HAL open science

Diatomées en médecine et odontologie légale : fiabilité et diffusion passive

Émile Hourqueig

▶ To cite this version:

Émile Hourqueig. Diatomées en médecine et odontologie légale : fiabilité et diffusion passive. Chirurgie. 2015. dumas-01216049

HAL Id: dumas-01216049

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01216049

Submitted on 15 Oct 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bordeaux
Collège des Sciences de la Santé
UFR des Sciences Odontologiques

Année 2015 N° 68

Thèse pour l'obtention du

DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

Présentée et soutenue publiquement par

Emile HOURQUEIG

Né le 07 avril 1990 à BÈGLES (33), France

Le 05 Octobre 2015

Diatomées en médecine et odontologie légale. Fiabilité et diffusion passive

Directeur de thèse

Docteur Christophe BOU

Membres du Jury

Président	Mme M.J. BOILEAU	Professeur des Universités
Directeur	M. C. BOU	Maître de Conférences des Universités
Rapporteur	Mme K. LEVET	Assistante Hospitalo-Universitaire
Assesseur	Mme M.C. BADET	Maître de Conférences des Universités

UNIVERSITE DE BORDEAUX

Président	M.	Manuel TUNON de LARA
Directeur de Collège des Sciences de la Santé	M.	Jean-Luc PELLEGRIN

COLLEGE DES SCIENCES DE LA SANTE
UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE DES SCIENCES ODONTOLOGIQUES

Directrice	Mme	Caroline BERTRAND	58-02
Directrice Adjointe – Chargée de la Formation initiale	Mme	Dominque ORIEZ	58-01
Directeur Adjoint – Chargé de la Recherche	M.	Jean-Christophe FRICAIN	57-02
Directeur Adjoint – Chargé des Relations Internationales	M.	Jean-François LASSERRE	58-02

ENSEIGNANTS DE L'UFR

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mme	Caroline	BERTRAND	Prothèse dentaire	58-02
Mme	Marie-José	BOILEAU	Orthopédie dento-faciale	56-02
Mme	Véronique	DUPUIS	Prothèse dentaire	58-02
M.	Jean-Christophe	FRICAIN	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme	Elise	ARRIVÉ	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
Mme	Cécile	BADET	Sciences biologiques	57-03
M.	Etienne	BARDINET	Orthopédie dento-faciale	56-02
M.	Michel	BARTALA	Prothèse dentaire	58-02
M.	Cédric	BAZERT	Orthopédie dento-faciale	56-02
M.	Jean-Pierre	BLANCHARD	Prothèse dentaire	58-02
M.	Christophe	BOU	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
Mme	Sylvie	BRUNET	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
M.	Sylvain	CATROS	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
M.	Stéphane	CHAPENOIRE	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
M.	Jacques	COLAT PARROS	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
M.	Reynald	DA COSTA NOBLE	Parodontologie	57-01
M.	François	DARQUE	Orthopédie dento-faciale	56-02
M.	François	DE BRONDEAU	Orthopédie dento-faciale	56-02
M.	Yves	DELBOS	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Raphael	DEVILLARD	Odontologie conservatrice- Endodontie	58-01
M.	Emmanuel	D'INCAU	Prothèse dentaire	58-02
M.	Bruno	ELLA NGUEMA	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
M.	Dominique	GILLET	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	Jean-François	LASSERRE	Prothèse dentaire	58-02
M.	Yves	LAUVERJAT	Parodontologie	57-01
Mme	Odile	LAVIOLE	Prothèse dentaire	58-02

M.	Jean-Marie	MARTEAU	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
Mme	Javotte	NANCY	Odontologie pédiatrique	56-01
Mme	Dominique	ORIEZ	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	Jean-François	PELI	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	Philippe	POISSON	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
M.	Patrick	ROUAS	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Johan	SAMOT	Sciences biologiques	57-03
Mme	Maud	SAMPEUR	Orthopédie dento-faciale	56-02
M.	Cyril	SEDARAT	Parodontologie	57-01
Mme	Noélie	THEBAUD	Sciences biologiques	57-03
M.	Eric	VACHEY	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01

ASSISTANTS

Mme	Audrey	AUSSEL	Sciences biologiques	57-03
M.	Terence	BARSBY	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Mme	Aurélie	BARSBY-EL-KHODER	Prothèse dentaire	58-02
M.	Julien	BROTHIER	Prothèse dentaire	58-02
M.	Mathieu	CLINKEMAILLIE	Prothèse dentaire	58-02
M.	Mathieu	CONTREPOIS	Prothèse dentaire	58-02
M.	Guillaume	CRESTE	Prothèse dentaire	58-02
Mme	Clarisse	DE OLIVEIRA	Orthopédie dento-faciale	56-02
Mme	Hélène	DENOST	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
M.	Guillaume	FENOUL	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Mme	Elsa	GAROT	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Nicolas	GLOCK	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
Mme	Sandrine	GROS	Orthopédie dento-faciale	56-02
Mme	Olivia	KEROUREDAN	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-02
Mme	Alice	LE NIR	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
Mme	Karine	LEVET	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
M.	Alexandre	MARILLAS	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	Matthieu	MEYER	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
Mme	Darrène	NGUYEN	Sciences biologiques	57-03
Mme	Virginie	PANNEREC	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
Mme	Chloé	PELOURDE	Orthopédie dento-faciale	56-02
Mme	Candice	PEYRAUD	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Jean-Philippe	PIA	Prothèse dentaire	58-02
M.	Mathieu	PITZ	Parodontologie	57-01
M.	Clément	RIVES	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	François	VIGOUROUX	Parodontologie	57-01

REMERCIEMENTS

À notre Président de thèse

Madame le Professeur Marie-José BOILEAU

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Sous-section Orthodontie 56-02

Veuillez trouver ici, Madame le Professeur, le témoignage de ma profonde gratitude et de mes sentiments les plus respectueux.

À notre Directeur de thèse

Monsieur le Docteur Christophe BOU

Maître de conférences des Universités - Praticien hospitalier

Sous-section Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale 56-03

Veuillez trouver ici, Monsieur, l'expression de ma profonde reconnaissance.

Merci pour tout ce que vous nous avez apporté et appris en clinique et en cours, toujours dans la bonne humeur. Nous avons énormément apprécié votre curiosité sans frontières qui nous a permis de nous éloigner des sentiers classiques de l'odontologie. Merci de m'avoir fait plonger dans le monde des diatomées !

À notre Rapporteur de thèse

Madame le Docteur Karine LEVET

Assistante Hospitalo-Universitaire - Praticien hospitalier

Sous-section Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale 56-03

Je vous remercie d'avoir accepté de corriger ce travail.
Veuillez trouver ici, Madame, le témoignage de ma profonde gratitude.

À notre Assesseur de thèse

Madame le Docteur Marie-Cécile BADET

Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier

Sous-section Sciences Biologiques 57-03

Veuillez trouver ici, Madame, l'expression de mon respect le plus profond.

Merci pour tout ce que vous nous avez apporté en clinique et en cours. Vous avez toujours su nous accueillir avec grande gentillesse dans votre laboratoire ou dans votre jardin pour une petite garden party !

À mes parents,

Merci pour tout. De votre amour est née une magnifique famille, vous avez toujours donné votre maximum pour notre éducation, notre bonheur et vous avez réussi !

À Papa pour ton amour pour la nature, le sport, les choses simples de la vie, à toutes ces valeurs que tu as su nous transmettre, à ta protection et surtout à tout l'amour que tu as pour moi. Merci.

À Maman pour ta patience, ton soutien sans faille dans les moments difficiles, ton gout pour la cuisine et la pâtisserie, à la collectionite que tu m'as transmise et surtout à tout l'amour que tu as pour moi. Merci.

Je vous dédie entièrement ce travail, aboutissement de votre éducation. J'espère que vous êtes fiers de moi.

À mon frère et mes sœurs,

À Loulou, ma grande petite sœur ! Que de bons moments passés ensemble, combien de fou-rires, combien d'engueulades tu as toujours su me protéger et me montrer l'exemple à suivre ! Merci pour tout et vivement la suite !!!

À Bouby, ma petite sœur ! Quoiqu'il se passe tu as toujours le sourire et tu sais toujours me faire rigoler. Que de souvenirs pendant ces trois années de colloc à Bordeaux ! Je sais qu'on passera encore de superbes moments ensemble ! Merci pour tout !

À Polo, mon petit frère ! Le quatrième de la série et pas des moindres ! Toujours raisonné et posé ! Toi aussi tu as toujours été là pour moi on a partagé de superbes moments ensemble et ce n'est pas fini ! Merci pour tout !

À mes grands-parents,

À Grand Maman, vous avez toujours su nous soutenir dans toutes les étapes de la vie, vous avez toujours été derrière nous pour suivre notre évolution. Merci pour ses superbes vacances que vous nous avez offert tous les ans, et merci pour tout ce que vous m'avez transmis. Merci.

À Papé et Mamie, vous avez toujours été très fiers de nous et de vrais moteurs pour nous faire avancer et aller le plus loin possible. Merci pour tout l'amour que vous nous avez donné, pour tout ce temps passé à vous occuper de nous.

À ma Marraine et à mon Parrain,

À Dominique, merci pour tout ce que tu m'as appris et les bons moments passés à Rougeon.

À Brigitte, c'est surement un peu grâce à toi que je fais ce beau métier aujourd'hui ! Merci pour tous les bons moments !

À mes amis,

À Boubouch ! Alala mon petit Boubouch, qu'auraient été les vacations à l'hôpital sans toi, les batailles de permlastic, les soirées au V&B…tout le reste ! Merci pour ton amitié !

À Bégat ! Merci pour les vacances en Espagne, celles au ski, les ronchonades, les cafés tarte-tatin et tout le reste ! Merci pour ton amitié !

À Edouardounet ! A tous les bons moments, le papa du groupe toujours là pour bien nous conseiller et nous protéger ! A la folie de la Belgique à nos heures passées à discuter, aux vacances à Toulon ! Aux fous rires en cours ! Merci pour ton amitié !

À Guitou ! Le vrai-faux Bearnais-Landais-Gersois-Basque on ne sait plus ! J'ai toujours pu compter sur ton franc parler et ta sincérité ! On a passé de supers moments ensemble dans la roue d'un tracteur, dans un fauteuil roulant ou ailleurs ! Merci pour ton amitié

À Pitou ! Mon binôme de toujours ! Merci d'avoir toujours été là pour moi ! Au repas top chef, aux heures passées à l'hôpital, à tous nos petits patients, aux vacances à Nice ! Tu es le seul que j'ai pu trainer braver le vent la pluie le froid sur les plages charentaises à la recherche des ammonites ! Merci pour ton amitié !

À PA ! Qu'auraient été nos soirées dentaires sans ton loft ! Merci pour tous ces bons moments partagés, ta générosité, ta motivation pour tout ! Les parties de baby et les roustes que tu nous as infligé ! Merci pour ton amitié !

À Timtim ! Le mec sur-équipé, fan de ski ! A la randonnée qu'on n'a toujours pas faite ! Merci pour ton amitié !

À Val ! Toujours un coup d'avance sur tout le monde ! Que de bons moments passés ensemble ! Le GOD, les Wei, notre visite bucolique à Saint Cir, nos discussions tour de France ! Les soirées à la colloc ! Merci pour ton amitié !

À Julia et Nadège ! Le binôme de choc qui apportait un peu de gaîté et de bonne humeur à nos vacations hospitalières, les pâtisseries, les potins, les potins et encore les potins ! Merci pour votre amitié !

À Djostin ! A ta bonne humeur permanente, à ta patience et à tous tes bons conseils ! A tes savoureuses crêpes anglaises ! Merci pour ton amitié !

À Fabien (la guigne), Lucas, Mathieu, Stephan (15-2), A Anne Sophie, Aude, Camille, Caro, Cécile, Clémence, Julietto, Louise, Lucie, Mappy, Sisley, Sophie

Aux fous furieux qui cassent des cailloux dans les collines (Camille, Dominique, Hervé…)

À mes cousins et cousines, oncles et tantes merci pour votre amour

Aux étudiants optionnels, notamment Jane pour leur aide précieuse et leur patience !

Table des matières

Introduction 10
1. Description des diatomées 11
1.1. Généralités 11
1.2. Position dans la classification animale et phylogenèse 11
1.2.1. Origine et phylogenèse 11
1.2.2. Classification 12
1.3. Description 13
1.3.1. Cytologie 14
1.3.2. Ecologie 16
1.3.3. Mode de vie 17
1.3.4. Rôle dans les écosystèmes 17
1.3.5. Cycle de vie d'une diatomée 17
1.4. Champs d'application 19
1.4.1. Production et utilisation industrielle des diatomées 19
1.4.2. Investigations et diatomées 20
2. Etat actuel des connaissances sur l'intérêt des diatomées en médecine légale 21
2.1. Difficultés du diagnostic de mort par noyade 21
2.1.1. Définition de la mort par noyade 21
2.1.2. Autres types de décès en milieu aquatique 22
2.1.3. Signes de morts par noyade 23
2.2. Historique du test de la diatomée 25
2.3. Principe général du test de la diatomée 26
2.3.1. Test quantitatif 26
2.3.2. Test qualitatif 27
2.3.3. Mécanisme de diffusion des diatomées 27
2.4. Limites du test de la diatomée 29
2.4.1. Présence ante mortem de diatomées dans l'organisme 29
2.4.2. Perte d'informations au cours de la digestion des tissus au laboratoire 30
2.4.3. Limite en fonction du milieu 31

2.4.4. Hydrocution ou noyade rapide 31
2.4.5. Contamination 31
2.5. Test de la diatomée, temps d'immersion et diffusion passive 32
2.5.1. Diffusion des diatomées 32
2.5.2. Etude de Svetislav & Al. (2002) 33
2.5.3. DiGiancamillio & Al. (2010) 34
2.5.4. Etude de Xu & Al. (2011) 34
2.5.5. Etude de Lunetta & Al. 2013 35
2.5.6. Etude de Lin & Al. (2014) 35
3. Protocoles expérimentaux 36
3.1. Expérimentation 1 : analyse des diatomées présentes dans le cours d'eau 36
3.1.1. Objectifs 36
3.1.2. Choix du cours d'eau 36
3.1.3. Prélèvements 36
3.1.4. Digestion 37
3.1.5. Montage 37
3.1.6. Observations 37
3.1.7. Vérification de la présence de diatomées dans le cours d'eau durant toute la durée des expérimentations 38
3.2. Expérimentation 2 : Test de la diatomée sur des os et des dents immergés durant une longue durée dans l'eau 39
3.2.1. Objectif 39
3.2.2. Echantillons 39
3.2.3. Dispositif 40
3.2.4. Prélèvements 41
3.2.5. Analyse 41
3.3. Qualité et évaluation des risques de contamination croisée 43
3.3.1. Echantillons 44
3.3.2. Réactifs 44
3.3.3. Matériel utilisé 44
4. Résultats 45

4.1. Analyse et identification des diatomées du cours d'eau 45
4.2. Tableau récapitulatif des différentes analyses effectuées 46
4.3. Résultats sur os sectionnés 46
4.4. Résultats sur os fissurés 47
4.5. Résultats sur os intacts 48
4.6. Résultats obtenus sur la pulpe dentaire 49
5. Discussion 51
5.1. Diffusion passive des diatomées 51
5.1.1. Sur os non intact 51
5.1.2. Sur os intact 51
5.1.3. Dans la pulpe dentaire 52
5.2. Risques de contaminations et faux négatifs 53
5.3. Transposabilité de nos expérimentations à l'homme et à la réalité des faits 53
5.3.1. Utilisation de modèles animaux 53
5.3.2. Absence de tissus autour des os 54
5.3.3. Conditions réelles d'expérimentation 54
5.3.4. Techniques de laboratoire 55
5.4. Perspectives et études à réaliser 55
6. Conclusion 56
Table des illustrations 57
Bibliographie 58

Introduction

En France, une personne meurt de noyade toutes les 9 heures environ ce qui représente aux alentours de 900 décès par an. La mort par noyade est la troisième cause de décès accidentel après les accidents de la voie publique et les chutes.

Suite à une disparition, lorsqu'un corps est retrouvé dans l'eau, il est toujours délicat, en l'absence de témoins lors des faits, de connaître le *modus operandi* du décès. La personne s'est elle noyée ou est elle décédée hors de l'eau puis jetée ou tombée à l'eau ? Le diagnostic positif de mort par noyade doit être recherché.

Cependant, ce diagnostic est l'un des plus difficiles à établir en médecine légale. En effet, les corps sont souvent retrouvés après des séjours d'immersion plus ou moins longs dans l'eau et sont alors dans des états de putréfaction avancée. Dès lors, aucun signe anatomique n'est caractéristique de la noyade. Il faut donc s'orienter vers d'autres solutions diagnostiques.

Le test de la diatomée est encore aujourd'hui considéré par certains légistes comme étant le gold standard pour établir le diagnostic de noyade. Ce test utilisé depuis des années est quasi-systématiquement sollicité dans les cas de mort par noyade. Cependant la validité du test est soumise à de nombreux facteurs et variables pouvant conduire à des erreurs de diagnostic, de fait ce test reste aujourd'hui controversé.

Le but de notre travail est de réaliser le test de la diatomée en faisant varier certains de ces facteurs et variables et d'évaluer son efficacité et sa précision. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'étanchéité de la corticale osseuse en fonction du temps d'immersion : les diatomées peuvent-elles traverser la corticale d'un os resté longtemps dans l'eau et coloniser la moelle osseuse ? Les tests ont également été réalisés sur la pulpe dentaire afin d'ouvrir le test de la diatomée vers de nouveaux horizons.

Après de brefs rappels généraux sur les diatomées et sur la noyade, nous expliquerons en détail le test de la diatomée. Nous aborderons ensuite la partie expérimentale (protocole, résultats, discussion) avant de conclure.

1. Description des diatomées

1.1.Généralités

Les diatomées sont des micro-algues brunes unicellulaires pourvues d'un exosquelette en silice. Elles sont présentes dans tous les milieux aquatiques où elles adoptent différents modes de vie. Leur spectre de taille varie de 0,2µm à 1mm. Elles ont des formes et des tailles très différentes ce qui permet de les distinguer et d'établir leur identification spécifique.[1-3]

Figure 1 : Amphora pediculis (Photo : E. Hourqueig)

Les diatomées jouent un rôle primordial dans les écosystèmes aquatiques et constituent la majeure partie du phytoplancton. Elles sont à la base des chaînes alimentaires pour de nombreuses espèces.

L'homme a su trouver dans les diatomées de nombreuses utilisations allant de la conchyliculture à la production d'antibiotiques en passant par la médecine légale.

1.2.Position dans la classification animale et phylogenèse

1.2.1. Origine et phylogenèse

Les plus vieilles diatomées fossilisées ont été retrouvées dans des sédiments du début du Jurassique (210 millions d'années). Mais leur formation remonte probablement à la crise Permien-Trias (250 millions d'années).[1]

Leur apparition résulte probablement du résultat de deux endosymbioses successives.

Dans un premier temps, une cyanobactérie pénètre dans une cellule hôte hétérotrophe. De cette endosymbiose seraient nées les algues brunes et les algues rouges.

Au cours de la seconde endosymbiose, une algue rouge et une algue verte pénètrent dans une nouvelle cellule hétérotrophe eucaryote. Une partie des composants de l'algue verte ont, par la suite, été rejetés donnant ainsi naissance à la première vraie diatomée.

Ces endosymbioses ont probablement eu lieu dans un milieu maritime. Les ancêtres des diatomées ou pré-diatomées sont donc d'origine marine. Ce seraient les modifications de niveau de la mer et notamment les régressions marines qui auraient entrainé, par phénomène d'adaptation à un environnement semi-terrestre, la mise en place de l'exosquelette ou frustule propre aux diatomées.[1]

1.2.2. Classification

Depuis leur apparition, les diatomées se sont énormément diversifiées. Dans la classification moderne des espèces, les diatomées sont contenues au sein de la super classe des Bacillariophyta.

De manière descendante, les diatomées sont classées de la façon suivante : (classification simplifiée)

- Domaine : 'Eukaryota' *(Whittaker & Margulis, 1978)*
- Règne : 'Chromalveolata' *(Adl & Al., 2005)*
- Division : 'Stramenopiles' *(Patt, 1989)*
- Embranchement : 'Ochrophyta' *(Caval, 1995)*
- Super classe : 'Bacillariophyta' *(Engl & Gilg, 1924)*

Les diatomées sont le groupe d'algues le plus riche en nombre d'espèces.[2] On compte actuellement environ 100 000 espèces de diatomées[5] mais il en existe sûrement plus (jusqu'à 200 000 selon certains auteurs)[2].

La taxonomie et la classification des espèces de diatomées ont énormément évolué au fil des années et du progrès de la science. Autrefois la taxonomie était basée uniquement sur l'observation au microscope optique. Aujourd'hui, le microscope électronique, l'observation de matériel vivant et la biologie moléculaire ont complètement modifié la taxonomie et la classification.[2]

Au sein de la super classe des Bacillariophyta, on retrouve trois classes principales. (Figure 2)

- Bacillariophyceae : diatomées pennées avec raphé,
- Fragilariopyceae : diatomées pennées sans raphé,
- Coscinodiscophyceae : diatomées centriques.

Ces classes sont elles-mêmes divisées en ordres, sous-ordres, familles, genres, espèces.

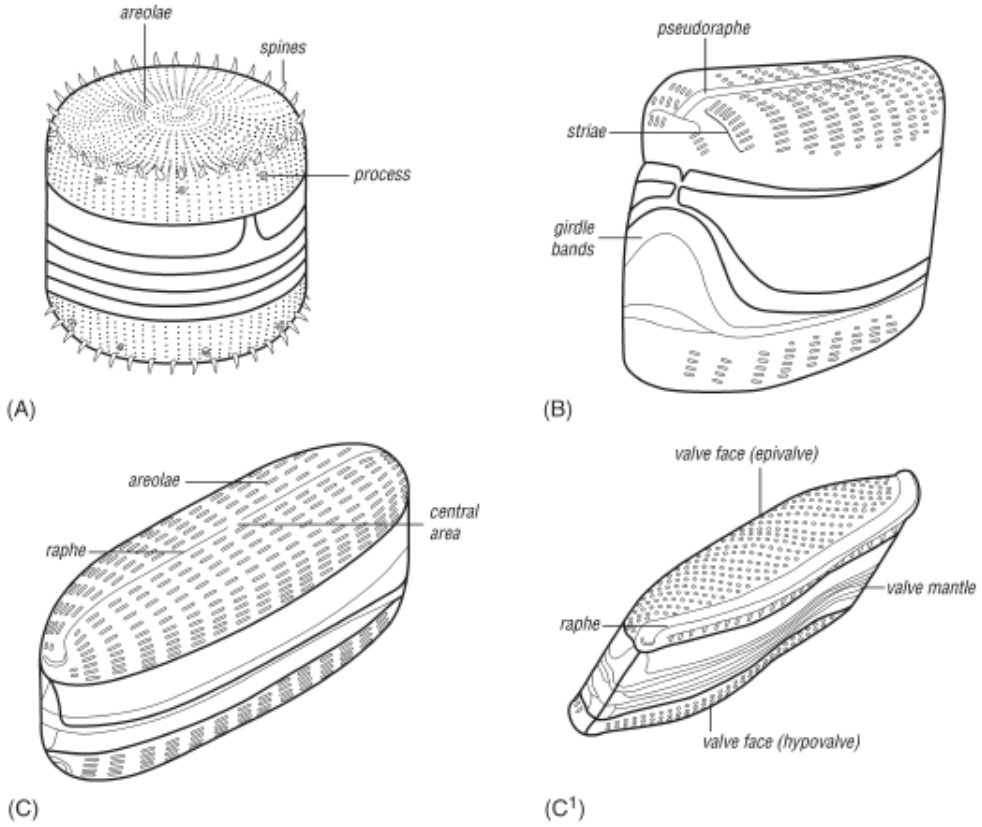


Figure 2 : A : diatomée centrique, B : diatomée pennée sans raphé, C et C1 : diatomée pennée avec raphé (Source : Delly et Al.[3])

1.3.Description

Les diatomées sont des organismes eucaryotes unicellulaires entourés d'un exosquelette siliceux, le frustule.

1.3.1. Cytologie

Cytoplasme et organites

Le cytoplasme contient les organites nécessaires au fonctionnement de la cellule :

- Noyau,

Il porte l'information génétique de la diatomée et orchestre le fonctionnement de la cellule.

- Chloroplastes,

Les diatomées sont pour la plupart autotrophes, elles se servent du mécanisme de photosynthèse pour produire leur énergie.[1-3]

- Mitochondries,

- Réticulum endoplasmique,

- Appareil de golgi,

- Vacuoles…

Les vacuoles permettent, par exemple, la sécrétion de la silice nécessaire à l'élaboration du frustule. Chez de nombreuses espèces, elles sécrètent des substances mucilagineuses permettant l'organisation en biofilms, les mouvements, la reproduction...Enfin, chez certaines espèces les vacuoles sont responsables de la sécrétion d'antibiotiques ou de toxines…[1]

Membrane

Le cytoplasme est entouré par une membrane organique. Cette membrane peut être composée de différentes couches en relation étroite avec le frustule.

On retrouve des vésicules reliées à la membrane permettant la synthèse de silice nécessaire à la formation du frustule.[1]

Le frustule

Le frustule est un exosquelette siliceux. Il s'agit d'une des caractéristiques essentielles des diatomées. Il donne aux diatomées leur résistance.[1-3]

Il est composé d'une silice proche du verre, rigide et transparente.

Comme en témoigne l'étymologie du mot diatomée (du grec « coupé en deux »)[2], le frustule comprend deux parties appelées thèques, parfaitement symétriques, se faisant face et entourant la cellule. On parle de l'épithèque (partie supérieure) et de l'hypothèque (partie inférieure), la première étant un peu plus grande que la deuxième (Figure 3). Chacune des deux thèques est également constituée de deux parties (la valve et le cingulum). Elles sont reliées ensembles par des bandes (girdle bands). [1-3]

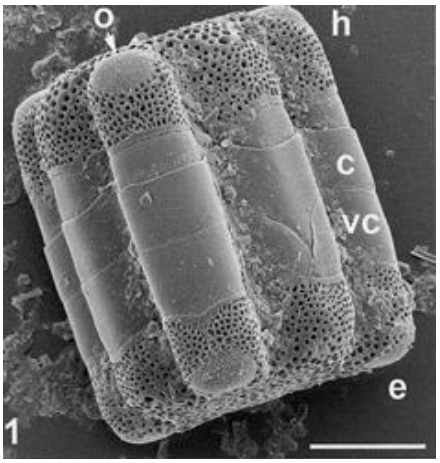


Figure 3 : Diatomée 'Hydrosera' (e) épithèque et (h) hypothèque. (Source : Diatom Wolrd[1])

Le frustule est finement perforé par des pores ou aréoles permettant la communication de la cellule avec le milieu extérieur. Elles permettent le passage de nutriments, de gaz, la sécrétion de produits cellulaires… Ces aréoles permettent également le passage de la lumière nécessaire à la photosynthèse. L'organisation de ces pores et l'ornementation du frustule font partie des clés d'identification des différentes espèces de diatomées.[1-3]

Certaines structures du frustule donnent aux diatomées des fonctions particulières. Les fentes ou raphé pour la mobilité, les épines périphériques pour la fixation…On retrouve également des pores spécifiques selon les sécrétions.[1-3]

La forme des diatomées varie selon le frustule (ronde, triangulaire, carrée, elliptique…). Le frustule est comme décoré par ces différentes structures. Cette architecture permet l''identification des espèces, tous ces éléments créent des formes spectaculaires comme de la dentelle de silice...[2]

1.3.2. Ecologie

Habitats

L'évolution des diatomées depuis plus de 200 millions d'années leur a donné d'importantes capacités d'adaptation et leur a permis de coloniser la quasi-totalité des milieux aquatiques (à l'exception de milieux très chauds ou hyper-salins) et une grande partie des milieux terrestres secs. Certaines diatomées dites aérophiles peuvent être retrouvées dans l'air aux abords des étendues d'eau.

Chaque diatomée vit dans un milieu bien précis et ne supporte que très mal les variations environnementales. La survie des populations de diatomées résulte donc d'un équilibre précaire de multiples paramètres. Il existe des diatomées cosmopolites alors que certaines vivent dans des habitats très particuliers avec un endémisme important. Certaines diatomées endémiques ne sont connues que dans un seul habitat sur terre.[4]

Habitats marins

On retrouve des diatomées dans tous les océans. Il s'agit en priorité d'espèces planctoniques. Elles se déplacent au gré des courants selon leur flottabilité. Outre les espèces planctoniques, on retrouve des diatomées vivant sur des substrats au niveau des côtes.[2]

Habitats d'eau douce

Comme dans les océans, on retrouve des diatomées planctoniques, d'autres vivent dans les sédiments sur les fonds. Certaines diatomées s'organisent en biofilms souvent visibles à l'œil nu, formant un enduit brun-doré sur les coques des bateaux, les pierres, les vitres des aquariums…[1]

Diatomées aérophiles et diatomées terrestres

De nombreuses diatomées vivent dans des milieux où l'eau ne les immerge pas en permanence. Elles reçoivent de l'eau de façon périodique (pluie, neige, condensation…). Ces diatomées peuplent ainsi les mousses, les écorces d'arbres, les pierres humides, les grottes, les berges de lacs et rivières, les feuilles et les sols…[2,3]

Habitats extrêmes

Les diatomées ont réussi à s'adapter à des conditions de vie extrêmes. Les sources d'eau chaudes, des lacs au pH très bas, ou très basique contiennent des diatomées. Ces diatomées sont très intéressantes pour les chercheurs qui tentent de mettre en évidence une vie extra-terrestre et prouvent une fois de plus que la vie peut s'adapter aux conditions les plus extrêmes.[2]

1.3.3. Mode de vie

Les diatomées adoptent différents modes de vie, seules ou en colonies, fixées ou libres.

Leur mode de vie est intimement lié aux paramètres environnementaux et notamment la présence de silice et de lumière. Les diatomées ont besoin de silice pour former leur frustule. Le frustule entraîne une augmentation de leur densité et une diminution de leur flottabilité. Afin d'éviter de couler et de s'éloigner des sources de lumière, les diatomées ont des formes variées ou s'associent en films pour augmenter leur flottabilité.[2]

Ces biofilms se forment grâce à des jonctions entre les diatomées. Ces jonctions sont obtenues grâce au mucilage et par des formations appelées épines de liaisons.[1,2]

Les diatomées pennées possèdent un raphé. Ce raphé leur permet d'avoir une mobilité via la sécrétion de filaments de mucopolysaccharides qui s'attachent au substrat solide permettant aux diatomées de se déplacer sur une surface.[2]

1.3.4. Rôle dans les écosystèmes

Les diatomées produisent 20% du dioxygène disponible sur terre on en retrouve entre 100 et 200 par mL d'eau ou de sédiment. Au même titre que les forêts tropicales, les diatomées sont les poumons de la terre.[2]

Les diatomées ont un rôle écologique primordial notamment dans les océans. Les diatomées fixent le dioxyde de carbone et synthétisent des carbohydrates. Ces carbohydrates sont une des sources d'alimentation du zooplancton qui alimente par la suite la chaîne alimentaire marine.[1-3]

1.3.5. Cycle de vie d'une diatomée

Les diatomées ont un cycle de vie original en partie du aux propriétés inextensibles du frustule. Il se décompose en une alternance entre une phase végétative au cours de laquelle les diatomées diminuent en taille et une phase de rajeunissement où elles retrouvent leur taille.[1,2] Un cycle complet peut durer jusqu'à 8 ans chez certaines espèces. Mais certaines diatomées peuvent se diviser jusqu'à 5 fois par jour, ce qui conduit à des augmentations rapide de biomasse notamment dans les océans. [2]

Phase végétative

Au cours des phases végétatives, les diatomées se divisent et diminuent en taille. Cette phase peut durer plusieurs mois voire plusieurs années.

Les diatomées se divisent par mitose. La cellule fille est formée à l'intérieur du frustule de la cellule parent. Le frustule étant inextensible, la cellule fille est plus petite. Elle conserve l'une des deux thèques de la cellule mère. Cette division peut entraîner des modifications dans la forme du frustule et par voie de conséquence des difficultés d'identification. (Figure 4 : Division par mitose et diminution de taille des diatomées (Source : The Diatom World[3]) 1-4

Au fur et à mesure de la diminution de leur taille, les diatomées passent un seuil au-delà duquel elles peuvent devenir sexuées. Pour qu'elles terminent leur sexuation il faut également des conditions environnementales favorables (nutriments, densité de la population…).[1]

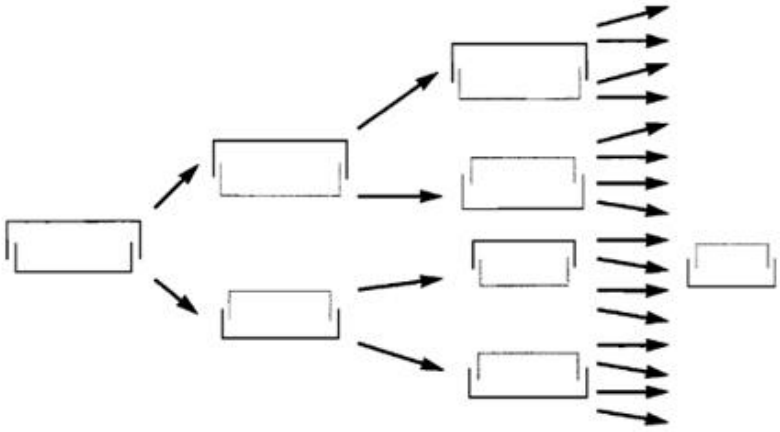


Figure 4 : Division par mitose et diminution de taille des diatomées (Source : The Diatom World[3])

Phase de rajeunissement

La phase de rajeunissement correspond à la période de vie sexuelle de la diatomée. La reproduction sexuée signe le retour à la taille d'origine pour la diatomée.

On retrouve différents modes de reproduction sexuée au sein de la famille des diatomées.

Dans tous les cas la rencontre de deux gamètes entraîne le retour à la diploïdie et la formation d'un auxospore. L'auxospore gonfle et augmente en taille, lorsqu'il atteint une certaine dimension il donne une nouvelle cellule végétative.

Spores

Sous certaines conditions défavorables (baisse de l'apport nutritionnel, de la lumière…), certaines diatomées sont capables de synthétiser des spores.

Ces spores contiennent de l'énergie et des parois cellulaires épaissies. Elles coulent ainsi au fond de l'eau et peuvent survivre pendant de longues périodes. Les spores permettent la survie et le redéploiement de l'espèce lorsque les conditions redeviennent favorables.[1,2]

1.4.Champs d'application

La découverte des diatomées par l'homme remonte probablement à 1703.[1] Depuis cette découverte de nombreux chercheurs se sont passionnés pour ces algues microscopiques. Au fur et à mesure des découvertes, les hommes ont appris à utiliser les propriétés des diatomées dans de multiples domaines.

Il existe deux grandes catégories de champs d'application : la production et l'utilisation industrielle des diatomées et la recherche et l'investigation à partir des diatomées.

1.4.1. Production et utilisation industrielle des diatomées

Les diatomées ont un grand intérêt dans l'industrie grâce à leurs nombreuses propriétés.

Le développement des nanotechnologies est nécessaire depuis plusieurs décennies pour satisfaire la demande d'éléments toujours plus petits et résistants. Des domaines comme la médecine, l'optique, l'électronique…mènent une course à la miniaturisation et à l'amélioration des capacités de leurs matériels.

La nature a inventé les nanotechnologies depuis des millions d'années. Les diatomées sont des structures microscopiques ayant un grand degré de précision architecturale et une grande résistance. Actuellement, l'homme est incapable de recréer la précision architecturale et la résistance du frustule à l'échelle d'une diatomée. L'homme doit donc puiser dans ce que lui offre la nature pour satisfaire aux nécessités de la technologie.

D'autre part les diatomées peuvent être utilisées pour leurs sécrétions. Les mucilages peuvent être transformés en colles. Certaines diatomées sont conditionnées pour synthétiser des substances bactéricides. Les diatomées sont également utilisées pour leur production de bioénergies grâce à leur capacité à stocker des lipides neutres dans leur cellule.[1]

Les diatomées peuvent ainsi être cultivées ou prélevées sous forme fossilisées dans des carrières. Les formes vivantes et les fossiles n'ont pas les mêmes utilités.[2]

Les champs d'utilisation des diatomées sont multiples et variés, de par leurs nombreuses et diverses propriétés. Elles servent notamment à nourrir certains coquillages en conchyliculture, elles ont des propriétés filtrantes, isolantes, abrasives, sont utilisées dans la conception de cosmétiques, de peinture, de pneus, de papier, de béton, d'allumettes…[3,4]

1.4.2. Investigations et diatomées

Qualité de l'eau

De par leur présence dans de nombreux milieux, les diatomées sont utilisées comme des marqueurs notamment pour évaluer la qualité des eaux.

Pour cela un protocole complexe est mis en place. La première étape consiste à recenser les différentes espèces de diatomées présentes dans le ruisseau. Un suivi de l'évolution quantitative et qualitative des espèces est ensuite réalisé et permet de vérifier la qualité des eaux. Les diatomées sont sensibles aux moindres variations de leur environnement. Les variations au sein des populations de diatomées signent une variation du milieu.[1,4]

Océanographie

Dans les océans, les diatomées servent à mesurer la direction et la vitesse des courants marins. Elles permettent également d'évaluer la qualité et les variations de la composition des eaux tout comme en eau douce.[3]

Géologie

La présence de diatomées dans des sédiments fossilisés permet de traduire l'origine des roches (dépôts marins ou lacustres) mais également de tracer les lignes des berges ou les côtes. Elles apportent également des indications de paléoclimatologie.[3]

Médecine légale

Les diatomées sont utilisées en investigation en médecine légale :

- Pour établir un diagnostic de noyade (test quantitatif de la diatomée),
- Pour rechercher ou valider le lieu de noyade (test qualitatif de la diatomée),
- Pour estimer la durée d'immersion d'un corps dans l'eau,[5]
- Pour tenter d'incriminer des suspects, si les diatomées retrouvées dans leurs vêtements ou sur leurs chaussures correspondent à la faune présente sur les lieux du crime.[6]

2. Etat actuel des connaissances sur l'intérêt des diatomées en médecine légale

Les diatomées ont depuis plus d'un siècle un rôle clé en médecine légale. Même si certaines études récentes[5] utilisent les diatomées comme des indicateurs du temps d'immersion d'un corps dans un milieu aquatique, l'utilité principale des diatomées en médecine légale est toute autre. En effet, le test de la diatomée est encore considéré par de nombreux auteurs comme le gold standard pour établir le diagnostic de la mort par noyade. [7,8]

2.1. Difficultés du diagnostic de mort par noyade

2.1.1. Définition de la mort par noyade

La noyade est définie comme une mort violente par asphyxie résultant de l'inhalation d'un liquide dans les voies respiratoires.[9,10]

La mort par noyade survient le plus souvent par accident au cours de baignade notamment, mais peut aussi résulter de suicides (25-33%)[9] ou plus rarement d'homicides (chez l'enfant ou cas de torture).[10]

Lorsqu'un individu tombe dans l'eau, il coule à une profondeur qui varie selon la hauteur de la chute, sa morphologie, ses habits…Il se retrouve complètement immergé et donc privé d'oxygène. L'augmentation de la concentration en CO_2 entraîne un réflexe de respiration. La mort par noyade survient au bout de quelques minutes par inondation des poumons et des voies respiratoires entraînant un arrêt cardiaque et une anoxie cérébrale.[10]

De manière générale, l'asphyxie survient au bout de 2 minutes, s'en suit la perte de conscience qui dure environ 3 minutes puis le cœur s'arrête au cours des 5 minutes suivantes. Le processus de noyade dure environ entre 2 et 12 minutes.[9,10]

Les mécanismes de noyade en eau douce et en eau salée sont différents.

- L'eau douce, tout comme le sang, est hypotonique. Lors d'une noyade en eau douce, environ 2 ½ L d'eau passent dans les capillaires pulmonaires et provoquent une hyper-volémie et une hémodilution. L'eau pénètre dans les globules rouges et les fait exploser. L'explosion des globules rouges entraîne une augmentation de la concentration sanguine en potassium. Le cœur doit faire face à l'hyperkaliémie, l'hypervolémie et à l'anoxie. Il en résulte rapidement des fibrillations et un arrêt cardiaque. L'anoxie cérébrale est également responsable de la mort.[9,10]

- L'eau salée est hypertonique, il se produit donc le mécanisme inverse. L'eau contenue dans le sang est attirée dans les poumons, provoquant une hémoconcentration et un œdème pulmonaire. Les électrolytes (Sodium, Calcium, Magnésium…) contenus dans l'eau de mer passent dans le sang. La concentration en sodium provoque une bradycardie. Le cœur est affaibli par l'anoxie, l'importance de l'œdème pulmonaire et le déséquilibre ionique. La mort est lente et se fait par asphyxie.[9,10]

2.1.2. Autres types de décès en milieu aquatique

Noyade sèche

Il s'agit d'une forme de noyade très peu courante dont les mécanismes sont mal compris.

Une entrée soudaine d'une petite quantité d'eau dans les voies respiratoires provoque un spasme du larynx qui entraine asphyxie par obstruction. Les poumons restent quasiment secs on parle ainsi de noyade sèche. [10]

Hydrocution ou noyade inhibition

L'hydrocution est une mort provoquée par une entrée en contact avec de l'eau très froide par rapport au milieu extérieur. Lorsque notre organisme est exposé à une température élevée les vaisseaux périphériques se dilatent et le rythme cardiaque augmente afin d'évacuer la chaleur. Une entrée en contact rapide avec un milieu froid va provoquer une baisse rapide de la température centrale et entraîner une vasoconstriction importante des vaisseaux périphériques pour limiter la perte de chaleur. Cette constriction périphérique va provoquer un reflux du sang vers le cœur et entraîner une augmentation de la pression artérielle. Pour pallier à cette hypertension, le cœur diminue son rythme de battements. Cette bradycardie soudaine va entraîner une diminution de l'irrigation cérébrale et provoquer une syncope pouvant s'accompagner d'un arrêt cardio-respiratoire. [9,10]

2.1.3. Signes de morts par noyade

On retrouve différents indices de la mort par noyade qui varient en fonction de la durée d'immersion du corps dans l'eau. Ces indices sont variables et aucun d'entre eux n'est spécifique de la mort par noyade. Aujourd'hui, l'informatisation des techniques d'imagerie offre de nouvelles perspectives au légiste pour établir le diagnostic de mort par noyade.

- Caractéristiques externes.[9-11]
    - Le corps et les habits sont mouillés,
    - Le corps est froid et pâle, sali par de la boue, du sable…
    - Le visage est pâle, cyanosé,
    - Les yeux sont semi-ouverts, les pupilles dilatées, on retrouve de petites hémorragies des vaisseaux, les yeux sont turgescents,
    - La langue est gonflée avec parfois des traces de morsure,
    - Raideur cadavérique,
    - Présence de tâches sur la peau, aspect macéré avec desquamation des téguments,
    - Présence de mousse autour de la bouche et des narines appelée spume. Il s'agit d'un des signes les plus évocateurs. Il est constitué de mucus de protéines plasmatiques et de surfactant. Il est de couleur blanc neige mais peut parfois être teinté de sang,
    - Présence de boue, graviers, sable dans les mains, sous les ongles…

Toutes ces caractéristiques externes disparaissent rapidement avec la putréfaction du corps qui survient très rapidement en milieu aquatique. D'autre part, aucun de ces signes n'est pathognomonique de la noyade.[9-12]

- Caractéristiques internes. [10]
    - Les poumons sont volumineux, œdèmatiés et distendus. Ils remplissent complètement la cage thoracique. Ils recouvrent le cœur et les gros vaisseaux et portent l'empreinte des côtes,
    - La muqueuse qui tapisse les bronches, la trachée et le larynx est rouge et congestive. On retrouve de la mousse et parfois du sang dans leur lumière. Il peut également y être trouvé de la boue, du sable, des diatomées, des algues après la bifurcation de la trachée ce qui est un élément probant dans le diagnostic de noyade,
    - La cavité pleurale contient du liquide pleural coloré par le sang,
    - Le cœur est globuleux, rempli de sang veineux très sombre,
    - L'estomac et les intestins contiennent de l'eau et des éléments originaires du milieu de noyade (sable, algues, graviers…),

- Présence d'eau ou de sang dans l'oreille moyenne, de liquide séro-hématique dans les sinus sphénoïdes,
- Hémorragies interstitielles des muscles cervicaux, sterno-cléido-mastoïdiens et pectoraux retrouvées dans 50% des noyades.

Une fois de plus la plupart de ces signes ne sont pas uniquement retrouvés dans une mort par noyade et disparaissent avec la putréfaction du corps.

- Données histo-pathologiques.[9]
  - Au niveau pulmonaire, on retrouve un œdème alvéolaire et pseudo-emphysème, amincissement des septa alvéolaires, rupture des cloisons inter-alvéolaires,
  - Formations de vacuoles dans les pneumocytes et les cellules endothéliales des capillaires des cloisons inter-alvéolaires,
  - Aucune de ces lésions n'est spécifique de la noyade.

- Données biochimiques (ces tests ne sont valables que peu de temps après la noyade). [9,10]
  - La composition du sang doit être analysée. On retrouve une diminution de 50% de la concentration en chlore du sang cardiaque gauche en eau douce et une augmentation de 30 à 40% en eau salée,
  - Dosage comparatif du fer sanguin entre le cœur droit et le cœur gauche,
  - Elévation de la concentration sanguine en strontium en rapport avec la concentration en strontium du milieu de noyade,
  - Présence de diatomées.

- Apports de la virtopsie

Les signes révélés par l'autopsie peuvent aujourd'hui, pour la plupart, être mis en évidence grâce à des techniques d'imagerie médicale. Suite à une acquisition tomodensitométrique ou IRM, il est possible pour le médecin légiste d'explorer virtuellement le corps dans les trois sens de l'espace dans les moindres détails. Elle permet également de revenir sur un cas plusieurs années après puisque les données sont sauvegardées et « figent » le corps tel qu'il était lors du décès.

Comme nous l'avons énoncé précédemment, le diagnostic de la mort par noyade est délicat car aucun signe n'est pathognomonique de la noyade et de nombreux indices disparaissent avec la putréfaction du cadavre. Le diagnostic formel de mort par noyade est encore considéré comme l'un des plus difficiles à obtenir pour les médecins légistes.[9,10,12,13] Dans les cas de mort par hydrocution ou dans les cas de noyade sèche, le diagnostic positif est quasiment impossible à obtenir. Le diagnostic est souvent établi par exclusion de toutes les autres possibilités.

Le diagnostic de la noyade doit être posé à partir d'un faisceau d'arguments et d'indices révélés lors de la levée du corps puis au cours de l'autopsie avec toutes les données anatomiques, anatomo-pathologiques et biochimiques.[9,10,12,13]

2.2. Historique du test de la diatomée

C'est en 1856 que Hoffman met pour la première fois en évidence des diatomées dans les poumons d'un noyé. En 1904, Revenstorf a l'idée d'utiliser les diatomées comme moyen de diagnostic de la noyade et élucide alors une affaire mystérieuse. Par la suite, Corin et Stockis, trouvent des diatomées dans le cœur des noyés, puis Muller en retrouve dans la moelle osseuse et dans le cerveau. C'est en 1942 avec Incze que la preuve de la diffusion des diatomées via les poumons est apportée. Il découvrira également leur présence dans le sang et la cavité pleurale des noyés. En 1961 Tamaska réalise une large étude sur la moelle osseuse des noyés et conclut que le test de la diatomée est le meilleur outil pour diagnostiquer une mort par noyade. Il sera suivi dans les années 1990 par Pollanen[14] qui réalise une étude sur 771 cas de noyade qui fait encore référence aujourd'hui.[12,15]

Depuis ces premiers essais, le test de la diatomée a évolué, de nombreux paramètres ont été étudiés. Bien que son utilisation soit toujours considérée comme une référence, il existe de nombreux détracteurs ne croyant pas à la fiabilité du test.

2.3. Principe général du test de la diatomée

Le test de la diatomée est l'un des arguments qui permet de s'orienter vers une mort par noyade. Son principe repose sur les postulats suivants.[5,8,11,12,16-19]

- Tous les milieux aquatiques contiennent des diatomées.
- Un organisme humain n'est pas censé contenir de diatomées.
- Lorsqu'un individu se noie, ses poumons se remplissent d'eau par phénomène d'osmose. L'eau et les éléments qu'elle contient passent dans le sang au niveau des capillaires pulmonaires.
- Lorsqu'un individu est en train de se noyer, son cœur bat durant les premières minutes qui suivent l'immersion. Le sang est diffusé dans tout l'organisme par les battements cardiaques.

Les diatomées contenues dans le milieu de noyade passent dans les capillaires sanguins et sont ainsi diffusées dans l'organisme.

Le test de la diatomée se déroule synthétiquement de la façon suivante.

- Le corps est retrouvé dans l'eau ou à proximité d'une étendue d'eau,
- Les légistes réalisent la levée de corps,
- L'eau du milieu de noyade présumé est prélevée,
- Des prélèvements (moelle osseuse, poumons, foie, rein, cerveau…) sont effectués au cours de l'autopsie,
- Les prélèvements sont digérés avec des acides, de l'eau oxygénée, des enzymes,
- Les reliquats de digestions sont observés au microscope à la recherche de diatomées.

2.3.1. Test quantitatif

L'analyse quantitative cherche à mettre en évidence une présence suffisante de diatomées dans l'organisme noyé. Le nombre de diatomées est ensuite rapporté à la quantité de tissu digéré. On obtient ainsi une densité de diatomées au sein du tissu.

Le test est considéré comme valide lorsqu'une certaine densité est atteinte. Aucune valeur ne fait actuellement référence, les auteurs fixent chacun des densités seuils pour leurs études. De façon inverse l'absence de diatomées ne permettra pas d'exclure la mort par noyade.[14]

Les principaux organes testés sont les poumons et la cavité pleurale, le sang cardiaque, le cerveau, les reins, le foie, la moelle osseuse (vertèbres, sternum, fémur). La moelle osseuse fémorale est actuellement le tissu le plus utilisé et sans doute le plus fiable.

Certaines études innovantes tentent de réaliser le test sur les sinus.[20] A notre connaissance aucun test n'a été réalisé sur la pulpe dentaire.

2.3.2. Test qualitatif

L'analyse qualitative se charge de comparer les espèces de diatomées présentes dans les organes et celles présentes dans le milieu de noyade. Les proportions des différentes espèces de diatomées doivent également être conservées.[9] Les diatomées de grande taille ne pouvant pas passer dans les capillaires sanguins sont exclues de ces comparaisons. Seules les diatomées avoisinant la taille d'un globule rouge (7-8µm) et jusqu'à environ 30µm doivent être retenues.[14-16]

L'analyse qualitative des diatomées présentes dans les tissus peut, dans certains cas, permettre d'identifier avec une précision relative le lieu et la saison de la noyade. En effet, les populations de diatomées sont très variables et spécifiques en temps et en lieu. Si le corps a été charrié et déplacé hors du lieu de la noyade, les diatomées présentes dans le corps ne correspondent plus à celles du milieu de levée du corps. De même, si le corps est resté plusieurs mois dans l'eau, les populations de diatomées ne correspondent plus exactement à celles présentes le jour de la noyade.

Lorsqu'un catalogage des diatomées est effectué à différents points du cours d'eau et à différentes saisons, la comparaison des diatomées retrouvées dans le corps avec les données recueillies sur le terrain permettent, dans certains cas, d'indiquer le lieu et la saison de la noyade.[17,20-24]

2.3.3. Mécanisme de diffusion des diatomées

La validité du test de la diatomée repose sur la capacité de passage des diatomées dans les capillaires alvéolaires au cours de la noyade. Depuis l'existence du test, le mécanisme de pénétration des diatomées dans les capillaires n'avait jamais été étudié, ce qui donnait un argument aux détracteurs du test. L'unique preuve de cette pénétration résidait dans la présence de diatomées dans les capillaires après noyade. C'est seulement en 1998 que Lunetta et Al.[16] ont mis en évidence cette pénétration grâce à des clichés en microscopie électronique à balayage. (Figure 5, Navicula spicula pénétrant une connexion inter-alvéolaire (pore de Kohn)

Les diatomées présentes dans le milieu de noyade et inhalées se retrouvent dans les poumons et dans les alvéoles pulmonaires au contact des vaisseaux sanguins. La forte pression de l'eau dans les poumons crée de fines déchirures et des distensions des jonctions intercellulaires des capillaires. Certains pores se retrouvent également élargis par cette pression. Les diatomées vont traverser la barrière du capillaire au niveau de ces lacérations ou des jonctions intercellulaires distendues.[16]

L'accélération du flux sanguin qui a lieu au cours de la noyade permet de diffuser le sang chargé en diatomées dans tout l'organisme pendant les quelques minutes au cours desquelles le cœur continue de battre. La mise en évidence du passage des diatomées dans les vaisseaux sanguins est une preuve définitive du passage des diatomées dans le flux sanguin au cours de la noyade.[16]

Seules les diatomées de taille inférieure à 10-30µm peuvent passer dans le sang à travers les capillaires.[12,14,20]

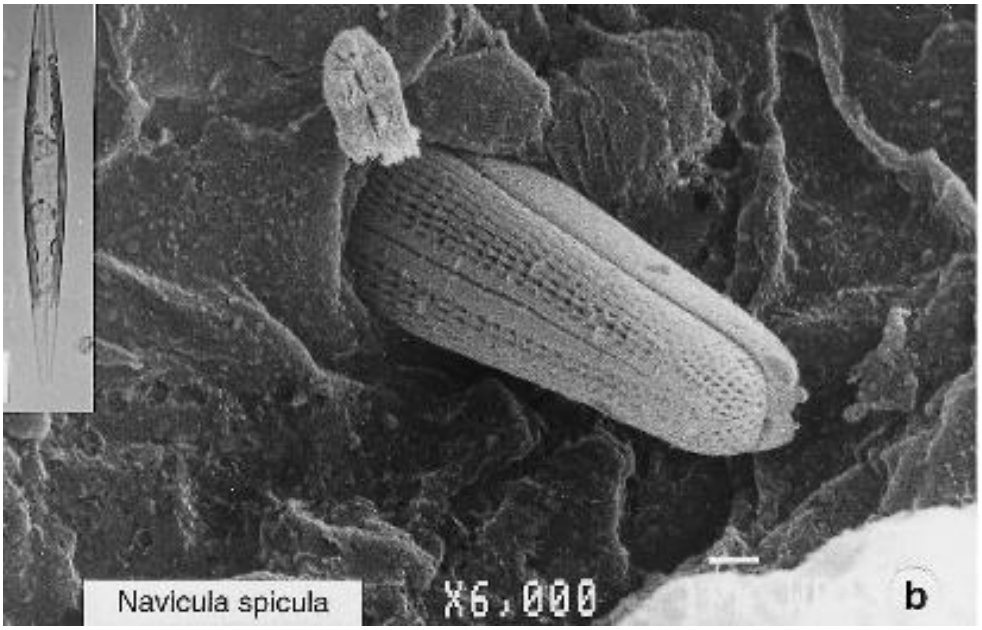


Figure 5, Navicula spicula pénétrant une connexion inter-alvéolaire (pore de Kohn) (Source : Lunetta 1998[12])

2.4. Limites du test de la diatomée

Le test de la diatomée est critiqué et mis en doute par certains auteurs car il présente trop de paramètres aléatoires et trop de sources d'erreurs. Le risque de diagnostiquer un faux négatif ou un faux positif est donc trop important et trop lourd de conséquences pour utiliser ce test comme unique moyen de diagnostic.

Dès 1910, Ascarelli et Stockis ont remis en cause la validité de ce test en montrant que de l'eau pouvait pénétrer dans les poumons post mortem si le cadavre se trouvait dans l'eau. D'autre part, aucune preuve de la capacité de passage des diatomées dans le sang n'avait alors été mise en évidence.[16]

Aujourd'hui encore, de nombreux sceptiques présentent des réticences à apporter du crédit au test de la diatomée.

2.4.1. Présence ante mortem de diatomées dans l'organisme

Des diatomées peuvent être retrouvées sur des individus ante mortem dans la moelle osseuse, les poumons, l'estomac...[25,26]. Elles peuvent donc être retrouvées dans un cadavre non noyé et ainsi conduire à un faux positif.

De nombreuses études ont cherché à mettre en évidence la présence de diatomées dans l'organisme de personnes non noyées. On en retrouve de façon notable :

- Chez les personnes ayant un contact fréquent avec l'eau : plongeurs, pêcheurs, habitants vivant à proximité de grandes étendues d'eau (les diatomées aérophiles y sont retrouvées en plus grande quantité[9]).
- Chez les personnes travaillant dans les carrières de diatomite[25]
- Des diatomées sont également présentes dans des produits de consommation quotidiens
    - Les aliments (notamment les produits de la mer)[26]
    - Les cigares[25]

Cependant, aucune preuve concernant la pénétration des diatomées dans le sang à travers la barrière gastro-intestinale n'a été mise en évidence de façon scientifique.[26]

Dans leur étude, Lunetta & Al. (2013)[25], ont effectué une recherche systématique (sang cardiaque, poumons, reins, cerveau, moelle osseuse, liquide pleural, foie) de diatomées sur des cadavres dont les causes du décès n'étaient pas la noyade. Sur les 14 cadavres étudiés, 6 contenaient des diatomées dans différentes parties de leur organisme. Les quantités de diatomées retrouvées varient entre 1 et 3 spécimens pour tout l'organisme.

Le risque d'établir un diagnostic de faux positif reste malgré tout quasiment nul. En effet, les quantités de diatomées retrouvées ante-mortem sont très faibles et l'identification spécifique des diatomées permet d'établir leur provenance et d'exclure la noyade.

2.4.2. Perte d'informations au cours de la digestion des tissus au laboratoire.

Les techniques de digestion permettant d'extraire les diatomées des tissus varient énormément selon les protocoles expérimentaux. On distingue trois types de digestions : la digestion enzymatique avec la protéinase K, la digestion acide avec des acides forts (acide chlorhydrique) et la digestion au soluène-350. [7,15,27]

Une bonne technique de digestion doit permettre de conserver la qualité des diatomées tout en éliminant le maximum de matières résiduelles pour assurer une bonne observation.[7,12] Malheureusement, certains réactifs peuvent endommager ou détruire les diatomées et empêchent ainsi leur observation. D'autres ne digèrent pas assez les tissus et empêchent la bonne observation par excès de résidus.

On retrouve également des difficultés liées à la présence de graisses lors de la digestion de moelle. En effet, après digestion acide, il reste une couche lipidique en surface qui peut potentiellement emprisonner des diatomées qui ne pourront être visualisées. Il est donc important de dissoudre ces lipides.

D'autre part, les diatomées sont souvent isolées par centrifugation ou filtration avant observation ce qui peut les briser ou écarter les plus gros ou plus petits spécimens.

Dans certains cas, les diatomées sont présentes en quantité tellement faible qu'elles sont perdues au cours des manipulations ou simplement non observées.[27]

Actuellement certains auteurs[27-29] proposent des protocoles novateurs et censés permettre une digestion sans risque pour les diatomées. Aujourd'hui, la tendance est à la digestion enzymatique qui semble être la plus efficace pour digérer les tissus tout en conservant la qualité des diatomées.[27] L'utilisation de sédimentation naturelle plutôt que la centrifugation est également préférable. Certains auteurs[34] utilisent la biologie moléculaire pour mettre en évidence la présence de diatomées dans des tissus. Cette technique leur permet d'avoir un comptage précis des diatomées et de les identifier sans aucun biais de manipulation possible.

Ainsi, les technologies actuelles et la rigueur dans les protocoles de digestion permettent de réaliser des observations dans des conditions optimales, sans perdre ni détruire de diatomées.

2.4.3. Limite en fonction du milieu

Selon certains auteurs[9,20], ce test est inutilisable sur les accidents domestiques dans de l'eau potable (piscines, baignoires, spas…) car celle-ci n'est pas censée contenir des diatomées. Mais certaines études récentes[11] semblent démontrer que de faibles quantités de diatomées peuvent tout de même être retrouvées dans les cas de noyades en eau potable.

Ago & Al.[14] ont retrouvé des diatomées dans les poumons et organes périphériques de 9 cadavres retrouvés principalement dans des baignoires. Dans la plupart des cas, très peu de diatomées ont été retrouvées, mais les identifications des espèces et leur comparaison avec celles du lieu de noyade ont permis de confirmer que les diatomées retrouvées dans l'organisme venaient de l'eau de noyade.

Ainsi, lors de noyades dans des milieux pauvres en diatomées, l'association des analyses quantitatives et qualitatives permet d'apporter des preuves concernant le mode de décès.

2.4.4. Hydrocution ou noyade rapide

Selon certains auteurs [9,20,30], un résultat négatif peut survenir en cas de mort par noyade très rapide ou hydrocution, de très petites quantités d'eau sont inhalées et la mort survient rapidement. Les diatomées n'ont alors pas le temps de passer dans la circulation sanguine et d'être disséminées dans les différents organes.

Aucune diatomée ne sera retrouvée à l'examen post-mortem alors que l'individu est bien décédé par noyade. Le résultat est un faux négatif.

Parmi les cas de noyade, les décès par hydrocution ou noyade sèche sont les plus délicats à diagnostiquer.

2.4.5. Contamination

Toutes les étapes du test de la diatomée sont sujettes à des contaminations par des diatomées externes. Lors du prélèvement, le tissu peut être souillé par l'eau de noyade présente sur le corps. Les réactifs, ustensiles peuvent contenir des diatomées et fausser les résultats.[9]

Il est donc nécessaire de prendre toutes les précautions nécessaires pour éviter la contamination des prélèvements par des diatomées externes qui pourraient conduire à des résultats faux positifs.

2.5.Test de la diatomée, temps d'immersion et diffusion passive

Le diagnostic de faux positifs et de faux négatifs est ainsi un réel risque du test de la diatomée et peut être lourd de conséquences. Il est ainsi nécessaire d'affiner la qualité de ce test et de limiter son champ d'application pour tenter de réduire au minimum les erreurs de diagnostic.

De nombreuses études ont tenté de déterminer la validité du test de la diatomée en faisant varier plusieurs paramètres :

- Les organes de prélèvement,
- Le type de milieu de noyade,
- Les méthodes de digestion/observation…

Cependant, il n'existe à notre connaissance que très peu d'études ayant réalisé des tests en fonction de la durée d'immersion des corps dans l'eau visant à mettre en évidence des phénomènes de percolation des diatomées directement dans les organes.

2.5.1. Diffusion des diatomées

Nous entendons par diffusion passive des diatomées le passage des diatomées dans les organes d'un cadavre post mortem sans relation avec les causes du décès.

La diffusion passive des diatomées dans les poumons, le liquide pleural et le sang cardiaque post-mortem est avérée. Selon les circonstances (envahissement des poumons par de l'eau, avancée de la putréfaction), les diatomées peuvent passer dans les poumons et dans le sang. Mais cela n'a jamais été prouvé par des expérimentations.[16,22]

Selon Grandmaison[9], le test de la diatomée perd beaucoup de sa valeur en cas de putréfaction avancée. En effet, les diatomées peuvent pénétrer dans les cavités médullaires par les trous nourriciers osseux lorsque l'os est mis à nu. Cependant, ces affirmations n'ont pas été vérifiées. Elles pénètrent également plus facilement en cas de cadavre délabré par des lésions de charriage où l'eau est en contact direct avec les viscères.

En parallèle, certains auteurs comme Kapil[30] considèrent que si des diatomées sont trouvées dans la moelle osseuse, le diagnostic de mort par noyade peut être posé car les diatomées ne peuvent pas franchir la corticale osseuse par voie externe. Gruspier & Al. n'analysent pas la moelle osseuse des os fracturés ou présentant une discontinuité de la surface corticale.[31]

2.5.2. Etude de Svetislav & Al. (2002)

Au cours de cette étude Svetislav[18] et son équipe ont effectué différentes expérimentations sur modèle animal (rats). Les animaux ont été divisés en 4 groupes.

- Groupe 1 : rats ayant bu de l'eau riche en diatomées durant sept jours,
- Groupe 2 : rats noyés dans de l'eau riche en diatomées,
- Groupe 3 : rats tués puis immergés durant 7 jours,
- Groupe 4 : rats noyés puis immergés dans de l'eau riche en diatomées durant 7 jours.

Leurs analyses ont montré la présence en quantités importantes de diatomées dans tous les organes (notamment la moelle osseuse) des rats ayant bu de l'eau riche en diatomées (groupe 1). Ces résultats sont en la faveur de la présence potentielle de diatomées ante-mortem dans l'organisme.

De même, des diatomées ont été retrouvées dans tous les organes des rats noyés (groupes 2 et 4) avec des quantités importantes dans les poumons, le sang et la moelle osseuse.

Les expérimentations effectuées sur le groupe 3 permettaient de rechercher la présence d'une diffusion passive des diatomées dans les organes au cours de l'immersion. Cette diffusion passive a été mise en évidence dans les poumons et l'estomac en quantités importantes et en quantités réduites dans les organes périphériques. La moelle osseuse n'a pas été testée sur ce groupe.

L'étude de Krstic & Al. est intéressante et permet de mettre en évidence, de façon expérimentale, certains phénomènes suspectés. Cependant l'absence d'analyse de la moelle osseuse dans le groupe 3 est décevant, en effet, c'est actuellement sur la moelle osseuse que sont réalisés les tests. Une telle analyse aurait permis de savoir si, au bout d'une semaine passée dans l'eau, des diatomées peuvent pénétrer à l'intérieur de la moelle osseuse de façon passive.

2.5.3. DiGiancamillio & Al. (2010)

L'étude de Digiancamillio & Al. (2010)[32] a consisté à immerger des porcelets morts nés dans de l'eau enrichie en diatomées sur une période de trois mois dans le but d'étudier les processus de décomposition d'un cadavre dans l'eau. L'état de putréfaction des porcelets a été étudié et décrit chaque jour. Tous les mois (1 mois, 2 mois, 3 mois), un porcelet a été sorti de l'eau et autopsié. C'est à cette occasion que les tests de la diatomée ont été réalisés. Malheureusement, les résultats concernant ces tests n'ont été que très peu exploités. On apprend ainsi qu'au bout d'un mois, on retrouve des diatomées dans la peau, les poumons et le cœur. Au bout de deux mois, on retrouve des diatomées dans les muscles. Le troisième mois, le test de la diatomée n'a pas été réalisé car il ne restait plus que des os.

Cette étude permet ainsi de confirmer l'existence d'une diffusion passive des diatomées à travers les tissus mous au cours de la période d'immersion dans l'eau, mais la diffusion des diatomées dans la moelle osseuse n'a pas étudiée.

2.5.4. Etude de Xu & Al. (2011)

L'étude de Xu & Al. (2011)[33] a cherché des diatomées dans des organes de rats noyés en réalisant les prélèvements entre 30 minutes et 48 heures après la noyade. Ils ont également porté leurs expériences sur un groupe test de rats asphyxiés puis immergés durant une heure. Les résultats ont montré des quantités constantes de diatomées dans les prélèvements des rats noyés et ce, sans variation selon le temps d'immersion. Dans le groupe des rats asphyxiés, aucune diatomée n'a été retrouvée dans les organes périphériques après leur immersion durant une heure.

La durée d'immersion des rats asphyxiés ne nous semble pas suffisante pour pouvoir mettre en évidence d'éventuels phénomènes de diffusion passive des diatomées à travers les organes.

2.5.5. Etude de Lunetta & Al. 2013

L'étude de Lunetta & Al. (2013)[25] a cherché à évaluer la pénétration dans l'organisme des diatomées en post-mortem. L'étude s'est portée sur des cadavres non morts de noyade en état de putréfaction avancée. L'expérience a consisté à injecter une solution aqueuse contenant des diatomées dans les poumons des individus. Cette solution aqueuse a été laissée dans les poumons durant 24-96h avant autopsie. Les résultats ont montré la présence de diatomées dans les poumons, le liquide pleural et le sang pour 50% des cas.

En pratique, un individu mort puis porté à l'eau et charrié par une rivière aura ses poumons remplis d'eau. Lorsque le test de la diatomée sera effectué sur le sang, le liquide pleural ou les poumons, des diatomées pourront être trouvées alors que l'individu n'est pas mort noyé. Cette étude montre ainsi qu'il existe une diffusion des diatomées dans l'organisme en post mortem. Cependant, elle ne prend pas en compte la diffusion passive des diatomées dans la moelle osseuse qui reste le tissu principalement testé.

2.5.6. Etude de Lin & Al. (2014)

Dans leur étude Lin & Al. (2014)[20] ont cherché la présence de diatomées dans le sinus sphénoïdal et les poumons de cadavres dont la noyade était avérée. Ils ont, d'autre part, étudié 6 cas pour lesquels la noyade n'était pas la raison du décès mais où les corps ont été retrouvés dans l'eau. Sur ces six cas, deux présentaient des blessures à la tête et au thorax et avaient séjourné entre 6 et 8 jours dans l'eau. L'équipe de Lin a mis en évidence la présence de diatomées dans le sinus sphénoïdal et dans les poumons de ces deux cas.

Ainsi la présence de blessure ou d'altération des tissus par putréfaction favorise la colonisation passive des diatomées et peut induire des diagnostics de faux positifs.

Il n'existe à notre connaissance aucune étude ayant tenté de réaliser le test de la diatomée sur la moelle osseuse en faisant varier le temps d'immersion. Il n'existe donc aucune donnée sur la possible percolation des diatomées à travers l'os dans la moelle qui pourrait avoir lieu après une longue période d'immersion et fausserait en grande partie les résultats du test de la diatomée.

3. Protocoles expérimentaux

L'objectif de notre travail expérimental est de valider la diffusion passive de diatomées à travers des os longs d'animaux (dinde et canard) au sein de la moelle osseuse mais également au sein de la pulpe dentaire à partir de dents sur des hémi-mandibules d'agneau. Pour se faire, nous avons réalisé plusieurs expérimentations.

3.1. Expérimentation 1 : analyse des diatomées présentes dans le cours d'eau

3.1.1. Objectifs

- Réaliser un catalogage des espèces de diatomées présentes dans les eaux des lieux de prélèvement.
- S'assurer de la présence de diatomées tout au long des expérimentations.

3.1.2. Choix du cours d'eau

Le cours d'eau qui a été retenu pour les expérimentations est le Touch, sur la commune de Saint Martin du Touch (Banlieue Ouest de Toulouse).

3.1.3. Prélèvements

Les prélèvements ont été réalisés dans deux sites différents, espacés de quelques centaines de mètres. Ils ont été effectués dans des zones faciles d'accès et ombragées. L'un de faible profondeur exposé au courant de la rivière (site 1), le second dans une zone plus profonde avec de la vase (site 2).

Figure 6 : Site de prélèvement 1. Peu de profondeur exposition au courant. (Photo : E. Hourqueig)

Le prélèvement est effectué directement sur les roches à partir d'une brosse, mais également dans l'eau courante.

Une quantité d'environ 100mL est recueillie et enfermée dans un dispositif étanche et stérile en diatomées.

3.1.4. Digestion

Le protocole de digestion se décompose en phases de digestion à l'eau de javel, eau oxygénée et acide chlorhydrique et en phases de décantation/dilution.

Les sédiments sont laissés à décanter pendant 24h. Le surnageant est ensuite retiré à l'aide d'une seringue. Le volume retiré est remplacé par de l'eau de javel (dilution 1). Après 24h de décantation le surnageant est retiré et remplacé par de l'eau oxygénée à 30% laissé à décanter 24h sur une plaque chauffante. La digestion à l'eau oxygénée est réalisée à 3 reprises (dilutions 2-3-4). Par la suite, la solution est digérée à l'acide chlorhydrique selon le même mode opératoire (dilution 5). La solution est ensuite laissée à décanter et diluée avec de l'eau distillée jusqu'à ce qu'elle soit neutre (environ trois dilutions 6-7-8).(Tableau 1)

3.1.5. Montage

A ce stade, la solution est fixée avec de l'alcool. Les observations sont réalisées à partir d'un prélèvement à la pipette pasteur d'une goutte de sédiment déposée sur une lame et fixée au naphrax.

3.1.6. Observations

Les observations des diatomées sont réalisées au microscope optique (Microscope Olympus BH2 grossissement x40) et photographiées.

- Décantation 24h - Retirer le surnageant à l'aide d'une seringue - Compléter avec de l'eau de javel, mélanger **(dilution 1)** - Décantation 24h - Retirer le surnageant à l'aide d'une seringue - Compléter avec de l'eau oxygénée à 30% (diluée à 4 volumes) **(dilution 2-3-4)** - Décantation 24h sur plaque chauffante 3 fois - Retirer le surnageant à l'aide d'une seringue - Compléter avec de l'eau distillée et quelques gouttes d'acide chlorhydrique **(dilution 5)** - Décantation 24h - Retirer le surnageant à l'aide d'une seringue - Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à ce que le pH soit neutre **(dilution 6-7-8)** - Décantation 24h - Retirer le surnageant à l'aide d'une seringue - Prélèvement à l'aide d'une pipette pasteur d'une goutte au fond - Etalement sur une lame avec une goutte de naphrax - Analyse au microscope optique grossissement *1000

Tableau 1 : Protocole de digestion du sédiment destinée à l'observation des diatomées

3.1.7. Vérification de la présence de diatomées dans le cours d'eau durant toute la durée des expérimentations

Afin de s'assurer de la présence de diatomées tout au long de l'expérimentation, des prélèvements sont effectués à T1 (7 jours), T2 (14 jours), T3 (21 jours), T4 (28 jours).

La digestion est réalisée de façon plus rapide avec seulement une digestion/dilution à l'eau de javel et une à l'eau oxygénée. Cette digestion rapide doit permettre de mettre en évidence la présence en continu de diatomées dans les sites des prélèvements dans le Touch.

3.2. Expérimentation 2 : Test de la diatomée sur des os et des dents immergés durant une longue durée dans l'eau

3.2.1. Objectif

- Mettre en évidence la présence ou l'absence de diffusion passive des diatomées dans la moelle osseuse et dans la pulpe dentaire.

3.2.2. Echantillons

Les os étudiés sont des fémurs de dinde ou canard et des mandibules d'agneau. Les os de canard présentent une perforation sous la tête fémorale (perforation non visible initialement car recouverte par les tissus mous), la moelle osseuse se retrouve en relation directe avec le milieu extérieur. Ces os ont dès lors été considérés comme des os sectionnés.

Figure 7 : Fémur de canard présentant un orifice sous la tête fémorale (Photo : E. Hourqueig)

Les os ont été divisés en quatre groupes :

- Os intacts
- Os fissurés, un coup de marteau a été donné sur la diaphyse
- Os sectionnés, les os ont été coupés au milieu de la diaphyse
- Hémi-mandibules, dents en place

Les os ont été répartis en 4 lots afin d'étudier le facteur temps dans la diffusion passive :

- T0 : 1 os intact, 2 mandibules
- T1 : 3 os intacts, 2 os fissurés, 2 os sectionnés, 2 mandibules
- T2 : 4 os fissurés, 2 os sectionnés
- T3 : 1 os fissuré, 3 os sectionnés, 2 mandibules
- T4 : 3 os intacts, 1 os fissuré, 2 mandibules

3.2.3. Dispositif

Deux cages métalliques (Figure 88) sont confectionnées à partir de grillage fin pour maintenir les os regroupés et permettre un passage de l'eau et des diatomées. Elles sont lestées et fixées à la berge du Touch.

Figure 8 : Cage en grillage (Photo : E. Hourqueig)

Les os sont reliés entre eux formant des ensembles plus faciles à prélever. (Figure 99)

Figure 9 : Paquet d'os prélevé au T4. (Photo : E. Hourqueig)

Chacune des deux cages est immergée au fond du ruisseau dans chacun des deux sites de prélèvement.

3.2.4. Prélèvements

Les prélèvements sont effectués tous les sept jours. (T1=7j, T2=14j, T3=21j, T4=28j)

A chaque prélèvement sont recueillis un ensemble d'os de chaque échantillon dans chacune des cages :

- A T1 (7 jours)
  - **C1 :** 1 os sectionné, 1 os fracturé, 2 os intacts, 1 mandibule
  - **C2 :** 1 os sectionné, 1 os fracturé, 1 os intact, 1 mandibule
- A T2 (14 jours)
  - **C1 :** 2 os sectionnés, 4 os fracturés
- A T3 (21 jours)
  - **C1 :** 2 os sectionnés, 1 mandibule
  - **C2 :** 1 os sectionné, 1 os fracturé, 1 mandibule
- A T4 (28 jours)
  - **C1 :** 2 os intacts, 1 mandibule
  - **C2 :** 1 os sectionné, 1 os intact, 1 mandibule

Chaque ensemble d'os est placé dans une boîte étanche et stérile en diatomées, puis placé au congélateur afin de fixer les tissus et les diatomées avant de procéder à leur analyse.

D'autres prélèvements ont été effectués, notamment au niveau du nerf dentaire inférieur quand cela était possible. (T1 et T3)

3.2.5. Analyse

Préparation des os

Chaque échantillon est :

- Décongelé,
- Nettoyé, retrait des morceaux de chair et détritus présents en surface,
- Placé dans l'eau distillée pour continuer le lavage,
- Sectionné au disque pour permettre d'accéder à la pulpe et à la moelle.

Os intacts :

- Les épiphyses sont retirées, la diaphyse est sectionnée en trois tronçons, un tronçon médian et deux tronçons distaux. (1/3, m, 1/3).
- 1cm^3 de moelle est prélevé à l'aide d'une curette.

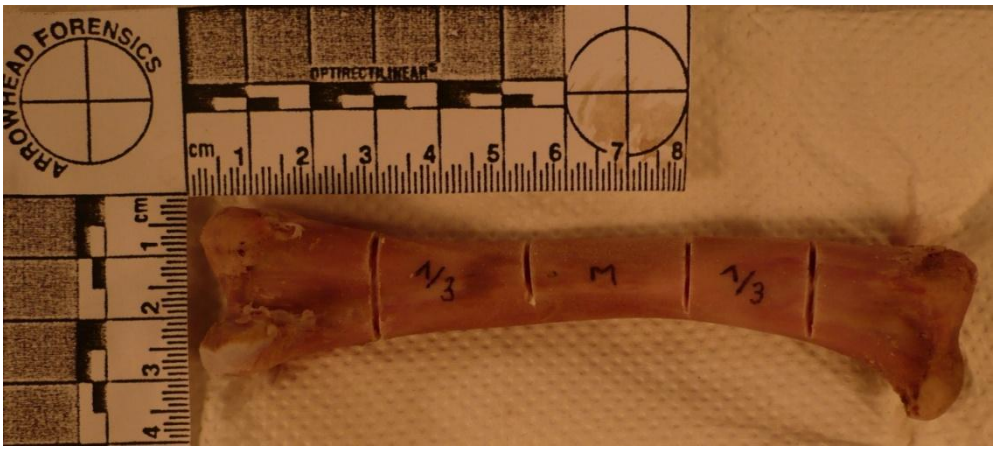


Figure 10 : Os intact, prélèvement de la moelle. (Photo : E. Hourqueig)

Os fracturés :

- Les épiphyses sont retirées, la diaphyse est sectionnée en trois tronçons, un tronçon médian et deux tronçons distaux. (1/3, m, 1/3).
- 1cm^3 de moelle est prélevé à l'aide d'une curette.

Os sectionnés :

- L'épiphyse est retirée, un tronçon est prélevé au bord de la fracture, un tronçon est prélevé à 1cm de la fracture, un tronçon est prélevé à 3cm de la fracture.
- 1cm^3 de moelle est prélevé à l'aide d'une curette.

Dents :

- Les dents sont extraites par alvéolectomie (fraisage de l'os autour des racines).
- Les dents sont sectionnées au disque ou fracturées au davier.
- L'intégralité de la pulpe est prélevée avec une curette ou des précelles.

Figure 11 : Extraction des dents par alvéolectomie. (Cliché : E. Hourqueig)

Digestion de la moelle osseuse / de la pulpe dentaire.

- Les prélèvements sont placés dans un tube à essai,
- Le tube à essai est rempli avec de l'acide chlorhydrique,
- La digestion à l'acide chlorhydrique dure 30 minutes,
- A la fin de l'action de l'acide, de l'eau oxygénée (30%) est ajoutée,
- La solution est transférée dans un flacon et diluée à l'eau distillée afin d'obtenir une solution à acidité neutre,
- Les solutions sont laissées à décanter un minimum de 24h.

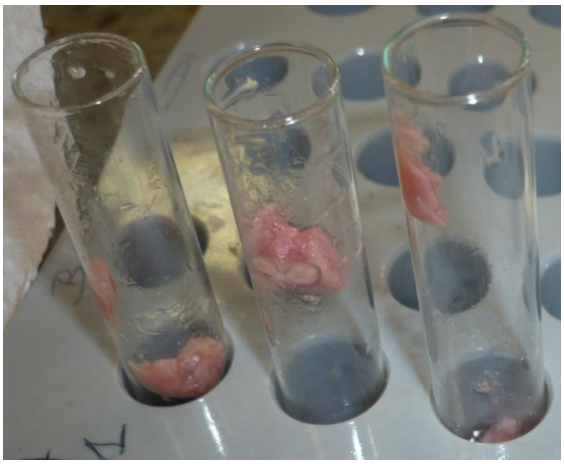


Figure 12 : Les prélèvements sont placés dans des tubes à essai (Photo : E. Hourqueig)

Prélèvement/montage

- Le prélèvement est effectué au fond du tube à essai à l'aide d'une pipette pasteur,
- Trois gouttes sont déposées sur une lamelle positionnée sur la plaque chauffante,
- Lorsque le liquide est totalement évaporé, la lamelle est fixée sur la lame.

Observation/comptage

- L'observation est réalisée au microscope optique au grossissement (*40),
- Le comptage est réalisé par screaning de la lame (observation systématique de toute la surface de la lame),
- Les diatomées sont photographiées si besoin.

3.3. Qualité et évaluation des risques de contamination croisée

Le protocole doit être réalisé dans des conditions d'asepsie stricte afin d'éviter les phénomènes de contamination croisée[33]. Le matériel et les différents équipements ont été nettoyés avec de l'eau distillée et de la soude molaire selon les recommandations de la littérature afin de prévenir une contamination[33].

3.3.1. Echantillons

L'absence de diatomées a été testée sur un échantillon de moelle et deux échantillons de pulpe à T0

Les protocoles et techniques de digestion, montage et d'observations sont ceux décrits plus haut pour la moelle et la pulpe.

3.3.2. Réactifs

L'absence de diatomées dans les réactifs a été testée :

- Eau oxygénée
- Acide chlorhydrique
- Eau distillée

Tous les réactifs doivent être testés avant le début des expérimentations afin d'éviter d'éventuelles contamination par des diatomées exogènes.[7]

Une goutte de réactif est déposée sur une lamelle sur la plaque chauffante jusqu'à évaporation complète du liquide. Après évaporation, la lamelle a été montée sur une lame et observée au microscope au grossissement x40 en réalisant un screaning de la lame.

3.3.3. Matériel utilisé

Pour éviter toute contamination par des diatomées exogènes, le matériel utilisé (tubes à essais, instruments...) a systématiquement été nettoyé à l'aide de solution de soude molaire pendant 24 heures (afin de dissoudre les diatomées) puis lavés et rincés à l'eau bidistillée.

Dans la mesure du possible, des équipements stériles à usage unique ont été utilisés pour préparer les os et réaliser les prélèvements.[9]

4. Résultats

4.1.Analyse et identification des diatomées du cours d'eau

Après digestion de l'eau prélevée dans le Touch à T0, les diatomées ont été photographiées sous microscope et identifiées de façon générique et spécifique lorsque cela était possible. (Tableau 2)

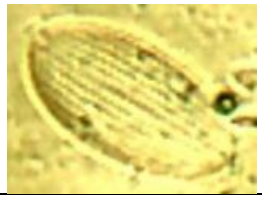
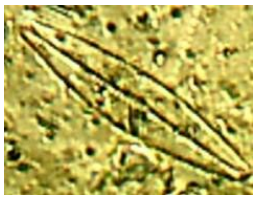
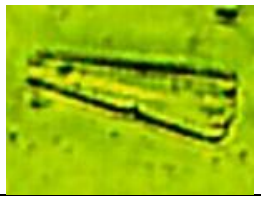
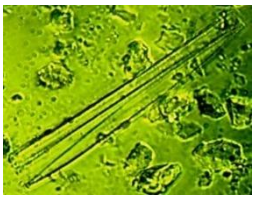
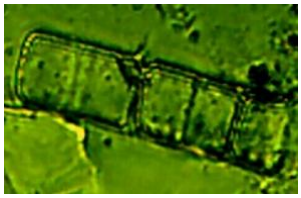
Cocconeis 	Amphora	Nitzschia dissipata
Navicula 	Rhoicosphenia abbreviata 	Nitzschia linearis
Gyrosigma	Encyonema silesiacum	Nitzschia sociabilis 
Eolimna	Melosira varians 	Tryblionella levidensis
Achnanthidium	Gomphonema	Diatoma vulgaris
Mayamaea permitis ?	Surirella ?	

Tableau 2 : Différentes diatomées retrouvées au cours de l'analyse du sédiment du Touch (Photos : E. Hourqueig)

La présence constante de diatomées aux temps T1-T2-T3-T4 a été mise en évidence aux travers des observations réalisées sur les échantillons d'eau.

4.2.Tableau récapitulatif des différentes analyses effectuées

Au cours de la phase expérimentale, 447 prélèvements provenant de 31 os ou dents ont été observés sous microscope. (Tableau 3)

Temps	Os intact		Os fissuré		Os sectionné		Pulpe	
	Os	Lames	Os	Lames	Os	Lames	Os	Lames
T0	1	10					2	20
T1	3	51	2	36	2	40	2	20
T2			4	40	2	20		
T3			1	30	3	30	2	20
T4	3	90			2	10	2	30
Totaux	7	151	7	106	9	100	8	90

Nombre d'os total	31	**Nombre de lames total**	447

Tableau 3 : Récapitulatif des échantillons étudiés aux différents temps expérimentaux.

4.3.Résultats sur os sectionnés

- A T1 : On note la présence d'un nombre de diatomées important (>500/lame) dans le premier cm de moelle directement en regard de la section. On remarque également des quantités décroissantes de diatomées au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la zone de fracture (0.4/lame à 1cm puis 0.3/lame à 3cm). Au bord de la fracture, tous les types de diatomées ont été retrouvés, même les plus grosses, avec une majorité de *Navicula*. A distance de la fracture, on ne retrouve que des diatomées du genre *Navicula.*

- A T2 : La moelle provenant de deux os sectionnés a été étudiée. On note la présence d'un nombre important de diatomées (>500/lame).

- A T3 : On retrouve toujours des grandes quantités de diatomées (>500/lames) à proximité de la zone de fracture et des quantités moins importantes mais relativement élevées de diatomées à distance des zones de fracture (25.8/lame) par exemple pour un prélèvement effectué à l'opposé d'un os troué. Il est à noter que la quantité de moelle présente dans les os sectionnés ou troués a nettement diminué.

- A T4 : Les os fracturés ne contiennent quasiment plus de moelle. Le peu de moelle restant se situe à l'opposé de la zone fracturée et contient de nombreuses diatomées (>500/lames)

T1				T2		T3			T4
Bord		1cm	3cm	Bord		Bord	1cm	3cm	Bord
A4	D1	A2	A3	T2-A1	T2-A4	T3-D1	T3-A7	T3-C1	T4-A4
500	500	0	0	500	500	500	6	0	500
500	500	1	0	500	500	500	5	3	500
500	500	0	0	500	500	500	24	2	500
500	500	1	1	500	500	500	31	1	500
500	500	0	0	500	500	500	28	1	500
500	500	1	0	500	500	500	21	0	500
500	500	0	1	500	500	500	35	2	500
500	500	1	0	500	500	500	37	1	500
500	500	0	0	500	500	500	24	0	500
500	500	0	1	500	500	500	47	0	500
500	**500**	**0,4**	**0,3**	**500**	**500**	**500**	**25,8**	**1**	**500**

Tableau 4 : Nombre de diatomées retrouvées dans les os sectionnés aux différents temps expérimentaux.

Les analyses sur os sectionnés ou troués montrent bien une présence en quantité importante de diatomées à tous les temps de l'expérimentation. Il est également intéressant de noter que les quantités de diatomées diminuent à mesure que l'on s'éloigne de la zone en contact direct avec le milieu extérieur. Enfin, il faut garder en mémoire qu'au bout de 4 semaines d'immersion, la quasi-totalité de la moelle disparait lorsqu'elle est en contact direct avec le milieu extérieur.

4.4. Résultats sur os fissurés

- A T0 : non testé

- A T1 : On retrouve un nombre important de diatomées dans les zones en regard des fissures (>100/lame). Tous les types de diatomées sont présents. Dans les zones à distance de la fissure, on retrouve également des diatomées dès 7 jours d'immersion. Leur quantité varie en fonction de l'éloignement avec la zone de faiblesse et l'importance de la fissure. (entre 2.1 et 19.2/lame)

- A T2 : Sur les quatre os testés, on retrouve différents cas de figure. Sur l'os T2-A2 qui présentait une zone de fissure importante avec une large exposition de la moelle, on retrouve une grande quantité de diatomées (>100/lame). Sur l'os T2-A3 qui présentait une fissure importante n'exposant pas la moelle, on retrouve des diatomées mais en quantité moins importante que dans l'os T2-A2 (9.7/lame). Enfin

dans les os T2-A5 et T2-A6 sur lesquels la fissure était moindre, on ne retrouve que très peu de diatomées (0.8 et 0.1/lame).

- A T3 : Un seul os a été testé et présentait une fissure peu profonde. Sur les 30 lames réalisées aucune, diatomée n'a été retrouvée.

- A T4 : Non testé

T1				T2				T3		
+	+	++	+	++	+	-	--	--	--	--
A6	A7	D4	D5	T2-A2	T2-A3	T2-A5	T2-A6	T3-C2	T3-C3	T3-C4
2	2	100		100	12	1	0	0	0	0
7	2	100		100	7	1	0	0	0	0
2	8	100		100	6	2	0	0	0	0
1	R	100		100	1	0	0	0	0	0
0	1	100	2	100	9	0	1	0	0	0
4	1	100	1	100	11	0	0	0	0	0
2	2	100	20	100	12	1	0	0	0	0
2	0	100	29	100	15	1	0	0	0	0
1	1	100	8	100	13	0	0	0	0	0
6	2	100	19	100	11	2	0	0	0	0
2,7	**2,1**	**100,0**	**13,2**	**100**	**9,7**	**0,8**	**0,1**	**0**	**0**	**0**

Tableau 5 : Nombre de diatomées retrouvées dans les os fissurés aux différents temps expérimentaux. (La deuxième ligne indique l'importance de la fissure, de (- -) très faible à (+ +) très importante)

Les analyses sur les os fissurés montrent de façon générale que l'on retrouve des diatomées dans la moelle à partir de 7 jours. Les quantités retrouvées sont suffisantes pour fausser le test de la diatomée. Les résultats montrent également qu'il existe un lien entre l'importance de la fissure et la quantité de diatomées retrouvée. Plus la fissure est importante, plus on retrouve de diatomées dans la moelle. D'autre part, si l'intégrité de la corticale est conservée (T3-C2), on ne retrouve pas de diatomées dans la moelle, même après 21 jours d'immersion.

4.5.Résultats sur os intacts

- A T0 : Aucune diatomée n'a été retrouvée dans la moelle osseuse des os testés. Cette condition était nécessaire à la réalisation de l'expérimentation.

- A T1 : La présence de diatomées en quantité importante (1.1/lame en moyenne et jusqu'à 3,2/lame dans certains os) dans la moelle des os intacts révèle la présence de contaminations. Il est possible que les diatomées présentes à la surface des os aient contaminé la moelle lors des prélèvements. Certaines diatomées retrouvées

étaient de tailles trop importantes pour se retrouver dans la moelle de façon passive. Ces résultats n'ont pas été utilisés dans notre analyse mais ils nous permettent de mesurer les difficultés de maintenir la « stérilité » en diatomées de nos préparations.

- A T2 : Non testé

- A T3 : Non testé

- A T4 : La présence de diatomées en très faible quantité, pour 90 lames (0.04 diatomée/lame) soit 0.4 diatomées/mL de culot de digestion a été mise en évidence. Ces quelques diatomées sont évocatrices d'une pénétration des diatomées à travers la corticale osseuse via les trous nourriciers de l'os ou résultent de contaminations.

T0	T1					T4								
T0-A0	B1	B2	B3	C1	C2	T4-A1	T4-A2	T4-A3	T4-B1	T4-B2	T4-B3	T4-A1	T4-A2	T4-A3
0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	2	1	0
0	2	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	2		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	0		5	0	0	0	0	0	0	0	1	0
0	0	0	0		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	2	1		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	**0,5**	**0,3**	**0,5**	**1**	**3,2**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0,2**	**0,2**	**0**

Tableau 6 : Nombre de diatomées retrouvées dans les os intacts aux différents temps expérimentaux. Les résultats en rouge indiquent les éventuelles contaminations.

Les expérimentations réalisées sur os intact nous ont permis de nous rendre compte de la difficulté à conserver la stérilité de nos échantillons. En revanche, on observe au bout de 4 semaines d'immersion la présence d'un nombre minime de diatomées dans la moelle dont l'origine reste à déterminer.

4.6. Résultats obtenus sur la pulpe dentaire

- A T0 : Aucune diatomée n'a été retrouvée dans la pulpe dentaire.

- A T1 : Des quantités importantes de diatomées ont été mises en évidence dans la pulpe dentaire (24/mL). Tout comme pour les os intacts, ces résultats sont probablement le fruit de contaminations en

partie dues à la difficulté d'effectuer un prélèvement stérile de la pulpe dentaire.

- A T2 : Non testé

- A T3 : Aucune diatomée n'a été retrouvée dans la pulpe dentaire sur les deux mandibules testées. En revanche, l'analyse du contenu du canal dentaire a révélé la présence de diatomées en quantité importante (95/mL), parmi ces diatomées des spécimens de taille importante ont été retrouvés.

- A T4 : Sur les trois échantillons analysés deux ont montré une absence totale de diatomées. Dans le dernier échantillon, des quantités importantes de diatomées (11/mL) ont été retrouvées. Ces diatomées sont probablement le fruit de contaminations. En effet, la taille importante de certains spécimens est incompatible avec une diffusion passive à travers l'apex.

T0		T1		T3		T4		
T0-P1	T0-P2	B5	D7	T3-D3	T3-D7	T4-A5	T4-B1	T4-A5
0	0	3	1	0	0	0	0	0
0	0	5	0	0	0	0	0	0
0	0	7	0	0	0	0	0	0
0	0	3	0	0	0	1	0	0
0	0	6	0	0	0	1	0	0
0	0	2	0	0	0	2	0	0
0	0	4	2	0	0	1	0	0
0	0	5	3	0	0	3	0	0
0	0	4	1	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	3	0	0
0	**0**	**3,9**	**0,8**	**0**	**0**	**1,1**	**0**	**0**

Tableau 7 : Nombre de diatomées retrouvées dans la pulpe dentaire aux différents temps expérimentaux. Les résultats en rouge indiquent les éventuelles contaminations.

Les prélèvements effectués sur les dents semblent indiquer l'absence de diffusion passive des diatomées dans la pulpe dentaire. Ils nous renseignent également sur la difficulté à prélever la pulpe de façon stérile. En effet, après plusieurs semaines passées dans l'eau, l'environnement de la dent contient des diatomées, notamment à l'apex de la dent au niveau du nerf dentaire. La présence de diatomées directement au contact, les faibles quantités de pulpe à prélever sont des facteurs qui compliquent l'obtention d'un prélèvement stérile en diatomées.

5. Discussion

Le test de la diatomée est encore aujourd'hui très controversé. Si certains pays (Japon, pays scandinaves, Canada, France…) semblent l'avoir adopté de façon systématique. De nombreuses équipes trouvent que ce test est encore trop aléatoire pour l'inclure dans leurs protocoles d'autopsies.

Nos expérimentations sont soumises à certains biais si l'on souhaite directement les transposer à l'homme. Cependant, elles nous ont apporté des éléments intéressants concernant la pratique du test de la diatomée.

5.1. Diffusion passive des diatomées

Notre objectif de départ était de déterminer s'il pouvait exister une diffusion passive des diatomées dans la moelle osseuse et la pulpe dentaire dans des os et des dents immergés en milieu naturel. Nos expérimentations nous ont permis de répondre en partie à ces objectifs.

5.1.1. Sur os non intact

Il existe une diffusion passive des diatomées dans la moelle osseuse si celle-ci est exposée directement au milieu aquatique. Cette diffusion se fait très rapidement. Au bout d'une semaine, on retrouve déjà des quantités importantes de diatomées (>500/0.1mL de culot de digestion). Il est également à noter la présence d'un gradient de diffusion. On retrouve plus de diatomées au niveau de la zone de fissure ou de section qu'à distance de celle-ci.

Le test de la diatomée ne doit donc pas être pratiqué sur des os sectionnés ou des os endommagés.

5.1.2. Sur os intact

La présence de 4 diatomées dans la totalité des échantillons analysés après quatre semaines d'immersion peut être interprétée de deux façons différentes et ne permet pas d'aboutir à des conclusions franches.

1- Ces résultats peuvent s'expliquer par une légère contamination résiduelle qui est très délicate à exclure au cours de tous les procédés expérimentaux.

2- La présence de quelques diatomées dans la moelle après 4 semaines d'immersion pourrait s'expliquer par l'existence d'une diffusion passive des diatomées dans la moelle osseuse.

   Des diatomées de petite taille ont en effet été retrouvées en petite quantité (4 diatomées pour 90 lames soit 0.4 diatomées/mL de culot). Si ces diatomées sont le fruit d'une diffusion passive, leur présence est à

relativiser. En effet, selon les auteurs, les valeurs seuils à partir desquelles le test de la diatomée est considéré comme positif varient énormément, entre 1 à 5 diatomées pour toute la moelle ou encore 1 diatomée pour 10g de moelle, et 5 diatomées pour 10g de résidus de digestion de moelle.[25]

Selon la valeur seuil choisie, nos résultats peuvent perturber le diagnostic et induire des faux positifs. Ce passage peut s'expliquer par la présence de trous nourriciers transcorticaux qui font communiquer la moelle osseuse avec le milieu extérieur.

Il est à noter qu'on ne retrouve pas de différence entre les prélèvements réalisés au niveau du centre ou des extrémités de la diaphyse.

Par mesure de sécurité, les prélèvements de moelle osseuse doivent être prélevés à distance des trous nourriciers de l'os pour limiter au maximum le risque de diffusion passive.

5.1.3. Dans la pulpe dentaire

Les résultats sur la pulpe dentaire sont également encourageants mais soumis à quelques réserves. Au bout de trois et quatre semaines aucune diatomée n'a été mise en évidence dans la pulpe dentaire de 4 dents sur les 5 dents testées.

Cependant, il faut souligner l'extrême difficulté à obtenir des échantillons non contaminés. Les quantités de pulpe disponible sont très faibles. Il est ainsi très délicat d'ouvrir la dent et de prélever la pulpe sans la souiller avec le milieu extérieur à proximité de la dent. Des prélèvements réalisés à l'apex des dents, au niveau du nerf alvéolaire inférieur ont indiqué à T4 la présence de diatomées en quantité importante (9,5 diatomées/0.1mL).

La très faible quantité de tissus à digérer pose également des problèmes de manipulation et sans doute une trop grande dilution des éventuelles diatomées présentes.

La réalisation du test de la diatomée sur la pulpe dentaire, réalisée pour la première fois dans ce travail, a donné des résultats intéressants. En effet, la pulpe dentaire irriguée par le sang et en milieu clos semble être étanche à la diffusion passive des diatomées. Cependant, les protocoles doivent être améliorés afin de réduire les risques de contamination.

5.2. Risques de contaminations et faux négatifs

Nos expérimentations nous ont permis d'appréhender l'extrême difficulté à obtenir des prélèvements non contaminés.

Les expérimentations à T1 ont montré des résultats surprenants, au préalable difficiles à interpréter. C'est la présence de diatomées de grande taille comme des *Amphora* ou des *Girosigma* qui nous ont permis de comprendre que nos prélèvements avaient été contaminés probablement lors des prélèvements.[24] Cet écueil expérimental nous a encouragé à être plus strict lors du nettoyage des os et plus propres dans nos prélèvements afin de supprimer au maximum le risque de contamination. Il est cependant très délicat d'exclure complètement ce risque.

Sur les os immergés, de nombreuses diatomées sont présentes sur la corticale osseuse où elles forment un biofilm et ce, très rapidement, comme elles le feraient sur une pierre ou un morceau de bois. Malgré le nettoyage minutieux des morceaux de chairs restantes et le trempage dans l'eau distillée, ce biofilm n'a pu être totalement retiré qu'en grattant au scalpel la surface de l'os. Ce défaut de nettoyage explique les contaminations et les résultats obtenus au T1. Par la suite, les manipulations ont été beaucoup plus méticuleuses (grattage de la surface de l'os, utilisation de disques trempés dans la soude, utilisation d'équipements stériles…), afin de minimiser les risques de contamination.

Au cours des expérimentations, la découverte de diatomées de grandes tailles doit être considérée comme le fruit d'une contamination. De la dissection jusqu'à la phase d'observation, toutes les mesures doivent être prises pour limiter au maximum le risque de contamination. Ces mesures sont les seules garantes de la reproductibilité et de la validité des résultats.

5.3. Transposabilité de nos expérimentations à l'homme et à la réalité des faits

Nos expérimentations ont été réalisées en utilisant des modèles animaux et dans des conditions expérimentales, il existe ainsi des biais expérimentaux qui limitent la transposabilité à des cas réels.

5.3.1. Utilisation de modèles animaux

L'utilisation de modèles animaux induit des biais expérimentaux.

- La corticale osseuse sur un os de dinde/canard est moins épaisse que celle d'un fémur humain,

- Les dents ne présentent pas la même anatomie au niveau de l'apex qui est fermé chez toutes les dents humaines adultes, et qui n'est fermé que sur les incisives chez le mouton,
- La quantité de moelle et de pulpe disponibles sont moindres chez ces animaux de plus petite taille que l'homme.

Ces biais liés à l'utilisation d'un modèle animal pourraient être supprimés en réalisant ces expérimentations sur des os ou des dents humaines.

L'existence d'une corticale osseuse plus épaisse chez l'homme est en la faveur d'une meilleure herméticité de la cavité médullaire. Cependant les trous nourriciers osseux sont de plus gros diamètre ce qui faciliterait le passage des diatomées.

5.3.2. Absence de tissus autour des os

Lors de nos différentes expérimentations, les os que nous avons utilisés étaient tous décharnés. Cette manipulation nous éloigne des conditions réelles. En effet, les os ne sont jamais décharnés au moment de la noyade. Il faut plusieurs mois de putréfaction pour arriver à des os sans chair. D'autre part, la présence de chairs est inévitablement un rempart à la progression des diatomées, qui devraient traverser les téguments et les muscles avant d'atteindre la corticale osseuse.

Ces biais pourraient être contournés en réalisant les expérimentations sur des os charnés.

Nos résultats doivent ainsi être reconsidérés. La diffusion des diatomées est rendue plus facile par l'absence de chair autour des os. Il faudrait sans doute plus de temps pour observer une diffusion passive des diatomées dans des conditions réelles.

5.3.3. Conditions réelles d'expérimentation

Il est à noter que nos expérimentations ont été réalisées en rivière dans des conditions comparables à celle d'une noyade. En effet, la plupart des expérimentations sur les diatomées sont réalisées en laboratoire à partir de cultures de diatomées.

L'utilisation de cages pour immerger les os en milieu naturel est un paramètre qui n'avait à notre connaissance jamais été testé.

5.3.4. Techniques de laboratoire

Le protocole utilisé à été choisi pour nous permettre d'obtenir des résultats de façon rapide, peu coûteuse et en employant des techniques simples reproductibles et accessibles à tous. De nombreux points peuvent être améliorés :

- Les techniques de digestion enzymatique semblent fournir aujourd'hui de meilleurs résultats,
- Le comptage et l'identification manuelle peut aujourd'hui être réalisés de façon informatisée,
- Le pesage et le dosage précis des prélèvements et des réactifs permettraient d'obtenir des résultats plus facilement comparables,
- Des équipements plus aseptisés permettraient de diminuer encore les risques de contamination.

Les techniques utilisées au laboratoire ont une importance capitale dans la garantie des résultats obtenus. Aujourd'hui, de nombreuses techniques permettent d'affiner les résultats et de les rendre plus reproductibles.

5.4.Perspectives et études à réaliser

Au cours de nos expérimentations, nous avons pu identifier certains biais à corriger afin de préciser notre travail mais également certaines lacunes dans la littérature qu'il pourrait être intéressant de combler au cours de nouvelles études.

- Tester la diffusion passive des diatomées :
    - Sur des durées plus longues
    - Sur des os charnés
    - Sur des os humains
    - En eau de mer
- S'assurer de l'absence de diatomées ante-mortem dans la pulpe dentaire humaine et rechercher la présence de diatomées dans des dents humaines dont le décès par noyade est avéré.
- Mettre en place un milieu expérimental de laboratoire le plus proche des conditions réelles en rivière. L'existence d'un tel milieu disponible en laboratoire permettrait de faciliter et multiplier les observations.
- Améliorer les protocoles de prélèvement et de digestion de la pulpe dentaire.
- Etablir de façon plus précise, à partir d'expérimentations ou d'une revue de la littérature, des valeurs seuils de diatomées à partir desquelles on peut poser ou non un diagnostic de mort par noyade.

6. Conclusion

Le diagnostic de la mort par noyade est l'un des plus complexes à établir en médecine légale. Il repose sur un faisceau d'arguments dans lequel le test de la diatomée figure en bonne place.

Cependant, le test de la diatomée présente quelques limites. Il faut ainsi savoir l'utiliser à bon escient et relativiser les résultats obtenus avant de se précipiter vers des conclusions trop hâtives. Notre revue de la littérature récente sur ces limites a montré qu'elles étaient, pour la plupart, facilement contournables. Les risques de contamination sont majeurs et doivent être appréhendés. Les réactifs doivent être testés, le matériel nettoyé de façon efficace. De même, il est nécessaire d'utiliser un protocole de digestion efficace, fiable et facile à mettre en œuvre.

Parmi les limites du test de la diatomée il faut dorénavant prendre en compte l'existence d'une diffusion passive des diatomées à travers la moelle osseuse lorsque les os sont immergés longtemps dans l'eau. Même si certains résultats restent à préciser ou confirmer, ce phénomène que nous avons mis en évidence, peut venir perturber de façon importante les résultats obtenus. D'autre part, les expériences menées sur la pulpe dentaire sont encourageantes et nous laissent espérer que le test de la diatomée pourra un jour se réaliser sur la pulpe dentaire en parallèle aux analyses menées sur la moelle osseuse.

A partir des résultats obtenus, il nous est permis d'établir deux recommandations :

- Les prélèvements de moelle osseuse doivent être effectués à distance des trous nourriciers de l'os car ils sont une porte d'entrée au passage des diatomées,
- Les os fracturés, fissurés, endommagés doivent être exclus. En effet, si la corticale n'est plus intègre, le risque de diffusion passive des diatomées est augmentée.

Même si le test de la diatomée est utilisé de façon courante depuis plus d'un siècle, de nombreux paramètres restent à étudier et à améliorer. Malgré les moyens dont nous disposons actuellement, le test de la diatomée ne peut pas être utilisé seul pour le diagnostic, ce sera toujours l'ensemble des données anatomiques, anatomo-pathologiques, biochimiques en association avec le test de la diatomée qui permettront de s'orienter ou non vers un diagnostic de noyade.

Table des illustrations

Figure 1 : Amphora pediculis (Photo : E. Hourqueig) 11
Figure 2 : A : diatomée centrique, B : diatomée pennée sans raphé, C et C1 : diatomée pennée avec raphé (Source : Delly et Al.[3]) 13
Figure 3 : Diatomée 'Hydrosera' (e) épithèque et (h) hypothèque. (Source : Diatom Wolrd[1]) 15
Figure 4 : Division par mitose et diminution de taille des diatomées (Source : The Diatom World[3]) 18
Figure 5, Navicula spicula pénétrant une connexion inter-alvéolaire (pore de Kohn) (Source : Lunetta 1998[12]) 28
Figure 6 : Site de prélèvement 1. Peu de profondeur exposition au courant. (Photo : E. Hourqueig) 36
Figure 7 : Fémur de canard présentant un orifice sous la tête fémorale (Photo : E. Hourqueig) 39
Figure 8 : Cage en grillage (Photo : E. Hourqueig) 40
Figure 9 : Paquet d'os prélevé au T4. (Photo : E. Hourqueig) 40
Figure 10 : Os intact, prélèvement de la moelle. (Photo : E. Hourqueig) 42
Figure 11 : Extraction des dents par alvéolectomie. (Cliché : E. Hourqueig) .. 42
Figure 12 : Les prélèvements sont placés dans des tubes à essai (Photo : E. Hourqueig) 43

Tableau 1 : Protocole de digestion du sédiment destinée à l'observation des diatomées……..…..38
Tableau 2 : Différentes diatomées retrouvées au cours de l'analyse du sédiment du Touch (Photos : E. Hourqueig)……44
Tableau 3 : Récapitulatif des échantillons étudiés aux différents temps expérimentaux……45
Tableau 4 : Nombre de diatomées retrouvées dans les os sectionnés aux différents temps expérimentaux……..47
Tableau 5 : Nombre de diatomées retrouvées dans les os fissurés aux différents temps expérimentaux. (La deuxième ligne indique l'importance de la fissure, de (- -) très faible à (+ +) très importante)……48
Tableau 6 : Nombre de diatomées retrouvées dans les os intacts aux différents temps expérimentaux. Les résultats en rouge indiquent les éventuelles contaminations……..49
Tableau 7 : Nombre de diatomées retrouvées dans la pulpe dentaire aux différents temps expérimentaux. Les résultats en rouge indiquent les éventuelles contaminations……..50

Bibliographie

1. Seckbach, J. & Kociolek, P. ***The Diatom World.*** (2011) - Springer Science

2. Jones, V. ***Diatom introduction*** in ***Encyclopedia of Quaternary Science.*** (2007) - Elsevier

3. Delly, J. G. & Gill, S. ***An introduction to the Microscopal Study of diatoms.*** (2012)

4. Prygiel, J. & Coste, M. ***Guide méthodologique pour la mise en œuvre de l'indice biologique diatomées.*** (2000) – NF T90-354.

5. Zimmerman, K. A. & Wallace, J. R. ***The potential to determine a postmortem submersion interval based on algal/diatom diversity on decomposing mammalian carcasses in brackish ponds in Delaware.*** (2008) – Journal of Forensic Science 53 : 935-941.

6. Siver, P. A., Wayne, D. L. & McCarthy, D. J. ***Forensic Limnology: The Use of Freshwater Algal Community Ecology to Link Suspects to an Aquatic Crime Scene in Southern New England.*** (1994) - Journal of Forensic Sciences 39 : 847–847.

7. DiGiancamillo, A., Domeneghini, C., Gibelli, D. & Cattaneo, C. ***Diatom extraction with HCl from animal tissues : A technical note.*** (2011) – Legal Medecine 13 : 268–271.

8. Vichar Mishra, V. ***Diatom Fingerprinting to Ascertain Death in Drowning Cases.*** (2013) – Journal of Forensic Research 4,5 : 1-6.

9. Grandmaison, G. L. & Paraire, F. ***Place de l'anatomie pathologique dans le diagnostic médico-légal d'une noyade.*** (2008) – Annales de Pathologie 23 : 400-407

10. Karmakar, R. N. ***Forensic Medicine and Toxicology.*** (2010) – Academic Publishers 668p.

11. Ago, K., Hayashi, T., Ago, M. & Ogata, M. ***The number of diatoms recovered from the lungs and other organs in drowning deaths in bathwater.*** (2011) - Legal Medicine 13 : 186–190

12. Kumar, M., Deshkar, J., Naik, S. K. & Yadav, P. K. ***Diatom Test-Past, Present and Future : A brief review***. (2012) - Indian J. Res. Rep. Med. Sci. 2(3) 1-5.

13. Pierre, M. H. A. & De Letter, E. A. ***Diatom still a difficult autopsy diagnosis.*** (2006) – Forensic Sci. Int. 163, 1-9

14. Pollanen, M. S., Cheung, C. & Chiasson, A. D. ***The diagnostic value of the Diatom Test for Drowning. I. Utility : A restrospective analysis of 771 cases of drowning in Ontario, Canada.*** (1997) – Journal of Forensic Science 42:2, 281-285

15. Wang, H. & Al. ***A Simple Digestion Method with a Lefort Aqua Regia Solution for Diatom Extraction.*** (2014) – Journal of Forensic Sciences 2014

16. Lunetta, P., Penttilä, A. & Hällfors, G. ***Scanning and transmission electron microscopical evidence of the capacity of diatoms to penetrate the alveolo-capillary barrier***

in drowning. (1998) - International Journal of Legal Medicine. 111, 229–237.

17. Horton, B. P., Boreham, S. & Hillier, C. ***The Development and Application of a Diatom-Based Quantitative Reconstruction Technique in Forensic Science.*** (2006) - Journal of Forensic Sciences. 51, no. 3 : 643–50.

18. Svetislav, K., Duma, A., Janevska, B., Levkov, Z., Nikolova, K., & Noveska, M. ***Diatoms in Forensic Expertise of Drowning—a Macedonian Experience.*** (2002) - Forensic Science International. 127, no. 3 : 198–203.

19. Ludes, B., M. Coste, N. North, & P. Mangin. ***Intérêt de L'étude de La Flore Des Diatomées Du Lieu de Submersion Dans Le Diagnostic de Noyade.*** (1996) - Bulletin Français de La Pêche et de La Pisciculture. no. 341–342 : 133–37.

20. Chun-Yen, L. & al. ***Diatomological Investigation in Sphenoid Sinus Fluid and Lung Tissue from Cases of Suspected Drowning.*** (2014) - Forensic Science International. 244 : 111–15.

20. Chun-Yen, L. & al. ***Diatomological Investigation in Sphenoid Sinus Fluid and Lung Tissue from Cases of Suspected Drowning.*** (2014) - Forensic Science International. 244 : 111–15.

21. Thakar, M. K., & Rajvinder, S. ***Diatomological Mapping of Water Bodies for the Diagnosis of Drowning Cases.*** (2010) - Journal of Forensic and Legal Medicine. 17, no. 1: 18–25.

22. Kakizaki, E. & Al. ***Freshwater Bacterioplankton Cultured from Liver, Kidney and Lungs of a Decomposed Cadaver Retrieved from a Sandy Seashore: Possibility of Drowning in a River and Then Floating out to Sea.*** (2010) - Legal Medicine. 12, no. 4 : 195–99.

23. Horton, B. P., Boreham S. & Hillier, C. ***The Development and Application of a Diatom-Based Quantitative Reconstruction Technique in Forensic Science.*** (2006) - Journal of Forensic Sciences. 51, no. 3 : 643–50.

24. Ludes, B., Coste, M., North, N., Doray, S., Tracqui, A. & Kintz, P. ***Diatom Analysis in Victim's Tissues as an Indicator of the Site of Drowning.*** (1999) - International Journal of Legal Medicine. 112, no. 3 : 163–66.

25. Lunetta, P., Miettinen, A., Spilling, K. & Sajantila, A. ***False-Positive Diatom Test: A Real Challenge ? A Post-Mortem Study Using Standardized Protocols.*** (2013) - Legal Medicine. 15, no. 5 : 229–34.

26. Yen, L. Y. & Jayaprakash, P. T. ***Prevalence of Diatom Frustules in Non-Vegetarian Foodstuffs and Its Implications in Interpreting Identification of Diatom Frustules in Drowning Cases***. (2007) - Forensic Science International 170, no. 1 : 1–7.

27. Ming, M., Meng, X., & Wang, E. ***Evaluation of Four Digestive Methods for Extracting Diatoms.*** (2007) - Forensic Science International. 170, no. 1 : 29–34.

28. Hürlimann, J. & Al. ***Diatom detection in the diagnosis of death by drowning.*** (2000) - International Journal of Legal Medicine. 114, 6-14.

29. Takeichi, T., & Kitamura, O. ***Detection of Diatom in Formalin-Fixed Organs by Enzymatic Digestion.*** (2009) - Legal Medicine. 11, Supplement 1 : 348–49.

30. Kapil, V. ***Role of Diatoms in the World of Forensic Science.*** (2013) - Forensic Research. 4, no. 2.

31. Gruspier, K. L., & Pollanen, M. S. ***Limbs Found in Water: Investigation Using Anthropological Analysis and the Diatom Test.*** (2000) Forensic Science International. 112, no. 1 : 1–9.

32. Xu, G. & Al. ***Applications for Drowning Identification by Planktonic Diatom Test on Rats in Forensic Medicine.*** (2011) - Procedia Engineering 18 : 417–21.

33. DiGiancamillo, A. & Al. ***Immersion of Piglet Carcasses in Water – The Applicability of Microscopic Analysis and Limits of Diatom Testing on an Animal Model.*** (2010) - Legal Medicine 12, no. 1 : 13–18.

34. Seo, Y. & Al. ***A Simple DNA Coprecipitation Method for the Detection of Diatoms in Heart Blood.*** (2013) - Forensic Science International, 232, no. 1–3 : 154–59.

Vu, Le Président du Jury,

Date, Signature :

Vu, la Directrice de l'UFR des Sciences Odontologiques,

Date, Signature :

Vu, le Président de l'Université de Bordeaux,

Date, Signature :

Emile Hourqueig, Le 05 Octobre 2015

Thèse pour l'obtention du DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR en CHIRURGIE DENTAIRE 2015 - n°68

Odontologie légale

Diatomées en médecine et odontologie légale. Fiabilité et diffusion passive.

Résumé :
Introduction : Le diagnostic de la mort par noyade est l'un des plus difficiles à établir en médecine légale. Le test de la diatomée permet dans certains cas d'apporter des informations sur les causes du décès. Ce test est soumis à de nombreuses variables. **Matériel et Méthodes :** Nous nous sommes intéressés à l'étanchéité de la corticale osseuse et aux notions de diffusion passive des diatomées en fonction du temps d'immersion. Ces expérimentations ont également été effectuées sur la pulpe dentaire. Toutes les expérimentations ont été effectuées en rivière. Les os utilisés proviennent de canards, dindes ou agneaux. **Résultats :** En 4 semaines 31 os/dents ont été étudiés et 447 échantillons analysés. **Discussion :** Les résultats obtenus ne nous permettent pas de valider ou d'exclure l'existence de phénomènes de diffusion passive des diatomées dans les différents tissus testés, cependant ils nous permettent d'améliorer certaines étapes du test de la diatomée. Les résultats sur la pulpe dentaire sont encourageants et restent à approfondir.

Mots clés :
Médecine légale, Odontologie légale, Noyade/Diagnostic, Diatomées/Purification et Identification, Moelle osseuse, Pulpe dentaire

Diatoms in forensics and odontology. Fiability and passive diffusion.

Summary :
Introduction : The diagnostic of death by drowning is one of the most delicate to establish in forensics. The diatom test can gives, in several cases, interesting informations on the causes of the death. The diatom test is under the influence of various factors and variables. **Materials and Methods :** In our study we have focused on the sealing of the cortical bone and on the notions of diffusion of the diatoms while the bones were immersed. We have also realized the experimentations on the dental pulp. All the experimentations have been realized under real conditions in a river. The bones used were from ducks, turkeys and lambs. **Results :** During 4 weeks, 31 bones/teeth have been studied and 447 samples analysed. **Discussion :** The results do not allow us to confirm or to exclude the existence of a passive diffusion of the diatoms in the different tissues tested, but they give interesting information which permit to improve the diatom test. The results obtained on the dental pulp are hopeful and have to be deepened.

Key-words :
Forensics, Legal odontology, Drowning/Diagnostic, Diatoms/Purification and Isolation, Bone marrow, Dental Pulp

Université de Bordeaux – Collège des Sciences de la Santé
UFR des Sciences Odontologiques
16-20 Cours de la Marne
33082 BORDEAUX CEDEX