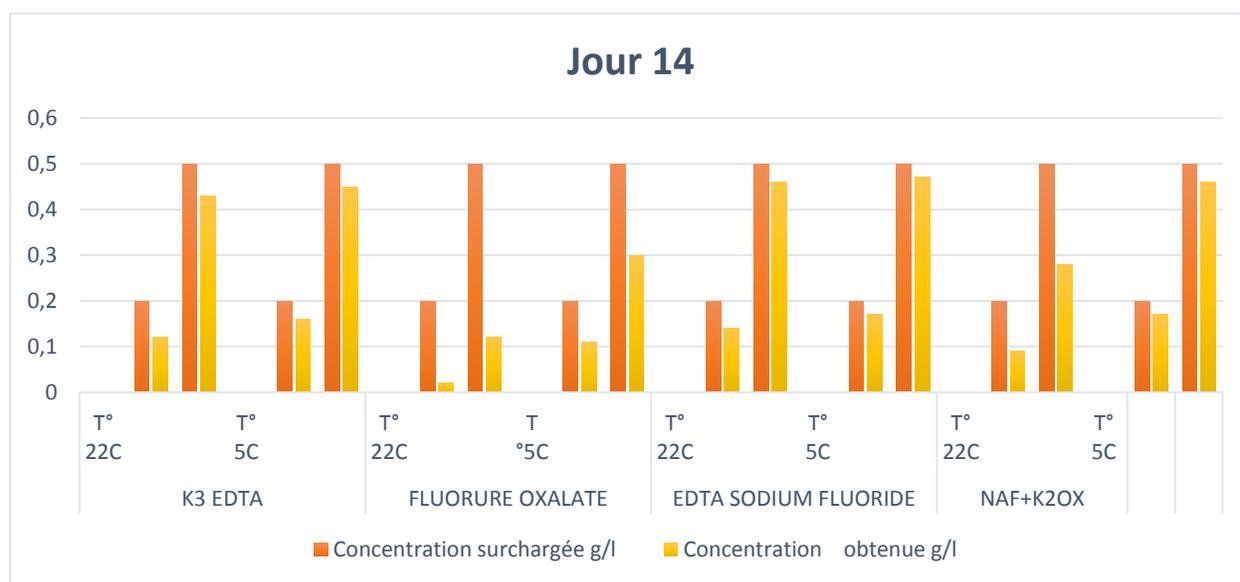
## Résultats et Discussions



*Figure 9 : Histogramme d'évaluation de la conservation d'éthanol du septième jour en fonction de la température et du conservateur*



*Figure 10 : Histogramme d'évaluation de la concentration d'éthanol du dixième jour en fonction de la température et du conservateur*



*Figure 11 : Histogramme d'évaluation de la concentration d'éthanol du quatorzième jour en fonction de la température et du conservateur*

### 4.1.1 Température ambiante à 22 °C avec K3 EDTA

L'expérience à température ambiante a montré que la conservation d'échantillons de sang à température ambiante (22 °C) entraîne une diminution significative des concentrations d'éthanol dans le sang aux deux limites légales dans le temps, indépendamment de la présence ou de l'absence de NaF.

Cependant, il a été montré que la diminution de l'éthanol dans le sang conservé était une réaction d'oxydation d'alcool fortement dépendante de la température qui n'était pas inhibée dû à l'absence du fluorure de sodium. Cette activité d'oxydation d'éthanol réside dans les globules rouges. Il semble donc que la perte d'éthanol dans les échantillons de sang total conservés soit due à une oxydation chimique<sup>47</sup>.

Cette diminution de la concentration d'éthanol soutient aussi l'hypothèse que la dégradation de ce dernier se fait par certains micro-organismes à métabolismes oxydatif non fermentaire du genre *Pseudomonas* en particulier *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* de nombreuses bactéries à gram négatif pourraient également dégrader l'éthanol (genres *Flavobacterium*, *Achromacter*, *Agrobacterium*, *Xanthomonas* ...) ou par des levures telle que *Candida albicans*, la plus souvent rencontrée et qui utilise l'éthanol comme substrat dans la voie glycolytique anaérobie de la fermentation<sup>48,49</sup>. Il est important de noter, cependant, que puisque les concentrations de glucose n'ont pas été surveillées tout au long du stockage, il

## Résultats et Discussions

---

est possible que la concentration de glucose ait diminué dans les échantillons de sang surchargés et le seul substrat restant pour *C. albicans* à utiliser pour la croissance était l'éthanol. Cela peut potentiellement expliquer les baisses de l'éthanol.

### 4.1.2 Réfrigération à 5 °C avec K3 EDTA

Les résultats des tableaux 8, 9, 10 et 11 et des histogrammes montrent que le stockage des échantillons avec K3 EDTA à 5 °C permet d'obtenir des concentrations stables dans la limite de l'incertitude de mesure élargie aux deux limites légales. C'est-à-dire que La stabilité de la concentration en éthanol des échantillons conservés à 5°C en l'absence de NaF est comparable à celle des échantillons stériles conservés à 5°C en présence de NaF.

En résumé, l'expérience de réfrigération a montré que les concentrations d'éthanol dans le sang pour les échantillons stériles, dopées aux deux limites légales, sont restées stables et dans la limite de la tolérance de l'incertitude de mesure élargie à 5°C. En outre, s'il y a eu une présence de micro-organismes cela n'aurait pas d'effet significatif sur les concentrations d'éthanol dans le sang à 5°C. De l'expérience de réfrigération, on peut conclure qu'indépendamment de la présence ou de l'absence de NaF dans les échantillons stériles ou non le stockage des échantillons à 5 °C était suffisant pour stabiliser les concentrations d'alcool dans le sang.

### 4.1.3 Température ambiante à 22 °C avec fluorure oxalate

Les expériences à température ambiante (22 °C) ont montré une baisse significative des concentrations d'éthanol aux deux limites légales inférieures, même en présence du fluorure oxalate, le pourcentage de perte d'alcoolémie est en moyenne de 56% pour une concentration surchargée 0,2g/l et de 52 % pour la concentration 0,5g/l, les échantillons surchargés au niveau de 0,2g/l et 0,5g/l d'éthanol ont montré que l'éthanol était complètement épuisé dans les deux derniers jours, cela confirme la présence de micro-organisme responsable de la dégradation d'éthanol soit par oxydation telles que les *Pseudomonas spp*, qui peuvent cependant dégrader l'éthanol sans pouvoir en synthétiser ou par voie fermentaire où *candida albicans* utilise l'éthanol comme substrat.

Selon plusieurs auteurs, l'hypothèse de présence des *Pseudomonas* a été confirmé par l'apparition d'une couleur verdâtre et une odeur désagréable à partir du douzième jour, on peut déduire à partir de ces résultats et de la fiche technique du tube de prélèvement fluorure oxalate, que la présence des *Pseudomonas* est à l'origine de la qualité du tube (système de fermeture du bouchon par pression), ou de la qualité du conservateur et ça quantité qui peut ne pas être suffisante pour inhiber la prolifération des micro-organismes<sup>40</sup>.

## Résultats et Discussions

---

### 4.1.4 Réfrigération à 5 °C avec fluorure oxalate

Les concentrations d'éthanol obtenues pour les échantillons conservés à 5 °C avec du fluorure oxalate indiquent qu'il y a eu une diminution significative par rapport aux concentrations obtenues des échantillons conservés dans les mêmes conditions (température 5 °C, présence de NaF), Cette diminution est conforme à l'hypothèse de l'oxydation non enzymatique de l'éthanol dans le sang avec l'hémoglobine comme oxydant<sup>50</sup>.

Le pourcentage de perte d'alcoolémie était en moyenne de 34% et 26% respectivement, cela confirme l'hypothèse que la qualité du conservateur en est la cause de cette diminution.

### 4.1.5 Température ambiante à 22 °C avec EDTA Sodium Fluoride

Les expériences correspondantes à température ambiante (22 °C) ont montré une stabilité des concentrations d'éthanol malgré les conditions de température optimales pour la croissance microbienne, Il est donc clair que la présence du sodium fluoride a un effet stabilisateur sur la concentration d'éthanol. Cela est dû au fait que le sodium fluoride inhibe la voie glycolytique anaérobie de la fermentation, tout en entravant sa capacité à métaboliser et à décomposer l'éthanol.

### 4.1.6 Réfrigération à 5 °C avec EDTA Sodium Fluoride

La température à laquelle les échantillons sont conservés à un effet sur la stabilité des concentrations d'éthanol dans le sang. Une température basse (5°C) permet de contrôler la croissance microbienne et, grâce à l'inhibition combinée avec le sodium fluoride, cela permet de stabiliser les concentrations d'éthanol pour qu'elles restent dans les limites de la tolérance de l'incertitude de mesure.

### 4.1.7 Température ambiante à 22 °C avec Fluorure de Sodium et Oxalate de Potassium

Les concentrations d'éthanol pour les échantillons initialement surchargés à 0,20 et 0,50 g/L et stockées à 22 °C avec du NaF sont indiquées dans les tableaux 2, 3, 4, 5, et 6. les échantillons surchargés ont été suivis pendant une a deux semaines.

Les concentrations d'éthanol aux deux limites légales 0,2g/l et 0,5 g/l pour les échantillons stériles stockées à 22 °C avec du NaF+K2OX ont montré une stabilité avec un écart de 71% et de 78% respectivement pour les Cinq jours. Il est donc clair que la présence du sodium fluoride a un effet stabilisateur sur la concentration d'éthanol. Cela est dû au fait que le sodium fluoride inhibe la voie glycolytique anaérobie de la fermentation, tout en entravant sa capacité à métaboliser et à décomposer l'éthanol.

### 4.1.8 Réfrigération à 5 °C avec Fluorure de Sodium et Oxalate de Potassium

Les tableaux 8, 9, 10 et 11 indiquent que les concentrations d'éthanol aux deux limites légales pour les échantillons stériles stockés à 5 °C avec NaF sont restées stable par rapport aux concentrations initiales à une différence significative de 0,02 g/l c'est-à-dire qu'il n'y a pas eu de changement significatif dans la concentration d'éthanol pendant les périodes de surveillance. Les échantillons stériles ont été surveillés pendant 14 jours.

L'expérience en matière de réfrigération permet de conclure que la conservation des échantillons stériles à 5 °C était suffisante pour stabiliser la concentration d'éthanol dans le sang.

## Conclusion Générale

Ce travail mené au niveau de l'institut national de criminalistique et de criminologie avait pour objectif l'étude des facteurs pré-analytiques liés à la stabilité de la concentration d'éthanol pendant le stockage des échantillons d'alcoolémie.

Notre travail nous a donc permis d'étudier les changements des concentrations d'éthanol dans les échantillons de sang aux deux limites 0,2 et 0,5 g/l durant les 14 jours d'analyses à température ambiante (22°C) et à température de réfrigération (5°C) et avec différents conservateurs, cela a été effectué avec une méthode analytique de chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme donnant ainsi différentes concentrations d'éthanol durant cette période de conservation.

D'après les résultats obtenus, les concentrations des échantillons conservés jusqu'au septième jour à température de réfrigération n'ont pas montré de baisse significative sauf pour le fluorure oxalate.

On conclut que les facteurs importants qui ont une influence sur le taux d'alcoolémie sont la température, la concentration et la qualité du fluorure et la durée de stockage. La température était le facteur le plus important de la perte d'alcool ainsi que le type du conservateur, car ils présentent l'une des causes de la croissance des micro-organismes et de la réaction d'oxydation de l'éthanol.

Les résultats de cette étude suggèrent qu'un échantillon de sang total analysé après une exposition à une température élevée peut avoir eu, à l'origine un taux d'alcoolémie plus élevé.

S'il y avait de telles variations du taux d'alcool dans le sang stocké prélevé sur des êtres humains vivants en état d'ébriété, cela présenterait une grave implication médico-légale : les échantillons de sang prélevés sur des sujets humains vivants pour le test légal de sobriété devraient être évalués immédiatement, sinon, une défense juridique pourrait contester la validité des résultats.

Notre travail reste essentiellement exploratoire, et demande à être affiné, complété et généralisé, des études plus approfondies peuvent être menées sur la stabilité de l'éthanol dans des échantillons de sang prélevés ante-mortem et sur le rôle important des microorganismes dans la diminution ou la synthèse de l'éthanol par fermentation microbienne, par ailleurs le toxicologue doit prendre en considération la qualité du tube "fiabilité du conservateur" avant chaque prélèvement. L'utilité de cette information est importante pour le toxicologue légiste qui contribuera par la suite à ses constatations médico-légales.



## Liste des références

- [1] Bowen RAR, Remaley AT. Interférences des composants des tubes de prélèvement sanguin sur des essais de chimie clinique. *Biochem Med (ZAGREB)*. 2014; 24(1):31–44.
- [2] Archer M, Brits M, Prevo-Franzsen D, Quinn L. Sodium aqueux à haute concentration fluorure certifié matériaux de référence à usage médico-légal certifié par titrage complexométrique. *C BIOANALE ANALE*. 2015 ; 407(11):3205–3209.
- [3] Dick G, Stone H. Perte d'alcool due à la contamination microbienne du sang des conducteurs spécimens. *Forensic Sci Int*. 1987 ; 34:17-27.
- [4] Chang J, Kollman SE. L'effet de la température sur la formation de l'éthanol par *CANDIDA ALBICANS* dans le sang. *J Forensic Sci*. 1989;34(1):105-109.
- [5] Blume P, Lakatua DJ. L'effet de la contamination microbienne de l'échantillon de sang sur la détermination des niveaux d'éthanol dans le sérum. *Am J Clin PATHOL*. 1973 ; 60(5) :700–702.
- [6] Corry JEL. Un examen : Sources possibles d'éthanol Ante- et post-mortem : son re-biochimie et la microbiologie de la décomposition. 1978; 44(1):1–56.
- [7] Garriott JC. *MEDICAL-LEGAL Aspects of Alcohol*. quatrième édition. Édition pour les avocats et les juges Company, Inc; 2003.
- [8] Devlin T. *Textbook of Biochemistry with CLINICAL CORRELATIONS*. fifth ed. New York: 2002.
- [9] ISM Copy, introduction à la médecine légale, Introduction à la Médecine Légale, 6e année médecine – Rotation 3 – 2017/2018.
- [10] Dr. Chantal KOHLER. Les cellules sanguines. Université médicale virtuelle francophone, 2010-2011
- [11] Skopp G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. *Forensic Sci Int* 2004 ; 142 : 75–100.
- [12] Lorin de la Grandmaison G, Leterreux M, Lasseguette K, et al. Study of the diagnostic value of iron in fresh water drowning. *Forensic Sci Int* 2006 ; 157 : 117–20.
- [13] J.-C. Alvarez. Prélèvements biologiques *post mortem* et sur le vivant. Traite de toxicologie medico- judiciaire. 2eme. [ed] Elsevier Masson, avril 2012.
- [14] Fiche toxicologique de l'éthanol (FT48). Institut national de recherche et de sécurité. [En ligne] 2011. [Consultation : 15 Avril 2014.]
- [15] Merck & Co. Monographie n°3716: ethyl alcohol. *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. 11ème. [éd.] Merck & Co, 1989. p. 594.
- [16] Lucile BURILLARD, Vincent DAUMAS et al, Les fermentations alimentaires, Les fermentations alimentaires, 2015/2016.
- [17] Mazliak P. Fermentations - Repères chronologiques. [DVD Rom] Encyclopaedia universalis version 10. [éd.] Encyclopaedia universalis, 2004.
- [18] Bacterial physiology and metabolism. McGraw-Hill encyclopedia of science and technology: an international reference work in twenty volumes including an index. 8ème, [éd.] Mc Graw-Hill, 1997. Vol.2, pp 445-445. Alcoholic fermentation.

- [19] Lioret C. Fermentations. [DVD Rom] Encyclopaedia universalis version 10. [éd.] Encyclopaedia universalis, 2004.
- [20] Simic M, Ajdukovic N, Veselinovic I, Mitrovic M, Djurendic-Brenesel M. Endogenous ethanol production in patients with Diabetes Mellitus as a medicolegal problem. *Forensic science international*. 2012, 216, pp. 97-100.
- [21] Logan BK, Jones AW. Endogenous ethanol 'auto-brewery syndrome' as a drunk-driving defence challenge. *Medicine, science and the law*. Juillet 2000, 40(3):206-15.
- [22] Drummer O H. Autopsy, findings / Organic toxins. *Encyclopedia of forensic and legal medicine*. [éd.] Elsevier, 2005.
- [23] Brunet B, Pélissier-Alicot A-L. Redistribution post mortem, interprétation des résultats. *Traité de toxicologie médico-judiciaire*. 2ème, [éd.] Elsevier Masson, avril 2012. pp. 55-56.
- [24] Goullé J-P. Alcoolémie : aspects analytiques et médico-légaux. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2001, Vol. 59, pp. 278-283. 40.
- [25] Mura P, Brunet B. Conduite automobile sous l'influence d'éthanol, de stupéfiants. *Traité de toxicologie médico-judiciaire*. 2ème. [éd.] Elsevier Masson, avril 2012. pp. 551-568.
- [26] Morel I, Anger J-P. Alcool éthylique et éthylisme. *Traité de toxicologie médico-judiciaire*. 2ème. [éd.] Elsevier Masson, avril 2012, pp. 280-298.
- [27] Deveaux M. Alcool éthylique. *Toxicologie et pharmacologie médico-légales*. [éd.] Elsevier, juillet 1998. Collection Option bio. pp. 111-126.
- [28] Jones A W. Alcohol / Post Mortem. *Encyclopedia of forensic sciences*. [éd.] Academic Press, 2000. Vol. 1, pp. 112-126.
- [29] Carey, K B, Hustad J T P. Methods for determining blood alcohol concentration : current and retrospective. *Comprehensive handbook of alcohol related pathology*. [éd.] Elsevier Academic Press, 2004. Vol. 3, pp. 1429-1444.
- [30] Viala A. *Eléments de toxicologie*. [éd.] Technique et documentation Lavoisier, 1998. pp. 209-227.
- [31] A. BOUILLEROT, C. LAVIANO-ROUSSELIN, Dosage d'éthanol : les erreurs pré-analytiques.
- [32] 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.
- [33] Pounder D. Dead sober or dead drunk. *B.M.J.* 1998 ; 316 : 8.
- [34] Smalldon K.-W., Brown G.-A. The stability of ethanol in stored blood. Part II : The mechanism of ethanol oxidation. *Anal. Chim. Acta.* 1973 ,66 :285-90.
- [35] Scaplehorn A.-W. Home Office Centr. Res. Establ. Rep. 1970 ; n°35.
- [36] 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.

- [37] 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.
- [38] Nicloux M. Dosage de l'alcool dans le sang et les tissus putréfiés. *CR Soc. Biol.* 1935 ; 121 : 1301.
- [39] Nicloux M. L'alcool dans le sang putréfié et chez le cadavre. Néof ormation. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1936: XVIII/2: 318-51.
- [40] Laviano C. Production et consommation d'éthanol post-mortem dans deux liquides biologiques. *Ann. Biol. Clin.* 1998; 56: 96-9.
- [41] 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.
- [42] J.-P. BARLET, M.-C. MICHEL, P. LARVOR M. THÉRIEZ. Calcémie, phosphatémie, magnésémie et glycémie comparées de la mère et du nouveau-né chez les ruminants domestiques (vache, chèvre, brebis), Station de Recherches sur l'Élevage des Ruminants, Centre de Recherches de Clermont-Ferrand, I. N. R. A., 63 - Saint-Genès-Champanelle. 1971 ; 415-426.
- [43] Guillaume GEORGE, Jean-Bernard BAUDIN, La chromatographie en phase gazeuse : principe et exemples d'applications, Ecole Normale Supérieure, 12/2017.
- [44] Chang J, Kollman SE. The effect of temperature on the formation of ethanol by *Candida albicans* in blood. *J Forensic Sci.* 1989; 34(1):105–109.
- [45] Winek T, Winek C, Wahba W. The effect of storage at various temperatures on blood alcohol concentration. *Forensic Sci Int.* 1996; 78:179–185.
- [46] G.A. Brown, D. Neylan, W.J. Reynolds and K.W. Smalldon, The stability of ethanol in stored blood. *Anal. Chim. Acta*, 66 (1973) 271 —283.
- [47] O'Neal CL, Poklis A. Production post-mortem d'éthanol et facteurs qui influent interprétation : un examen critique. *Suis J Forensic Med. Pathol.* 1996 ; 17: 8-20.
- [48] Dick G, Stone H. Perte d'alcool résultant de la contamination microbienne du sang des conducteurs spécimens. *Forensic Sci Int.* 1987: 34: 17-27.
- [49] Brown G, Neylan D. The stability of ethanol in stored blood, Part 1 : important variables and interpretation of results. *Anal Chim Acta.* 1973 ; 66:271–283.
- [50] Chen H, Lin W, Ferguson K, Scott B, Peterson C. Studies of the oxidation of ethanol to acetaldehyde by oxyhemoglobin using fluorogenic high performance liquid chromatography alcohol. *Clin Exp Res.* 1994 ; 18:1202–1206.

# **Annexes**

## **Plan des annexes**

**Annexe I :** Propriétés physico-chimique de l'éthanol

**Annexe II :** Appareillages et matériels utilisés

**Annexe III :** Paramètres statistiques utilisés pour les calculs

## Annexe I : Propriété physico-chimiques de l'éthanol

L'éthanol ou alcool éthylique a été identifié au 19ème siècle (2). C'est un liquide, incolore, très mobile, volatil et inflammable, avec une odeur agréable caractéristique et une saveur brûlante. L'éthanol est un alcool primaire de formule brute  $C_2H_6O$ , dont voici les principales caractéristiques physico-chimiques :

- Masse molaire : 46.07 g.mol<sup>-1</sup>
- Densité ( $d_4^{20}$ ) : 0.789
- Densité de vapeur par rapport à l'air : 1.59
- Point de fusion : -114°C
- Point d'ébullition : 78.5 °C

Étant une molécule polaire par sa fonction hydroxyle, l'éthanol est miscible à l'eau et à la plupart des solvants organiques. C'est également un solvant des graisses et des matières plastiques.

## Annexe II : Appareillages/matériels et réactifs utilisés

### Préparation des solutions :

- Préparation de la solution saline (Ss) :



- Préparation de la solution mère d'éthanol :



- Préparation de la solution mère de 1-propanol (étalon interne) (S2)
- Préparation et analyse de la gamme de calibration :



- chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC/FID)



- Support et Matériels Biologique



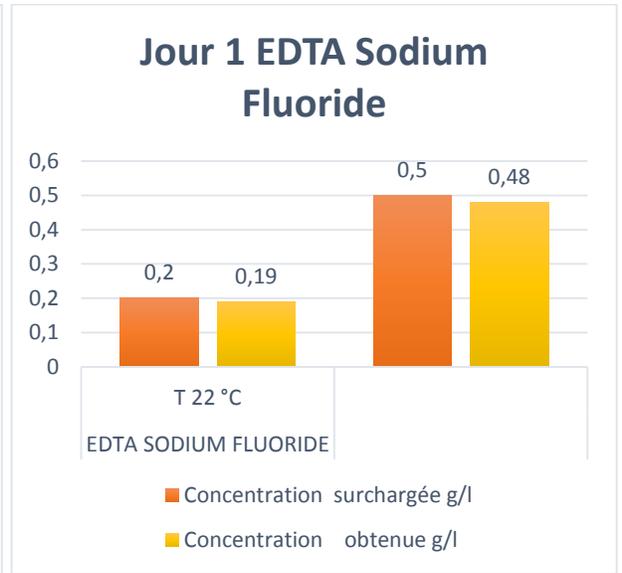
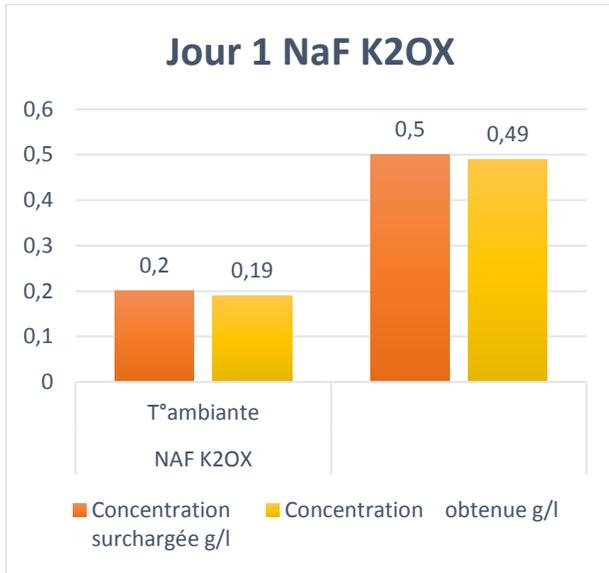
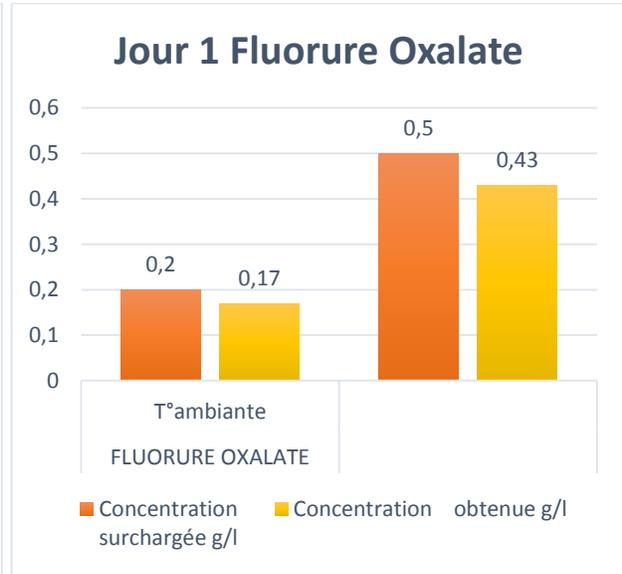
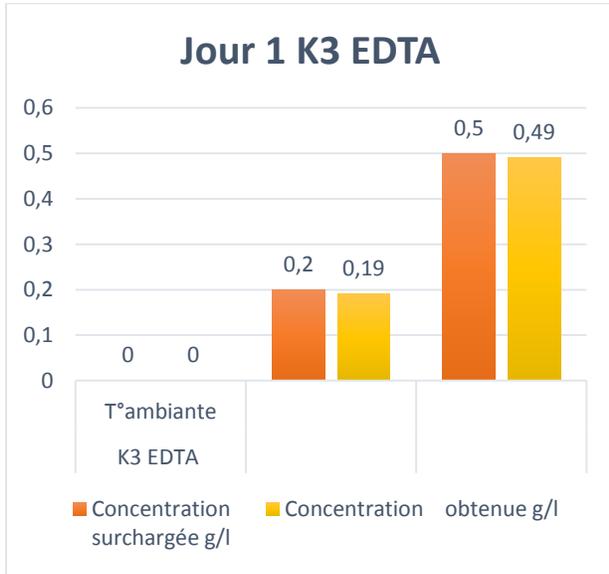
- Préparation des échantillons de sang surchargés

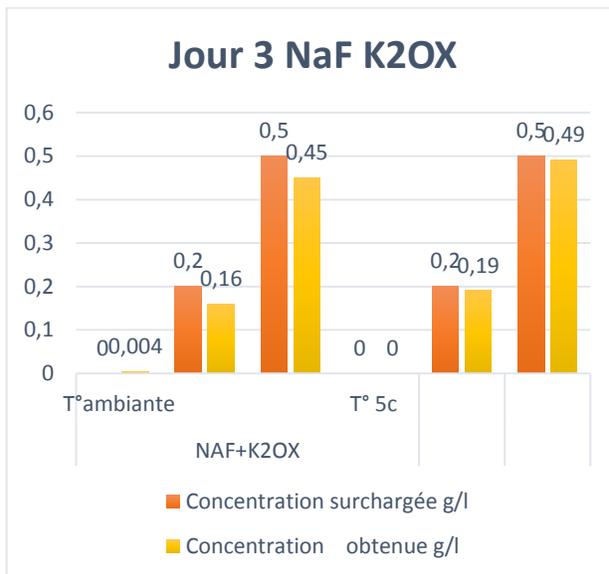
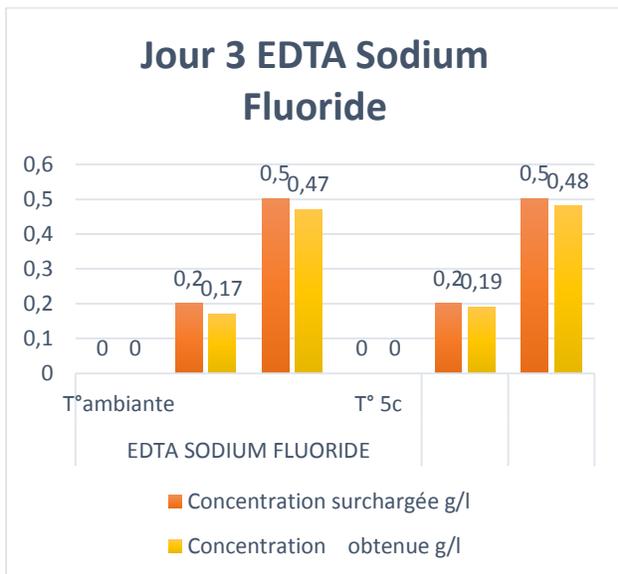
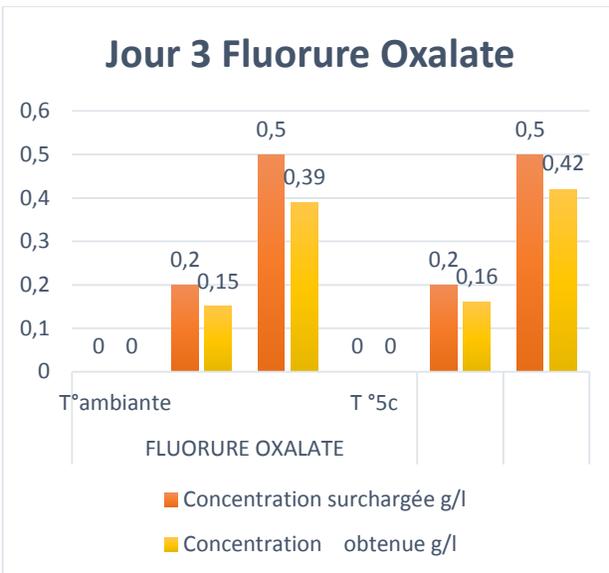
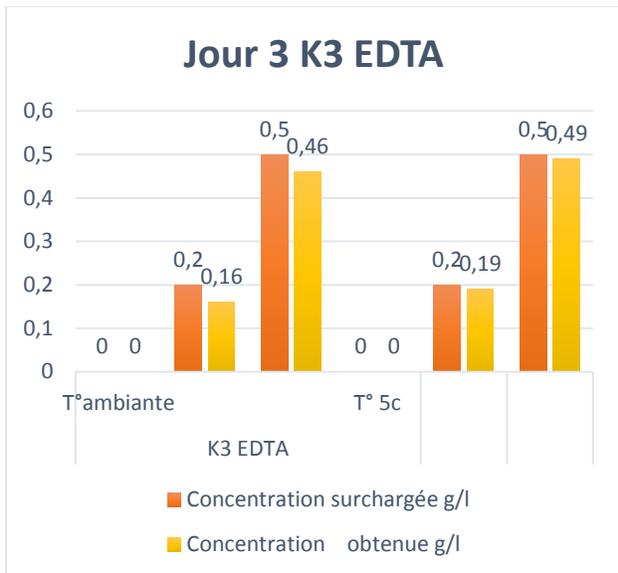


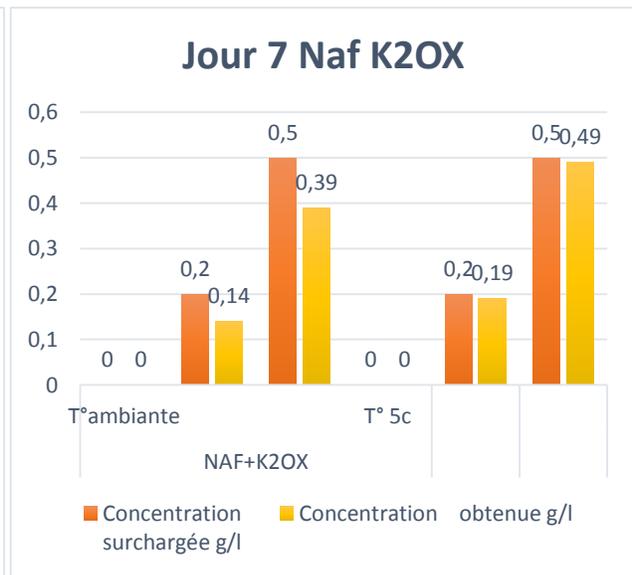
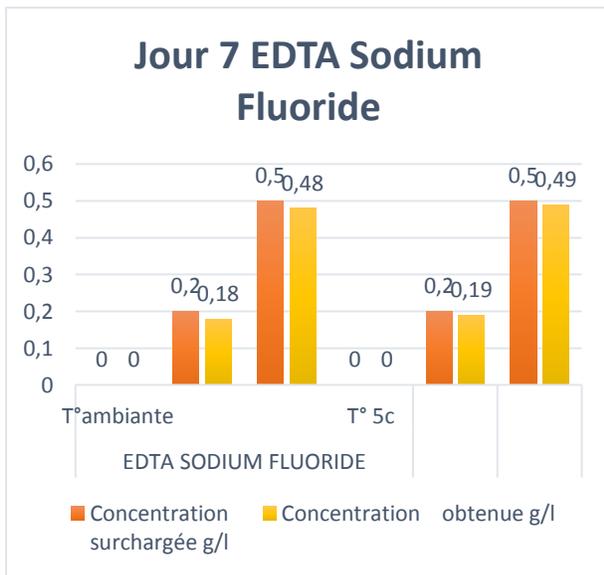
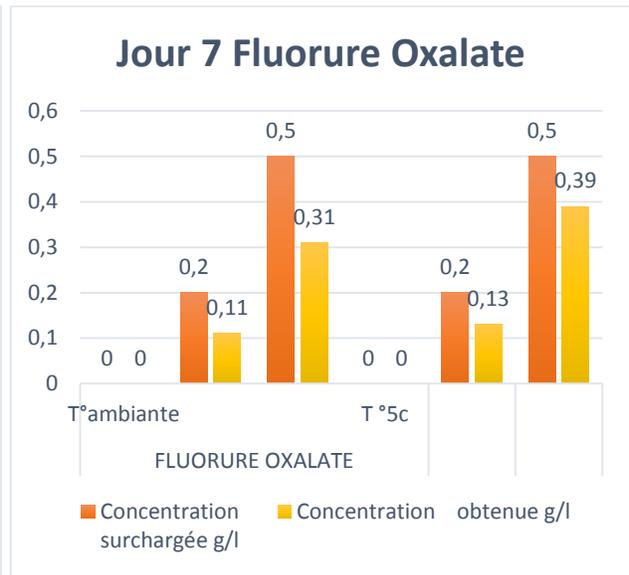
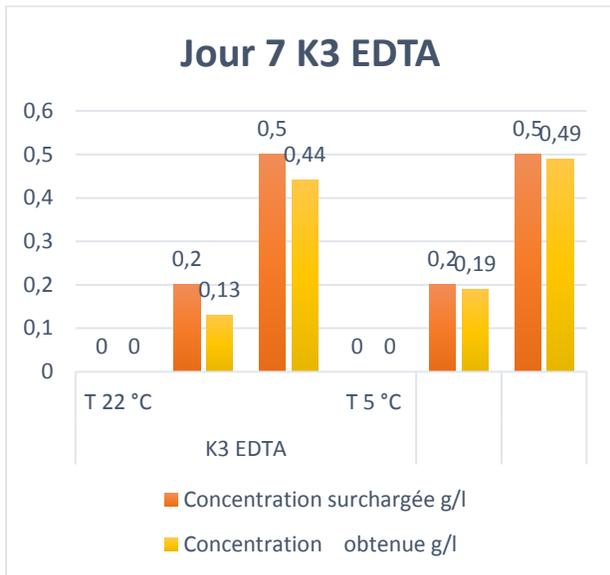
- Préparation des contrôles qualités externes (QC-EXT-1 et QC-EXT-2)

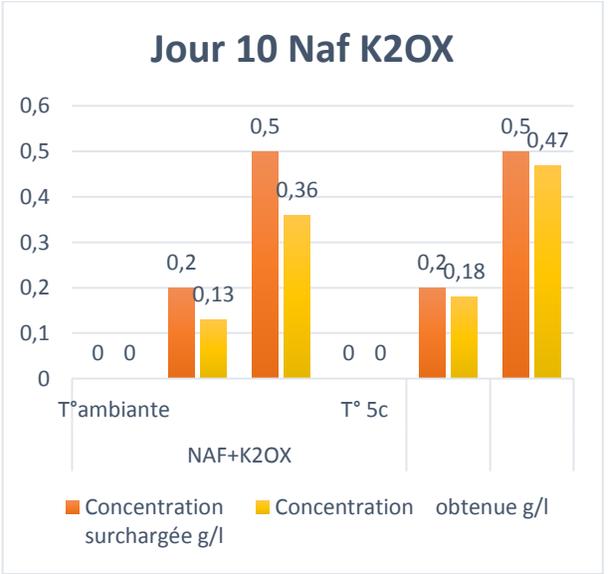
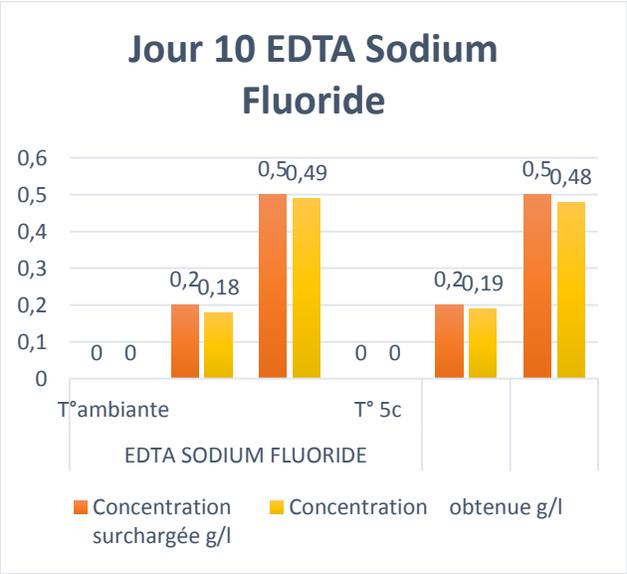
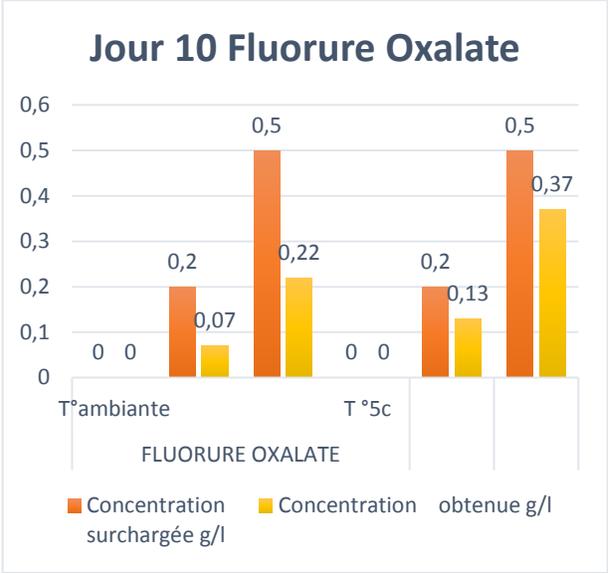
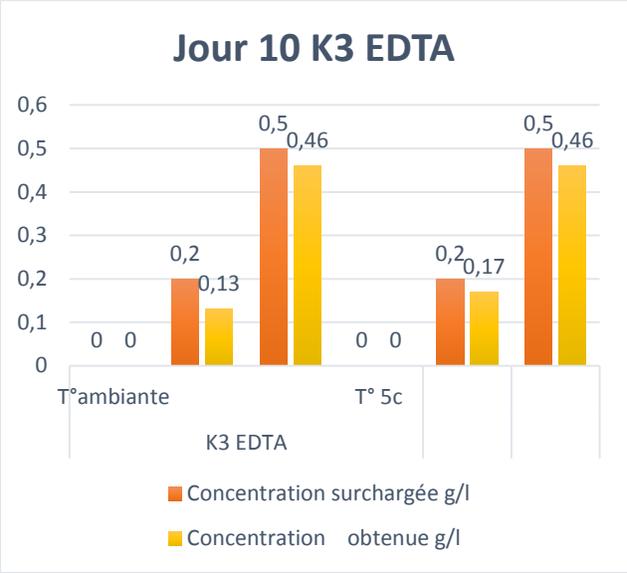


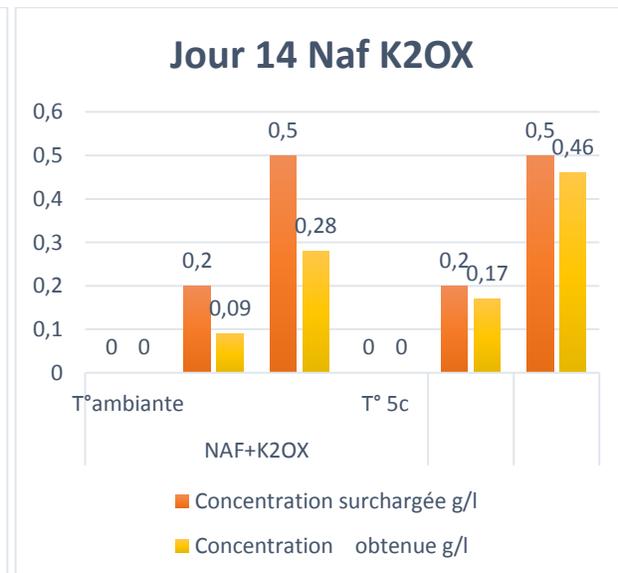
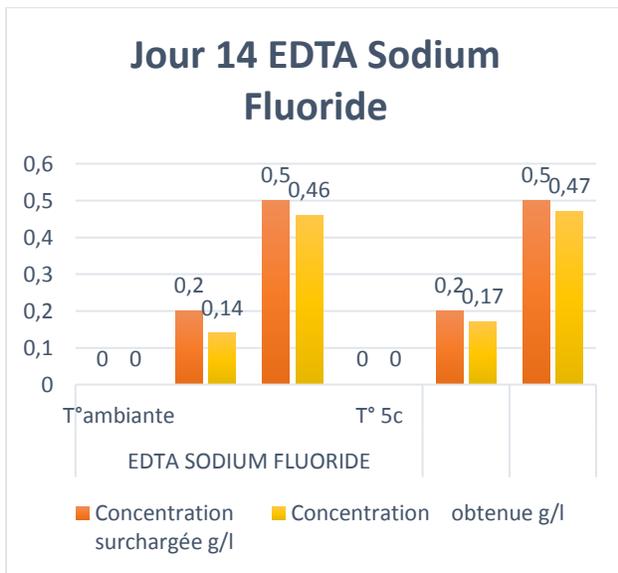
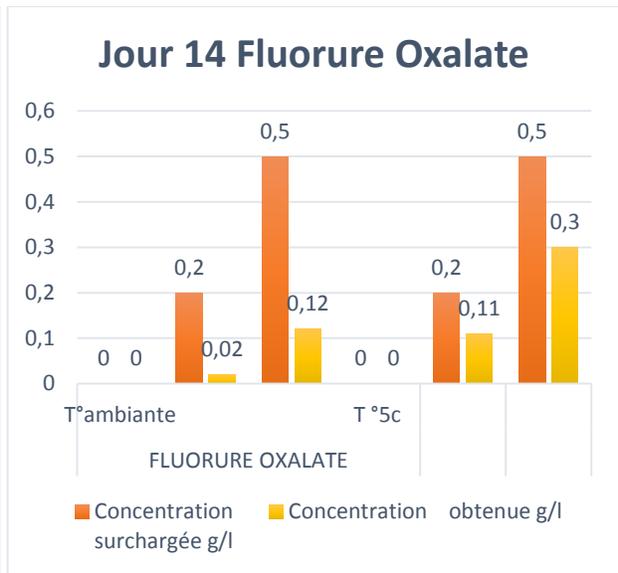
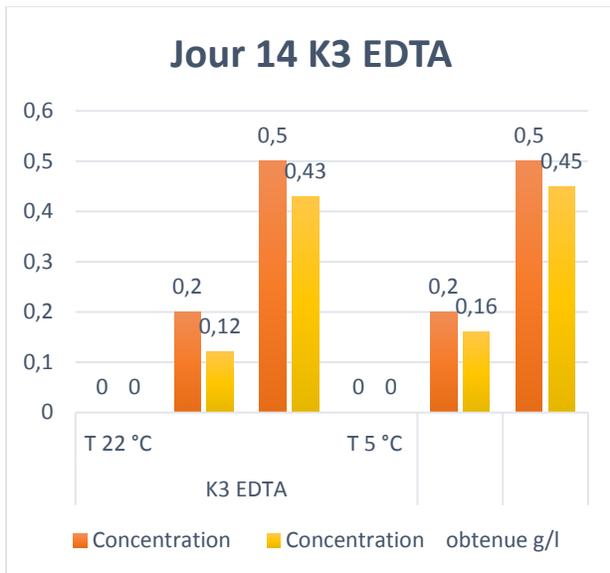
### Annexe III : Paramètres statistiques utilisés pour les calculs











## **Abstract**

The effects of the following factors: time, sodium fluoride concentration, ethanol concentration, temperature of storage and type of container on the ethanol losses from stored cattle blood have been investigated. The sterile cattle blood samples were spiked with ethanol to the legal limits of blood, alcohol concentration of 0.20 g/L and 0.50 g/L and were stored in tubes either in the presence or in the absence of preservatives, over a period of fourteen days under refrigeration (5 °C) and at room temperature (22 °C) to study the stability of the ethanol concentrations over time. Those stored under refrigeration were found to be stable, while a significant decrease in ethanol concentration was observed in those stored at room temperature. The ethanol analyses were performed with a validated internal analytical method of gas chromatography coupled to a flame ionization detector. Ethanol concentrations in stored blood were monitored during the first, third, seventh, tenth and fourteenth day to draw conclusions regarding changes in ethanol concentrations with measurement uncertainty in mind. The important factors were found to be temperature, fluoride concentration and time of storage. A detailed study of the important factors enabled two distinct mechanisms of ethanol loss to be identified. These were a highly temperature-dependent ethanol oxidation reaction which was independent of the ethanol concentration over a wide range, destruction of ethanol by the action of micro-organisms.

## **Key words:**

Gas chromatography, stability of ethanol, sodium fluoride.

## **Résumé**

On examine l'influence de divers facteurs : le temps, l'agent de conservation (fluorure de sodium), la température de stockage, sur les concentrations d'éthanol dans le sang de bovins stockés. Des échantillons de sang stériles ont été enrichis à l'éthanol aux limites légales de concentration d'éthanol dans le sang de 0,20 g/L et 0,50 g/L et ont été conservés dans des tubes en présence ou en absence d'agents de conservations, pendant une période de quatorze jours au réfrigérateur (5 °C) et à température ambiante (22 °C) pour étudier la stabilité des concentrations d'éthanol dans le sang. Ceux qui ont été stockés au réfrigérateur se sont révélés stables, tandis qu'une diminution significative de la concentration d'éthanol a été observée dans ceux qui ont été conservés à température ambiante. Les analyses de l'éthanol ont été effectuées avec une méthode analytique interne validée de chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme. Les concentrations d'éthanol dans le sang stocké ont été suivies pendant le premier, le troisième, le septième, le dixième, et le quatorzième jour pour tirer des conclusions concernant les changements des concentrations d'éthanol en tenant compte de l'incertitude de mesures. Les facteurs les plus importants sont la température, la concentration en fluorure et la durée du stockage. Une étude détaillée de ces facteurs a permis d'établir deux mécanismes distincts de perte d'éthanol : réaction d'oxydation de l'éthanol très dépendante de la température, diminution de l'éthanol par action de micro-organismes.

## **Mots clés :**

Chromatographie en phase gazeuse, stabilité d'éthanol, fluorure de sodium.

## ملخص

ندرس تأثير العوامل المختلفة: الوقت، المادة الحافظة (فلوريد الصوديوم)، درجة حرارة التخزين على تركيزات الإيثانول في دم الماشية المخزن.

تم رفع عينات الدم المعقمة بالإيثانول إلى حدود تركيز الكحول في الدم القانونية البالغة 0.20 جم / لتر و 0.50 جم / لتر وتم تخزينها في أنابيب في وجود أو عدم وجود مواد حافظة لمدة أربعة عشر يوماً في الثلاجة (5 درجات مئوية) وفي درجة حرارة الغرفة (22 درجة مئوية) لدراسة ثبات تركيزات الإيثانول في الدم. تلك التي تم تخزينها في الثلاجة كانت مستقرة، بينما لوحظ انخفاض كبير في تركيز الإيثانول في تلك التي تم تخزينها في درجة حرارة معتدلة.

تم إجراء تحليلات الإيثانول باستخدام طريقة تحليلية داخلية تم التحقق من صحتها الكروماتوغرافيا الغازية مقترنة بكاشف تأين اللهب.

تمت مراقبة تركيزات الكحول في الدم خلال اليوم الأول، الثالث، السابع، العاشر والرابع عشر لاستخلاص استنتاجات حول التغيرات في تركيزات الإيثانول مع مراعاة عدم اليقين في القياس.

أهم العوامل هي درجة الحرارة وتركيز الفلوريد ووقت التخزين. أتاحت دراسة مفصلة لهذه العوامل إنشاء آليتين متميزتين لفقدان الإيثانول: تفاعل أكسدة الإيثانول الذي يعتمد بشكل كبير على درجة الحرارة، وانخفاض الإيثانول بفعل الكائنات الحية الدقيقة.

### الكلمات المفتاحية:

الصوديوم فلوريد ، الإيثانول ثبات ، الكروماتوغرافيا الغازية