



**Diatomées et odontologie légale : mise en place d'un
protocole méthodologique pour l'étude de la diffusion
passive des diatomées au niveau des dents au sein d'un
milieu de culture**

Jane Gourgues

► **To cite this version:**

Jane Gourgues. Diatomées et odontologie légale : mise en place d'un protocole méthodologique pour l'étude de la diffusion passive des diatomées au niveau des dents au sein d'un milieu de culture. Chirurgie. 2016. dumas-01402410

HAL Id: dumas-01402410

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01402410>

Submitted on 24 Nov 2016

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 2016

N°74

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

Présentée et soutenue publiquement par

Jane GOURGUES

Née le 30 mai 1992 à Bordeaux (33), France

Le 17 novembre 2016

Diatomées et odontologie légale

**Mise en place d'un protocole méthodologique pour l'étude
de la diffusion passive des diatomées au niveau des dents
au sein d'un milieu de culture**

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 C. BADET	Maître de Conférences des Universités

UNIVERSITE DE BORDEAUX

MAJ 01/10/2016

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

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

Directrice Mme BERTRAND Caroline 58-02
Directrice Adjointe – Chargée de la Formation initiale Mme ORIEZ-PONS Dominique 58-01
Directeur Adjoint – Chargé de la Recherche M. FRICAIN Jean-Christophe 57-02
Directeur Adjoint – Chargé des Relations Internationales M. LASSERRE Jean-François 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.	Bruno	ELLA NGUEMA	Sciences anatomiques et physiologiques - Biomatériaux	58-03
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.	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.	Jean-Christophe	COUTANT	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
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.	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
M.	Adrien	NAVEAU	Prothèse dentaire	58-02
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	Noémie	THEBAUD	Sciences biologiques	57-03
M.	Eric	VACHEY	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01

ASSISTANTS

Mme	Audrey	AUSSEL	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
M.	Wallid	BOUJEMAA AZZI	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Melle	Camille	BOULÉ-MONTPEZAT	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Mathieu	CONTREPOIS	Prothèse dentaire	58-02
M	Jean-Baptiste	CULOT	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
Mme	Clarisse	DE OLIVEIRA	Orthopédie dento-faciale	56-02
M.	Cédric	FALLA	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
Mme	Olivia	KEROUREDAN	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
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
Mme	Marie	MÉDIO	Orthopédie dento-faciale	56-02
Mme	Darrène	NGUYEN	Sciences biologiques	57-03
M.	Ali	NOUREDDINE	Prothèse dentaire	58-02
Mme	Chloé	PELOURDE	Orthopédie dento-faciale	56-02
M.	Mathieu	PITZ	Parodontologie	57-01
Mme	Charlotte	RAGUENEAU	Prothèse dentaire	58-02
M.	Clément	RIVES	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	François	ROUZÉ L'ALZIT	Prothèse dentaire	58-02
M.	François	VIGOUROUX	Parodontologie	57-01

Remerciements

A notre président de thèse,

Madame le Professeur Marie-José BOILEAU

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Sous-section Orthopédie dento-faciale 56-02

Je vous remercie sincèrement du très grand honneur que vous me faites d'avoir accepté la présidence de mon jury de thèse. Veuillez recevoir l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

A 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

Je vous remercie de m'avoir fait découvrir ce sujet, de votre motivation et de votre enseignement au cours de ces dernières années. Votre enthousiasme à l'hôpital comme au laboratoire a été communicatif et moteur dans la réalisation de cette thèse. Merci encore !

A 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 du temps accordé à la relecture et à la correction de mon travail
ainsi que pour votre gentillesse et votre disponibilité. Veuillez accepter mes
remerciements les plus sincères.

A notre assesseur de thèse,

Madame le Docteur Marie-Cécile Badet

Maître de conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Sous-section Sciences biologiques 57-03

Je vous suis très reconnaissante d’avoir accepté de faire partie de ce jury. Votre
aide et votre bonne humeur ont toujours contribué à l’agréable ambiance de Saint-
André. Un grand merci pour ces années de clinique à vos côtés.

Remerciements personnels

A Eshane, pour tout !

A mes parents, mes grands-parents et le reste de la famille

A Pierre

A Natha, à Nicolas

A Sarah, pour toutes ces années d'amitié, pour ces belles randonnées et petits voyages passés et à venir !

A Maeva pour la motivation, les mangues José, les nombreux rangs tricotés ensemble!

A Mélissa, pour ta joie de vivre à toute épreuve et pour ces années à côté de toi en amphi

A Noémie et Anael pour votre bonne humeur et tous ces kilomètres de piscine et de couloirs de Saint-André parcourus ensemble

A Mathilde, ma petite binôme !

A Islaine, Juliette, Sylvain, Clément et les autres

A Maxime pour notre amitié durable !

Aux étudiants de l'optionnel et à Emile pour tout le travail accompli en amont

Table des matières

Introduction	9
1 – Rappels sur les diatomées et leur utilisation en médecine légale	11
1.1 Généralités sur les diatomées (1–3)	11
1.2 Les diatomées en médecine légale	12
1.2.1 Le diagnostic de noyade (1,4–7)	12
1.2.2 Le test de la diatomée	13
2 – Elaboration d'un milieu de culture	15
2.1 Problématique	15
2.2 Hypothèse	15
2.3 Objectifs	15
2.4 Méthodologie	16
2.5 Résultats	16
2.6 Discussion	19
2.7 Conclusion	20
3 – Protocole de décontamination par NaOH	21
3.1 Problématique	21
3.2 Hypothèses	22
3.3 Objectifs	22
3.4 Méthodologie	22
3.5 Résultats	23
3.6 Discussion	26
3.7 Conclusion	27
4 – Protocole d'extraction de la moelle osseuse et de la pulpe dentaire	28
4.1 Problématique	28
4.2 Hypothèse	28
4.3 Objectifs	29
4.4 Méthodologie	29
4.4.1 Premier Protocole :	30
4.4.2 Deuxième Protocole :	32

4.5 Application du protocole pour l'étude de la diffusion passive sur dents humaines extraites et immergées dans l'aquarium	33
4.6 Résultats	35
5 – Application du protocole et test de la diatomées sur dents de noyés	36
5.1 Méthodologie.....	36
5.2 Résultats	38
6 - Discussion.....	41
6.1 Faux positifs	41
6.2 Méthodologie et perte de données	41
6.2.1 Matériel d'observation.....	41
6.2.2 Méthode de digestion	42
6.2.3 Technique de prélèvement.....	42
6.3 Diffusion passive la moelle osseuse	43
6.4 Diffusion passive dans la pulpe dentaire	43
6.5 Test de la diatomées sur dent de noyé et perspectives.....	44
7 – Conclusion.....	45
Table des illustrations	47
Bibliographie	48

Introduction

En médecine légale, le diagnostic positif de noyade est l'un des plus délicats à établir. En effet, si une victime est retrouvée dans un milieu aquatique, cela ne signifie pas nécessairement qu'elle s'y est noyée.

Dans la plupart des milieux aquatiques, se développent les diatomées, des organismes unicellulaires eucaryotes. Elles sont pourvues d'un exosquelette en silice ou frustule, essentiel à leur identification. On dénombre ainsi plus de 10 000 espèces de diatomées.

Lors du processus de noyade, la victime meurt par asphyxie après inhalation d'eau. Durant la phase agonique, les diatomées présentes dans l'eau pénètrent dans l'organisme de la victime par les poumons et sont distribuées à travers les alvéoles pulmonaires dans les organes tels que le cerveau, les reins, la moelle osseuse via la circulation sanguine. En médecine légale, le test de la diatomée permet de détecter ces diatomées notamment dans la moelle osseuse, et leur présence est un élément clé pour établir un diagnostic positif de noyade.

Il est communément admis que si la victime était déjà morte avant son immersion, les diatomées ne sont pas distribuées dans ses organes en absence de circulation sanguine. Cependant, il peut exister des faux positifs dans le test de la diatomée car des phénomènes de diffusion passive inhérents à des séjours prolongés dans l'eau, en particulier dans des cas de décomposition avancée du corps ou de blessures type fracture avant la noyade peuvent être à l'origine d'une contamination au sein de la moelle osseuse.

Trouver un milieu « protégé » au sein de l'organisme humain et qui présente une vascularisation semble indispensable pour valider le test de la diatomée comme indicateur fiable dans le diagnostic de la noyade. Une structure anatomique qui présente l'ensemble de ces indications est le système dentaire et en l'occurrence la pulpe dentaire. En effet, l'anatomie dentaire et les diverses structures histologiques la composant, permettraient de réduire l'obtention de faux positifs dus à une diffusion passive tout en simplifiant le protocole de prélèvement.

Précédemment, le travail du Dr Emile Hourqueig (1) a permis de mettre en évidence la présence de ces phénomènes de diffusion passive sur des os de volailles fracturés et fissurés au préalable, avant leur immersion. En revanche, les expérimentations effectuées sur des os intacts de volaille et de la pulpe dentaire d'agneau, ne permettaient pas, lors de l'analyse des résultats, d'établir avec certitude si la présence de diatomées était due à une diffusion passive, eu égard au temps d'immersion ou à une contamination externe occasionnée par les diverses manipulations de laboratoire au cours de ces prélèvements.

Les objectifs de notre travail sont :

- Dans un premier temps, mettre en place un « biotope » constitué d'un aquarium comprenant des apports successifs de prélèvement d'eau de rivière contenant des diatomées. Ce milieu nous permettra de mettre en immersion des structures anatomiques afin de valider ou pas le processus de diffusion passive
- Dans un second temps, afin d'éliminer les nombreuses contaminations instrumentales occasionnées lors des divers stades de prélèvement et d'analyse, une étude évaluative d'une solution d'hydroxyde de soude à des concentrations différentes permettra de définir le dosage adéquat et le temps requis nécessaire pour permettre une élimination complète des diatomées au niveau des divers instruments et accessoires qui seront utilisés.
- Dans un troisième temps, l'étude d'une éventuelle diffusion passive sur des os longs d'animaux et sur dents humaines isolés et immergés dans notre biotope comprenant les diatomées sera évaluée.

1 – Rappels sur les diatomées et leur utilisation en médecine légale

1.1 Généralités sur les diatomées (1–3)

Les diatomées sont des algues microscopiques, unicellulaires, ayant pour particularité de posséder un exosquelette de silice appelé frustule. Elles sont présentes dans la majorité des milieux aquatiques et vivent grâce à la photosynthèse et aux échanges avec le milieu. Elles absorbent le dioxyde de carbone pour synthétiser des carbonhydrates, essentiels à la chaîne alimentaire marine.

Le développement des diatomées dépend de plusieurs facteurs tels que la température, le pH, la salinité, la teneur en silice des eaux... Chaque diatomée vit dans un équilibre écologique caractéristique de son espèce.

Il existe des diatomées d'eau douce et des diatomées marines. De plus, dans certains milieux humides et à proximité de points d'eau, des diatomées aérophiles peuvent se trouver sur des objets non immergés. Des diatomées peuvent aussi survivre dans des milieux extrêmes à pH très élevés ou très bas, et à de hautes températures. Il y a environ 100 000 espèces répertoriées mais il en existe sans doute beaucoup plus.

Les diatomées planctoniques vivent en eau libre et prédominent dans les cours moyens et inférieurs des grands fleuves.

Les diatomées périphtiques se développent en profondeur et sont présentes sous formes fixées ou libres. Elles peuvent évoluer en colonies grâce à la sécrétion de mucus ou de filaments de chitine.

Les frustules sont composés d'une épithèque et d'une hypothèque qui s'emboîtent pour envelopper la cellule, d'où le nom de diatomée, dérivé du grec *diatomos* (« coupé en deux »). Chaque thèque est composée d'une valve (épivalve et hypovalve) avec des cingulums composés de copulae.

Le frustule est poreux (aréoles) pour permettre les échanges avec le milieu. Ces pores constituent les différentes ornementsations conférant aux diatomées leurs caractéristiques permettant leur identification. Le frustule est ainsi observé en microscopie en face valvaire ou en face connective, face où l'on distingue l'épithèque et l'hypothèque.

On distingue ainsi les diatomées pennées avec raphé (ordre Bacillariophyceae) et sans raphé (Fragilariophyceae), et les diatomées centriques (Coscinodiscophyceae). Chaque ordre est divisé en sous-ordres et familles

Les diatomées ont plusieurs modes de reproduction.

La phase végétative est non sexuée. Elle s'effectue par bipartition : une cellule mère donnant naissance à 2 cellules filles. Chaque cellule fille garde une des deux thèques de la diatomée d'origine et synthétise l'autre moitié de la boîte. Ainsi au cours des cycles, les diatomées diminuent en taille.

Lorsqu'un certain seuil de taille est atteint, les diatomées peuvent passer en phase sexuée ou phase de rajeunissement. Lorsque 2 gamètes se rencontrent, il y a formation d'une auxospore qui, lorsque sa taille est suffisante, devient une nouvelle cellule végétative.

Certaines espèces de diatomées peuvent aussi produire des spores qui survivront à des conditions de vie défavorables pour l'espèce et permettront ainsi la recolonisation du milieu lorsque celui-ci redeviendra favorable.

La culture de diatomées est utilisée dans l'industrie, pour la culture ostréicole, la fabrication de cosmétiques... Leur étude sert aussi à l'établissement d'indices écologiques (qualité de l'eau) et d'indicateurs géologiques.

1.2 Les diatomées en médecine légale

1.2.1 Le diagnostic de noyade (1,4-7)

Il existe 3 processus de noyade différents : la noyade vraie ou mort par submersion, l'hydrocution ou noyade-inhibition et la noyade sèche.

La noyade vraie correspond à la pénétration d'un liquide dans les voies aériennes qui entraîne une asphyxie secondaire avec perte de conscience et arrêt cardiaque. Ce mécanisme est différent selon que l'immersion se produit en eau douce (hypotonique) ou en eau salée (hypertonique). C'est cette mort par submersion que nous cherchons à déterminer avec la recherche de diatomées intra-corporelles.

La mort par hydrocution est due à un effet de choc thermique lors de l'entrée en contact dans le milieu liquide à basse température. Cela entraîne une vasoconstriction des vaisseaux périphériques à l'origine d'une bradycardie allant jusqu'à la syncope puis l'arrêt cardio-respiratoire.

La noyade sèche ou mort subite est un phénomène peu répandu. L'asphyxie serait due à une contraction soudaine du larynx lors de la pénétration du liquide dans les voies aériennes. L'eau ne pénètre alors pas dans les poumons, on parle donc de noyade sèche.

Le diagnostic de noyade se fait grâce à un faisceau d'indices.

Les signes externes sont observés lors de la levée du corps sur le lieu de découverte du cadavre et lors de l'autopsie.

Les signes internes sont recueillis lors de l'autopsie et sont complétés par des examens histochimiques et anatomo-pathologiques dont fait partie le test de la diatomée.

Mais une grande partie de ces indices s'effacent assez vite en cas de séjour prolongé dans l'eau, d'autant plus que la plupart de ces signes ne sont pas considérés comme des preuves caractéristiques d'une mort par noyade. C'est pourquoi le diagnostic de noyade est un des plus compliqués à établir en médecine légale.

1.2.2 Le test de la diatomée

Le principe du test de la diatomée repose sur la diffusion des diatomées dans la circulation sanguine par les alvéoles puis par les capillaires pulmonaires. (8) Elles se retrouvent ainsi dans de nombreux organes tels que le foie, les reins, le cerveau et particulièrement la moelle osseuse.

Le test quantitatif sert de principal argument pour le diagnostic de noyade.

Le test qualitatif permet la recherche du lieu de noyade avec la comparaison entre les espèces recueillies sur le site présumé de noyade et celles retrouvées durant le test. (9)

La recherche des diatomées peut aussi permettre d'émettre des arguments sur la durée d'immersion d'un corps, en étudiant le dépôt de diatomées sur les restes trouvés, et la recherche de suspects impliqués dans le crime en comparant les diatomées du lieu du crime avec celles retrouvées éventuellement sur le suspect.(10,11)

Mais ce test présente certaines limites.

Il existe des doutes sur la présence physiologique de diatomées dans un corps humain : la consommation de certains aliments comme les fruits de mer, le contact fréquent avec un environnement riche en diatomées (travail dans des carrières de diatomites, pêcheurs, etc.) (4,12) pourraient augmenter le nombre de diatomées ante mortem présent dans l'organisme.

Certaines informations peuvent être perdues lors de l'une des phases du test de la diatomée : la phase de digestion. En effet, cette étape délicate consiste à éliminer le maximum de déchets organiques pour une détection optimale des frustules de silice. Elle peut être effectuée par différentes techniques : (12–15)

- la digestion acide : par de l'acide sulfurique, de l'acide chlorhydrique, de l'acide nitrique,
- la digestion enzymatique grâce à la protéinase K
- des techniques de filtration par membranes
- la digestion par du solvène-350

De plus lors de ces phases d'analyse, de nombreuses contaminations peuvent s'effectuer, que ce soit lors de la phase de prélèvement ou lors de l'utilisation d'une instrumentation souillée ou de réactifs contenant des diatomées. (4)

Lors d'une mort par hydrocution, il est aussi très probable d'obtenir de faux négatifs puisque l'eau n'a pas eu le temps de pénétrer dans les poumons.(4,16,17)

Des phénomènes de diffusion passive des diatomées lors d'un temps d'immersion prolongée du corps peuvent survenir. Ils ont été étudiés par plusieurs auteurs (5,6,12,18) mais majoritairement sur les tissus mous alors que la moelle osseuse est considérée comme une source très fiable de prélèvement pour le test de la diatomée (19).

Mais même obtenu à partir de prélèvements de moelle osseuse, le test peut être remis en cause. En effet au vu des travaux précédents d'Emile Hourqueig (1) une diffusion passive à travers certains trous nourriciers présents sur les os longs est susceptible d'entraîner des faux positifs . C'est pourquoi la confirmation de la présence de ces gradients de diffusion et l'étude du test de la diatomée sur la pulpe dentaire sont des objectifs pertinents dans l'établissement d'un test plus fiable.

2 – Elaboration d'un milieu de culture

Cette étape préalable est essentielle pour la suite de notre travail, car nous n'avons aucune idée de la durée de survie de ces diatomées après le prélèvement de l'eau et surtout quand le conditionnement s'effectue en dehors de son contexte naturel.

2.1 Problématique

Lors des expérimentations précédentes (1), l'immersion en milieu naturel ouvert des différents éléments anatomiques animaux, nous a imposé la réalisation de contenants, des boîtes en fil de fer permettant de limiter les perturbations occasionnées par le courant de la rivière.

Les auteurs Zhu et Al. (5) utilisaient aussi un système de cages pour immerger les rats dans une rivière. Cependant ce système ne nous semble pas approprié pour nos expérimentations avec des dents humaines, en partie à cause de l'agitation du courant. De plus, pour les expérimentations prévues, il semblait nécessaire d'avoir un milieu « réservoir » de diatomées à portée de main pour des raisons pratiques (météo, accessibilité) mais également « éthiques », s'agissant de restes anatomiques humains.

2.2 Hypothèse

N'ayant aucune expérience dans ce domaine, nous formulons l'hypothèse nulle ou H_0 que le taux de survie de ces diatomées au sein de d'un aquarium possédant un oxygénateur, sera équivalent à la survie de diatomées prélevées et contenues dans de simples bouteilles plastiques pendant 30 jours.

2.3 Objectifs

- L'objectif principal est de maintenir des diatomées vivantes le plus longtemps possible dans un milieu clos
- L'objectif secondaire est de permettre d'avoir un « réceptacle » assez spacieux pour les futures immersions d'os et de dents

Les paramètres à contrôler pour la survie des diatomées et pour reproduire au mieux leur milieu naturel sont : la température de l'eau et de l'environnement, la luminosité, l'oxygénation de l'eau, la présence de sels minéraux.

2.4 Méthodologie

Après l'achat d'un aquarium de 30 litres avec un oxygénateur, nous avons effectué des prélèvements riches en diatomées au niveau de deux cours d'eau : Le Touch (affluent de la Garonne dans le département de la Haute Garonne) et l'Espagno (Landes), que nous avons transféré dans l'aquarium. Deux enrichissements en diatomées ont été effectués en 8 mois, liés à une évaporation naturelle.

Les prélèvements de diatomées ont été effectués par brossage et grattage des rochers des lits des 2 cours d'eau. Nous avons aussi prélevé des roches, de la vase, du sable et des animaux d'eau douce (crevettes, larves de libellule, escargots d'eau douce...) pour reproduire au mieux le biotope.

Pour évaluer la survie des diatomées dans l'aquarium, nous avons effectué les prélèvements sur le fond de l'aquarium et les parois à 2 semaines, 1 mois et 3 mois.

2.5 Résultats



Figure 1: L'aquarium (Photo : Jane Gourgues)

L'aquarium a été mis en fonctionnement en octobre 2015

Les examens microscopiques des lames comprenant de l'eau de l'aquarium et ayant pour objectif d'observer des diatomées à l'état frais, sont réalisés à 2 semaines, 1 mois et 3 mois. L'examen des prélèvements a mis en évidence la

présence de diatomées toujours vivantes et actives mais également de nombreuses frustules vides. (Tableau 1)

Le biotope s'est aussi révélé viable pour les larves de libellules et les escargots ; toujours vivants à 3 mois.

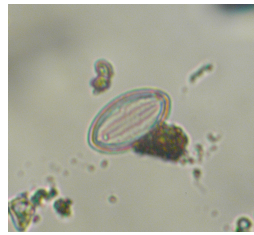
La température de l'eau variait entre 17 et 20 °C.

En janvier 2016, des algues apparaissent et des frustules vides de diatomées ont été observées sur des prélèvements de surface de l'eau.

En avril 2016, avec l'augmentation de la luminosité, un changement d'équilibre est survenu. Les algues sont devenues prédominantes, les larves de libellules ont disparu. Nous avons dès lors décidé de déplacer l'aquarium de façon à ce qu'il soit moins exposé à la lumière directe de la fenêtre. Ainsi un équilibre s'est de nouveau installé sans changement et prolifération d'algues à ce jour.



Gyrosigma



Cocconeis placentula



Face connective d'une diatomée



Cymbella



Face connective



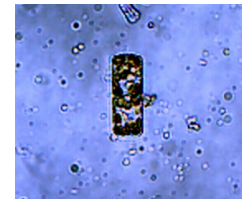
Gomphonema



Pinnularia



Navicula



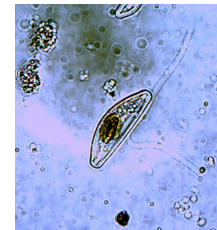
Melosira



Navicula ou Achanthes



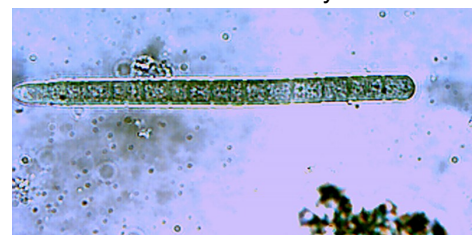
Gomphonema



Encyonema



Pinnularia



Aulacoseira

Tableau 1: Diatomées de l'aquarium. Les échantillons ont été observés à l'état frais, sans préparation optimale pour l'identification des frustules. (crédit photo Jane Gourgues)

2.6 Discussion

L'objectif de cette première phase était de réussir à constituer un milieu de culture permettant à des diatomées de rester vivantes. Cependant, avec cet aquarium, nous n'avons pas effectué d'évaluation qualitative des diverses espèces de diatomées, les apports d'eau successifs ne permettant pas de faire une étude fiable. Certaines espèces semblent s'être adaptées au nouveau milieu que constitue l'aquarium et d'autres n'ont pas survécu et ont été observées à l'état de frustules vides.

La culture de diatomées reste un domaine très spécifique et le nombre de paramètres à contrôler pour la sélection des espèces à cultiver est trop important pour que cela s'avère possible pour notre étude. De plus, la diversité de diatomées présentes dans l'aquarium se rapproche du milieu naturel.

Pour leur étude de l'évolution post-mortem de cadavres dans l'eau sur modèle animal (6), Di Giancamillo et Al ont utilisé des porcelets déjà morts naturellement immergés dans de l'eau riche en diatomées. Ils ont alors étudié l'évolution des tissus et la présence de diatomées sur différents organes à 1, 2 et 3 mois.

Pour l'immersion des cadavres de porcelets, deux bacs à l'air libre ont été remplis avec deux tiers d'eau courante et un tiers d'eau enrichie en diatomées. Un comptage systématique des diatomées par millimètre de lame a été effectué pour contrôler la richesse en diatomées en début d'étude. Il n'y a pas eu de contrôle de la survie des diatomées à 3 mois, durée de l'immersion des carcasses de porcelets. Il n'est pas non plus précisé les espèces observées et sélectionnées pour cette étude.

Lors de l'analyse et la visualisation des lames, il est très intéressant de constater que les espèces retrouvées dans notre aquarium sont de petite taille (comme les naviculas), ce qui demeure compatible avec les espèces susceptibles de participer à des phénomènes de diffusion passive dans l'os ou la dent.

Les diatomées ont une taille variant de 0,2µm à environ 1 mm (2,3) mais seules des diatomées d'une taille inférieure à 30µm sont capables de traverser la barrière alvéolo-capillaire. (7,8,16,20)

On peut supposer que l'on pourra retrouver dans la pulpe des espèces de diatomées similaires à celles retrouvées dans la moelle osseuse (*Stephanodiscus parvus*, *Navicula*, *Synedra ulna*...) (21) car la constriction apicale d'une dent est de l'ordre de 210 à 224 µm.

2.7 Conclusion

A cette étape de l'expérimentation, les résultats positifs obtenus sur la vitalité des diatomées au sein d'une structure close sur un intervalle de temps supérieur à 3 mois, nous permettent de pouvoir étudier la diffusion passive de ces diatomées au travers de diverses structures anatomiques, qu'elles soient osseuses ou dentaires.

Afin d'éliminer toutes les erreurs méthodologiques de contamination inhérentes aux diverses manipulations, la phase suivante sera de déterminer le protocole de nettoyage à utiliser pour les divers prélèvements à effectuer suite à l'immersion.

3 – Protocole de décontamination par NaOH

3.1 Problématique

Actuellement, la validité de la méthode de diagnostic de la noyade par les diatomées pose de nombreux doutes (12,22,23), car de multiples contaminations peuvent intervenir aux différents temps opératoires, par exemple lors des prélèvements humains, que ce soit à cause de l'instrumentation utilisée ou de la méthode de prélèvement utilisée. (6,12)

En effet, même dans des cas de noyade dans l'eau de bain, on retrouve des diatomées (24). Nous pouvons donc nous poser la question d'une contamination par l'eau courante utilisée lors d'une autopsie de « routine ».

Dans l'étude de DiGiancamillo en 2010 (6), pour l'étude de la diffusion passive des diatomées sur des porcelets morts avant leur immersion, les risques de contamination croisée sont évoqués mais non détaillés ; et en 2013, Lunetta (12), pour l'étude de la diffusion passive des diatomées sur des cadavres en état de putréfaction, précisait que ce risque de contamination post-mortem augmentait avec le degré de putréfaction du corps mais cette conclusion n'est valable que pour les tissus mous testés, la moelle osseuse n'ayant pas été prise en compte.

Pour éliminer l'hypothèse d'une contamination post-mortem, il faut une règle stricte de prélèvement et de traitement des échantillons. Or il n'existe pas de consensus sur un protocole établi de décontamination de l'instrumentation avant les prélèvements. Les diatomées sont présentes dans quasiment tous les milieux aquatiques même à dose infime (eau du robinet). De plus, le nombre de diatomées pour lequel le test est considéré comme positif diffère selon les auteurs. (12,19)

Les protocoles de décontamination de l'instrumentation trouvés dans la littérature sont vagues : trempage des instruments 24h dans une solution de soude équimolaire pour certains auteurs (4,12,19) ou rinçage à l'eau distillée pour d'autres. (5)

Les protocoles de prélèvements de la moelle osseuse (fémur ou sternum) sont aussi très peu décrits et la question du risque de contamination par les tissus mous environnants n'est pas toujours évoquée.

Un protocole rigoureux et fiable permettrait d'éliminer au maximum les risques de faux positifs par contamination et de mettre en évidence les phénomènes de diffusion passive des diatomées dans la moelle osseuse dans les cas d'analyse de corps putréfiés et de longs séjours dans un milieu aquatique.

3.2 Hypothèses

La soude caustique (NaOH) a été retenue pour mettre en place le protocole de décontamination pour ses propriétés dissolvantes sur les composés silicieux et sa solubilité dans l'eau. Elle a, de plus, déjà été évoquée par certains auteurs pour la décontamination des instruments utilisés pour le test de la diatomée.(4,12,19)

Nous établissons alors l'hypothèse nulle : la variation de concentrations de NaOH n'a aucun effet sur les diatomées.

L'hypothèse alternative sera que la concentration de NaOH a une influence sur la destruction des frustules de diatomées.

3.3 Objectifs

- Observer la quantité de frustules de diatomées résiduelles après trempage dans différentes concentrations de NaOH.
- Observer l'action du NaOH sur les frustules silicieux
- Déterminer le temps et la concentration de NaOH nécessaires pour une destruction totale des frustules

La variable dépendante de l'expérimentation sera alors la concentration de diatomées et les variables indépendantes, la concentration NaOH et le temps.

3.4 Méthodologie

Deux prélèvements (A et B) de 1,5 L d'eau chargée en diatomées ont été effectués sur deux sites différents du Touch.

Chaque prélèvement a été divisé en 4 échantillons de 25 cl environ.

Dans chaque échantillon, de l'hydroxyde de sodium (ou soude caustique) à différentes concentrations a été ajoutée :

- 1 échantillon sans NaOH = M0
- NaOH à 1 mole par litre, solution équimolaire = M1
- NaOH à 1,5 mole par litre = M1,5
- NaOH à 2 moles par litre = M2

Pour une solution équimolaire de soude, la concentration était de 40 grammes de cristaux de NaOH dilués dans 1 litre d'eau distillée ; pour une solution à 1,5 mole par litre, il faut donc 60 grammes de cristaux de NaOH dilués dans 1 litre d'eau distillée, et pour une solution à 2 moles par litre, 80 grammes.

Nous avons effectués des prélèvements dans ces échantillons à différents instants : T=0, T=48h, T=4jours, T=7jours et T=14jours.

Au début, nous avions prévu de répartir sur des lamelles mises à sécher puis fixées avec de l'Eukitt® mais nous avons été confrontés à un problème de visibilité due à la re-cristallisation de la soude, rendant les lames illisibles au microscope.

Nous avons donc mis en place un deuxième protocole avec des prélèvements de 1ml de chaque échantillon après agitation pour homogénéiser la répartition des diatomées dans l'échantillon.

Chaque échantillon a été dilué dans 20 ml d'eau distillée puis nous avons neutralisé l'effet de la soude caustique avec de l'acide chlorhydrique à 23% jusqu'à obtenir un pH neutre dans les échantillons.

De chacun de ces échantillons, cinq lames ont été réalisées et observées à l'état frais au microscope avec un objectif x20.

Le comptage des diatomées a été systématique pour chaque lame. Dès qu'une frustule était identifiable, même incomplète, elle a été comptabilisée.

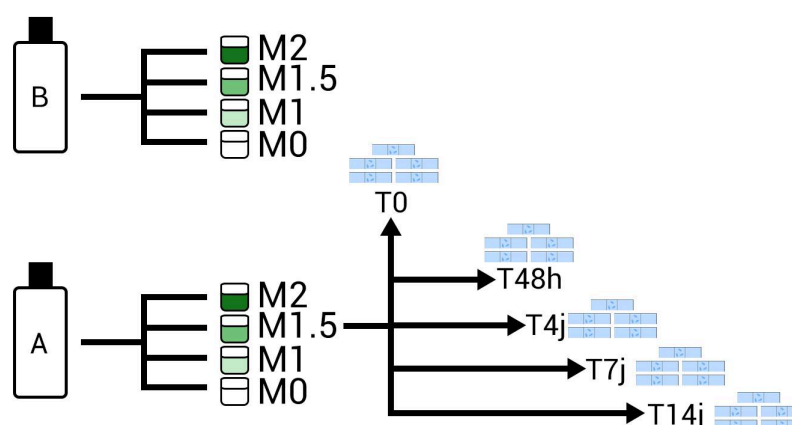


Figure 2: Protocole NaOH (source : Jane Gourgues)

3.5 Résultats

40 échantillons ont été réalisés et 200 lames observées.

Sur la structure même des frustules, nous avons constaté une déformation et une destruction progressive des frustules silicieux en fonction du temps et de la concentration de NaOH. (Tableau 2)

L'analyse quantitative du nombre de diatomées par lames en fonction du temps et de la concentration de NaOH a montré que l'effet sur les frustules ne devenait significatif qu'à partir d'une concentration à 1,5 moles par litre. On constate la destruction totale des frustules à partir de deux semaines. (Tableau 3 et Figure 3)

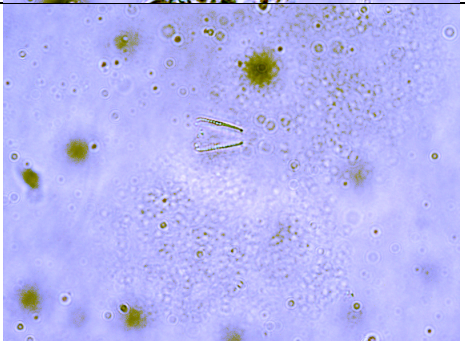
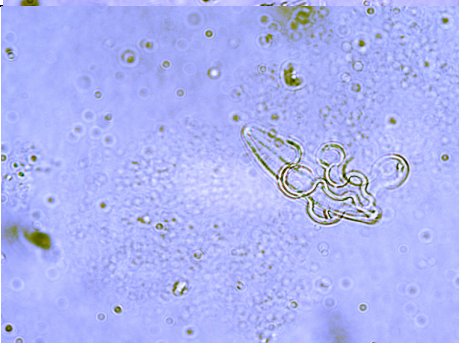
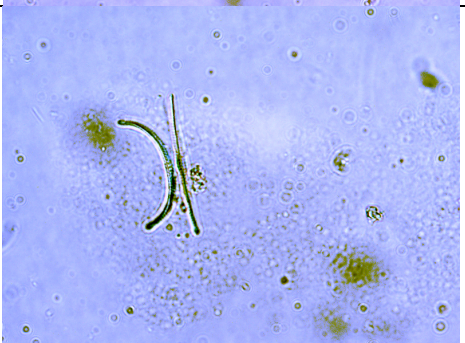
Solution à 1 mole / litre de NaOH		
		
Solution à 1,5 mole / litre de NaOH		
Solution à 2 moles / litre de NaOH		

Tableau 2: Résultats qualitatifs: effet de NaOH à 48h sur la structure silicieuse des diatomées (crédit photo Jane Gourgues)

[NaOH]	Echantillon	lames	T0	T48h	T4j	T7j	T14j
0	A	P1	300	300	300	300	300
		P2	300	300	300	300	300
		P3	300	300	300	300	300
		P4	300	300	300	300	300
		P5	300	300	300	300	300
	B	P1	300	300	300	300	300
		P2	300	300	300	300	300
		P3	300	300	300	300	300
		P4	300	300	300	300	300
		P5	300	300	300	300	300
1	A	P1	300	292	245	220	21
		P2	300	300	231	212	28
		P3	300	273	198	198	16
		P4	300	298	233	187	20
		P5	300	300	224	209	22
	B	P1	300	298	236	187	10
		P2	300	277	197	170	12
		P3	300	300	225	179	9
		P4	300	284	206	183	15
		P5	300	296	188	175	10
1,5	A	P1	300	102	85	35	0
		P2	300	93	106	43	1
		P3	300	117	65	48	1
		P4	300	108	89	39	0
		P5	300	90	71	50	4
	B	P1	300	114	96	61	1
		P2	300	102	120	52	0
		P3	300	120	54	74	0
		P4	300	95	86	69	0
		P5	300	104	102	54	2
2	A	P1	300	72	42	18	1
		P2	300	84	57	9	0
		P3	300	95	39	27	0
		P4	300	93	31	15	1
		P5	300	86	45	12	0
	B	P1	300	53	19	10	0
		P2	300	74	13	8	0
		P3	300	60	14	7	0
		P4	300	52	22	3	0
		P5	300	83	20	8	1

Tableau 3: Résultats quantitatifs obtenus après comptage systématique des lames

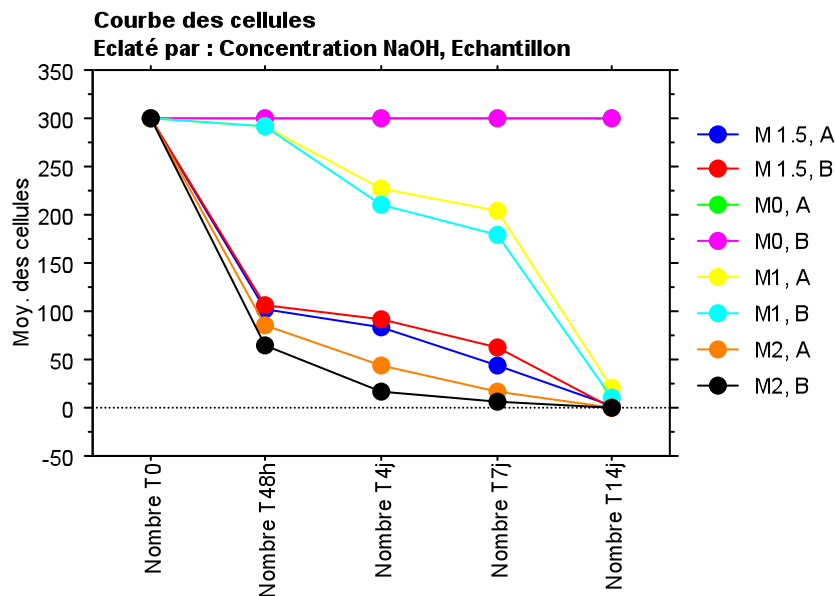


Figure 3: Nombre de frustules observées en fonction du temps et de la concentration en NaOH

3.6 Discussion

On observe que le trempage des instruments dans une solution équimolaire de soude pendant 24h proposé par Grandmaison et Lunetta (4,12,19) n'est pas suffisant. En 1994, Ludes (25) proposait le trempage de l'instrumentation 24h dans une solution à 2 N de NaOH (2 unité de normalité ce qui correspond pour NaOH à 2 unités molaires). Néanmoins, l'effet de la soude sur les frustules siliceux, quelque soit sa concentration, au bout de 24h ne peut pas être retenu comme suffisant pour une bonne décontamination. Les résultats deviennent significatifs avec une solution de soude concentrée à 2 moles par litre au bout de 4 jours.

Pour obtenir ces résultats, nous avons utilisé des échantillons avec de fortes concentrations diatomées qui ne seraient pas aussi importantes sur une instrumentation utilisée pour des prélèvements post-mortems mais les résultats quantitatifs et qualitatifs de l'effet de la soude sur les frustules démontrent qu'il faut une concentration et une durée de trempage de plus de 48h pour observer une destruction significative des frustules.

Le protocole de trempage des instruments dans une solution de NaOH concentrée à 2 moles par litre au moins 14 jours avant leur utilisation peut ainsi être proposé. L'utilisation de NaOH à de fortes concentrations est néanmoins dangereuse et toutes les précautions d'usage devront être entreprises. Ce protocole est long, il faut donc prévoir une instrumentation décontaminée à l'avance et se pose aussi la question de la conservation de l'instrumentation exempte de diatomées.

Lors de la recherche de frustules dans les prélèvements post-mortem un autre facteur important à prendre en compte est la taille des diatomées observées. En effet, le risque de contamination doit être évoqué pour des frustules de plus de 10 à 30 μm (7,16,20), dimensions au dessus desquelles les diatomées ne peuvent pas pénétrer les capillaires sanguins.

De plus, la comparaison des frustules retrouvées durant le test avec celles prélevées sur le site de noyade présumé peut aussi aider à déterminer une éventuelle contamination. (26)

3.7 Conclusion

Nous avons établi qu'une concentration de 2 moles par litre de NaOH est susceptible de détruire toutes les frustules d'un échantillon à 14 jours.

Ces résultats nous permettent d'établir un protocole de décontamination de l'instrumentation utilisée pour les prélèvements post mortem destinés au test de la diatomée.

Nous réduisons ainsi le risque de contamination des échantillons aux diatomées présentes à la surface des tissus à prélever (périoste pour la moelle osseuse, émail et ciment pour la pulpe dentaire).

4 – Protocole d'extraction de la moelle osseuse et de la pulpe dentaire

4.1 Problématique

En l'état actuel des connaissances, le test de la diatomée pose un problème lors de cas de putréfaction avancée ou de fracture des os longs. En effet, il est très certain qu'une diffusion passive des diatomées du milieu aquatique s'établisse et ne permette pas d'établir le diagnostic de noyade avec certitude.

Il y a peu d'études dans la littérature sur la diffusion passive des diatomées dans la moelle osseuse (référence actuelle pour le test de la diatomée). (5,6,12,18)

Précédemment, la thèse d'Emile Hourqueig (1) a mis en évidence une diffusion passive sur des os de volaille fracturés immergés avec un gradient de diffusion par rapport à la zone endommagée.

Sur os intacts, des diatomées ont été mises en évidence avec des valeurs en dessous des valeurs seuils. Il existait donc un doute sur une contamination extérieure ou sur l'existence d'une vraie diffusion passive.

Pour les premiers essais sur la pulpe dentaire d'agneau, aucune diffusion passive n'a été démontrée.

Afin d'appliquer le test de la diatomée sur dents de noyés, il est nécessaire de prendre en amont toutes les précautions afin de diminuer et idéalement de supprimer toutes les sources de contamination des prélèvements.

Un protocole systématique et simple est donc nécessaire afin d'extraire la pulpe dentaire de dents et la moelle osseuse de victimes présumées de noyades sans que celle-ci soit contaminée par les diatomées déposées sur l'extérieure de la dent et sur l'instrumentation utilisée.

4.2 Hypothèse

- Le trempage de l'instrumentation dans une solution à 2 moles par litre de NaOH pendant 15 jours suffit à détruire tous les résidus de frustules silicieuses pouvant être présentes sur les instruments

- La décontamination de la surface externe des dents et os à étudier permet de réduire la contamination interne de la pulpe et de la moelle.

4.3 Objectifs

Réduire les contaminations de la pulpe dentaire et de la moelle osseuse par les diatomées potentiellement présentes sur la surface externe des dents de noyés et des diatomées potentiellement présentes sur les instruments.

4.4 Méthodologie

Nous avons déterminé toute l'instrumentation nécessaire au protocole d'extraction de la pulpe dentaire sur dents de noyés

- flacons
- racleurs et limes endodontiques
- disques
- pipettes
- lames
- précelles

Tous les instruments ont été plongés 15 jours dans un bac contenant 2 litres d'une solution à 2 moles par litre de NaOH. Un deuxième bac de soude a été prévu pour le roulement de l'instrumentation afin que chaque instrument utilisé en contact avec des diatomées soit décontaminé 15 jours dans la soude. (Figure 4)

Deux bacs d'eau distillée ont été mis en place pour le rinçage des instruments à la sortie du bac de soude. (Figure 5) L'eau distillée a été contrôlée par 4 lames réalisées avec des échantillons des fonds de chaque bac. Aucune diatomée n'a été détectée sur ces échantillons.



Figure 4: Instrumentation dans la solution à 2M/L de NaOH (photo : Jane Gourgues)

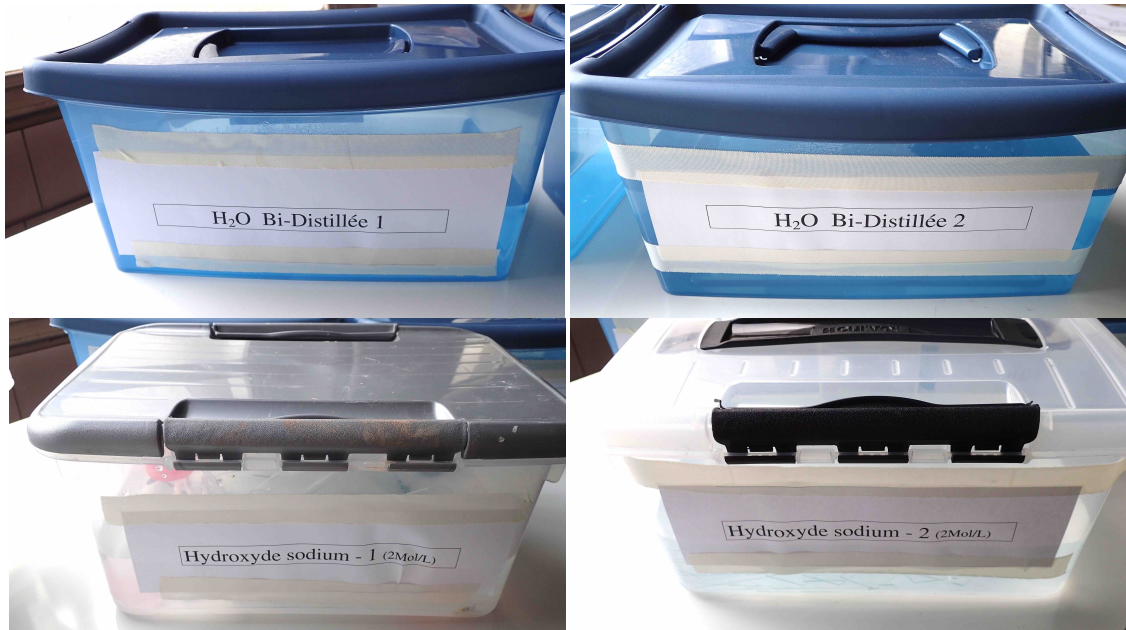


Figure 5: Bacs de décontamination et de rinçage de l'instrumentation (photo : Jane Gourgues)

4.4.1 Premier Protocole :

Dans un premier protocole, nous voulions étudier la diffusion passive des diatomées sur dents de veau et moelle osseuse de poulet.

Nous avons immergé 3 semaines deux os de poulets et une mâchoire de veau pourvue de ses dents dans l'aquarium.



Figure 6: Maxillaire de veau dans l'aquarium (photo : Jane Gourgues)

Afin d'effectuer une décontamination de surface des éléments anatomiques, nous avons décidé d'immerger 15 jours des os de poulets et de veau dans 500 ml

de NaOH à une concentration de 2 moles par litre, afin d'étudier la diffusion passive des diatomées sur modèle animal.

Les dents de veau ont été fixées sur un bloc de polystyrène afin d'éviter le passage de la soude par les apex ouvertes et ainsi de détruire les diatomées potentiellement présentes dans la pulpe (.Figure 7 et Figure 8)

Mais au bout de quelques jours, nous avons observé une destruction des tissus dentaires et osseux, rendant les échantillons non exploitables. (Figure 9)



Figure 7: Dents de veau et os de poulets utilisés pour l'immersion dans NaOH à 2M/L (photo : Jane Gourgues)



Figure 8: Os de poulet et dents de veau immergés dans la solution à 2M/L de NaOH (photo : Jane Gourgues)



Figure 9: Os de poulet et dents de veau après 7 jours d'immersion dans la solution de NaOH à 2M/L (photo : Jane Gourgues)

4.4.2 Deuxième Protocole :

Après l'échec du premier protocole, nous n'avions plus d'échantillons animaux exploitables et avons décidé de changer complètement le protocole et de l'appliquer directement sur les dents humaines.

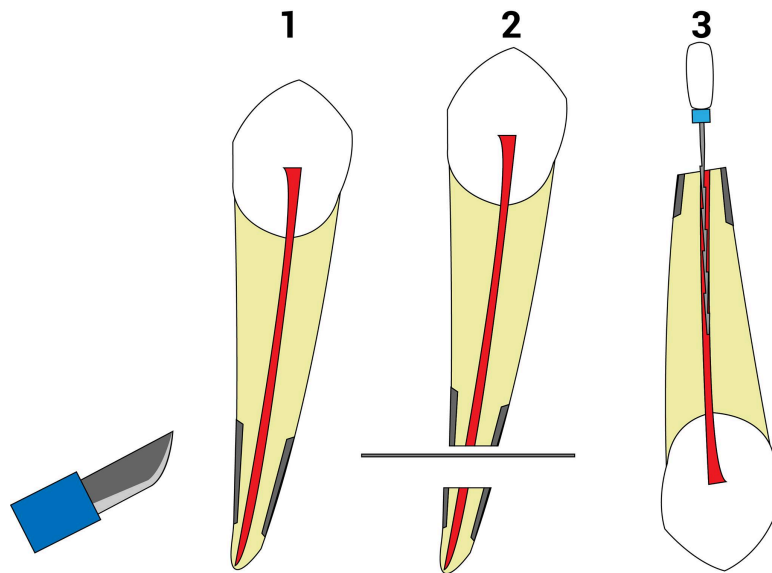
Pour parvenir à extraire la pulpe de dents immergées ou de noyées, en éliminant les diatomées de surface, nous avons établi un protocole systématique, appliqué à toutes les dents que nous avons analysées. (Figure 10)

Nous avons gratté la surface de la racine la plus proche de l'apex. Ce raclage s'est fait sous rinçage à l'eau distillée et avec un bistouri stérile.

Nous avons ensuite procédé à la coupe de l'apex dentaire avec un disque préalablement décontaminé 15 jours dans la solution de soude à 2M/L.

Avec des limes et racleurs endodontiques décontaminés eux aussi, nous avons extrait la pulpe dentaire.

La pulpe extraite est mise en solution dans un flacon avec de l'eau distillée et le manche des instruments endodontiques est sectionné avec le même disque afin que la partie travaillante de l'instrument soit récupérée dans le flacon sans avoir été en contact avec les gants souillés de l'utilisateur.



**Figure 10: Protocole d'extraction de la pulpe de dents de noyées ou immergées
(source : Jane Gourgues)**

4.5 Application du protocole pour l'étude de la diffusion passive sur dents humaines extraites et immergées dans l'aquarium

Nous avons prélevé les pulpes de 7 dents que nous avons immergées pendant 3 semaines dans l'aquarium. (Figure 11)

Ces dents provenaient d'extractions effectuées sur des patients présentant des problèmes parodontaux.

Les pulpes de ces dents ont été extraites suivant le protocole décrit au chapitre précédent. (Figure 10)

Nous avons réalisé et observé 10 lames à l'état frais de l'échantillon concentré en pulpes de dents immergées.

Pour chaque lame, toute la surface a été observée et analysée au microscope grossissement x40. Les diatomées retrouvées ont été photographiées le plus souvent possible.



Figure 11: Dents immergées dans l'aquarium (photo : Jane Gourgues)

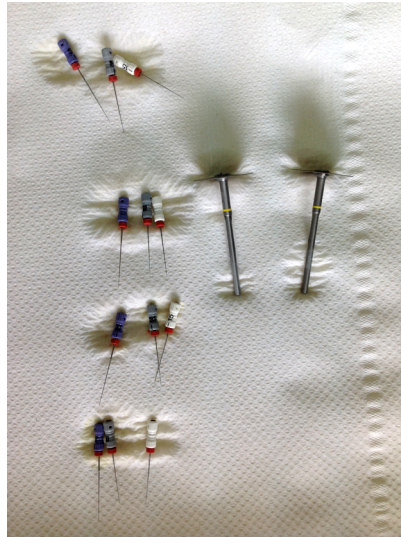


Figure 12: Instrumentation utilisée pour les prélèvements, après trempage dans la solution de NaOH (photo : Jane Gourgues)

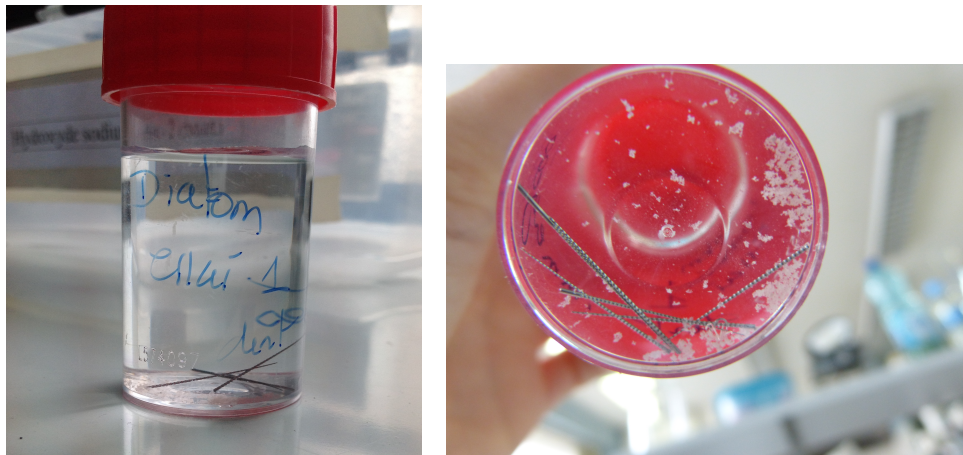


Figure 13: Echantillon des pulpes issues des 7 dents immergées (photo : Jane Gourgues)

4.6 Résultats

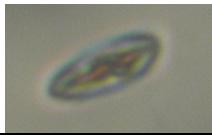
Lames	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Diatomées détectées	0	0	1 navicula	0	0	1 navicula 	0	0	0	0

Tableau 4: Nombre de diatomées observées sur les lames à l'état frais des échantillons obtenus après prélèvement des pulpes de dents immergées dans l'aquarium (source Jane Gourgues)

Nous avons donc observé 10 lames à l'état frais et seulement 2 diatomées de type Navicula ont été repérées.

5 – Application du protocole et test de la diatomées sur dents de noyés

Lors de deux autopsies réalisées à l'Institut médico-légal du CHU de Bordeaux sur des cas de noyade présumée, il a été possible de prélever deux dents sur chaque cadavre. Nous avons donc mis en application le test de la diatomée sur les pulpes dentaires extraites selon le protocole établi précédemment.

5.1 Méthodologie

Nous avons prélevé les pulpes des 4 dents selon le même protocole que précédemment. (Figure 10)

Nous avons ainsi constitué un échantillon pour chaque victime, contenant deux pulpes dentaires extraites. (Figure 18)

Nous avons réalisé et observé 10 lames à l'état frais.

De plus, nous avons voulu appliquer un protocole de digestion à ces échantillons afin d'obtenir une meilleure lisibilité des lames.

La moitié des 2 échantillons des pulpes de noyés a donc été digérée selon le même protocole que la thèse d'Emile Hourqueig (1) avec de l'acide chlorhydrique à 23% puis de l'eau oxygénée (13) et suivant des étapes de décantation et de dilution à l'eau distillée. 5 lames de chacun des 2 échantillons ont été ensuite fixées avec de l'Eukitt®.

De la même façon que pour les dents immergées dans l'aquarium, pour chaque lame, toute la surface est observée et analysée au microscope grossissement x40. Les diatomées retrouvées ont été photographiées.



Figure 14: Dents de noyés après nettoyage de la surface (photo : Jane Gourgues)

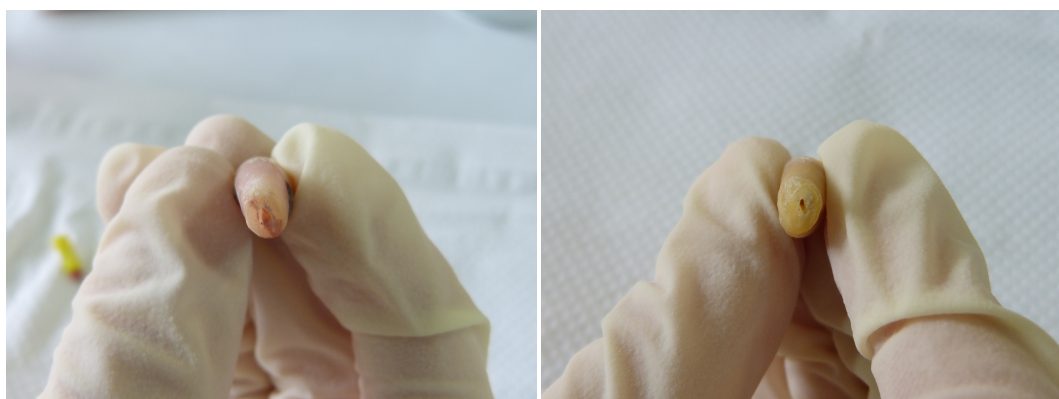


Figure 15: Les deux dents de noyés après section au disque de l'apex (photo : Jane Gourgues)



Figure 16: Les deux dents de noyés après section de l'apex (photo : Jane Gourgues)

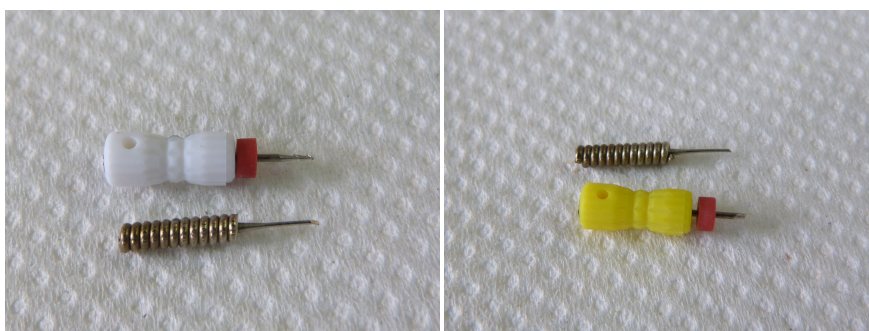


Figure 17: Instruments endodontiques utilisés pour l'extraction de la pulpe, la partie travaillante sectionnée (photo : Jane Gourgues)



Figure 18: Echantillon de pulpe issue d'une dent d'une victime de noyage supposée (photo : Jane Gourgues)

5.2 Résultats

A l'état frais, 20 lames ont donc été observées par screening et 10 lames fixées à l'Eurkitt® ont été analysées de la même manière. Les résultats et photographies obtenues ont été synthétisés dans les deux tableaux ci-dessous. (Tableau 5 et Tableau 6)

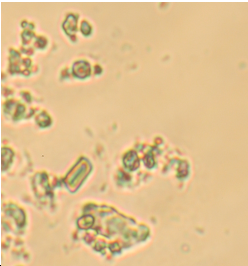
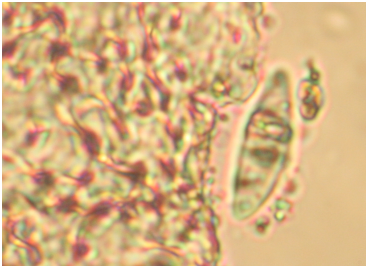
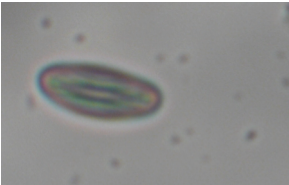
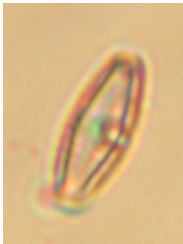
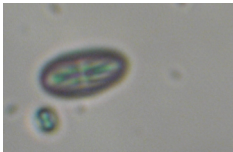
Lames	Noyé 1	Noyé 2
1	1 navicula 	0
2	0	0
3	1 navicula + 1 cyclotella austriaca 	0
4	0	1 navicula 
5	0	0
6	1 navicula 	0
7	0	0
8	1 navicula	0
9	0	1 navicula 
10	0	0

Tableau 5: Nombre de diatomées observées sur les lames à l'état frais des échantillons obtenus après prélèvement des pulpes de dents de noyés (source : Jane Gourgues)

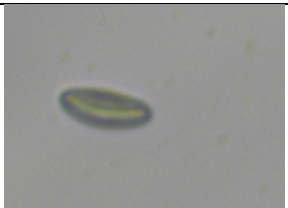
Echantillon	Lames	Nombre de diatomées	Photos
Noyé 1	N1L1	0	
	N1L2	1 navicula	
	N1L3	0	
	N1L4	0	
	N1L5	0	
Noyé 2	N2L1	0	
	N2L2	0	
	N2L3	0	
	N2L4	0	
	N2L5	0	

Tableau 6: Résultats obtenus après digestion enzymatique des échantillons et fixation des lames à l'Eukitt® (source : Jane Gourgues)

6 - Discussion

Les résultats obtenus sur les dents de noyés semblent être plus probants que sur les dents immergées mais restent non significatifs compte tenu du petit nombre de dents testées.

6.1 Faux positifs

Pour nos expérimentations, nous avons éliminé le risque de contamination des échantillons par le trempage des instruments plus de quatorze jours dans de la soude concentrée à deux moles par litre et par le nettoyage précautionneux de la surface de coupe des dents avant prélèvement de la pulpe.

Durant nos analyses, nous avons retrouvé seulement des diatomées de petite taille, ce qui est un élément favorable dans le sens d'une absence de contamination externe.

Pour les dents que nous avons immergées dans l'aquarium ainsi que pour les dents issues de victimes présumées de noyade, nous n'avons pas de données personnelles sur les patients (âge, alimentation, lieu de vie etc.). Certains éléments auraient pu être mis en corrélation avec la présence de diatomées dans leur pulpe dentaire car pour certains auteurs tels que Lunetta et Al. et Yen et. Al. (12,22), la présence de diatomées en ante-mortem dans l'organisme peut être due à de nombreux facteurs comme: un habitat ou travail proche d'un cours d'eau ou de la mer ou d'une carrière de diatomite, une alimentation riche en produits de la mer, etc. De plus, l'expérience de Krstic et Al. sur des rats ayant eu une alimentation riche en diatomées pendant 7 jours a montré la présence de diatomées dans tous les organes testés dont la moelle osseuse.

6.2 Méthodologie et perte de données

Certaines informations ont pu être perdues au cours de l'analyse des données. En effet, la majorité des lames ont été observées à l'état frais et le screening ou comptage des lames s'est parfois avéré difficile de part les dépôts résiduels toujours observables.

6.2.1 Matériel d'observation

Pour l'observation des lames, nous disposons d'un microscope Olympus BH-2 avec un objectif de grossissement x40.

Il semblerait que la majorité des auteurs utilisent des grossissements plus importants pour la détection des diatomées, grâce à un objectif à immersion. Cela augmenterait le temps de recherche mais deviendrait plus intéressant pour mieux discerner les types de diatomées.

La fixation systématique de toutes les lames constituerait un élément très intéressant pour la vérification ultérieure des lames et une plus haute reproductibilité.

6.2.2 Méthode de digestion

La méthode de digestion acide que nous avons utilisée est simple et rapide, elle a de plus montré ses preuves et présente des résultats satisfaisants pour la conservation des frustules. (7,13)

Mais d'après des études récentes la méthode la plus fiable pour la digestion des débris organiques, nécessaire à une observation très précise des frustules est la digestion enzymatique à l'aide de la protéinase K. Cette méthode a été décrite dans de nombreuses publications.(15,27,28)

De nouvelles méthodes de biologie moléculaire avec détection de l'ADN des diatomées semblent très pertinentes afin d'être certain de ne passer à côté d'aucune trace de diatomées. (29)

Le comptage automatique des frustules en microscopie électronique s'avère être aussi un excellent moyen de détection fiable des diatomées. (30)

Ces méthodes permettraient de s'affranchir d'un certain « entraînement » à détecter les frustules car même en tenant compte de l'extrême diversité des diatomées, de nombreuses frustules peuvent passer inaperçues notamment pour la détection des espèces maritimes qui peuvent présenter des formes moins remarquables que les frustules observées dans notre aquarium. (formes rondes plus discrètes). Cette étape très subjective du test de la diatomée peut aussi être à l'origine d'une absence de concordance quant à la valeur seuil pour lequel un test est considéré comme positif. (12)

6.2.3 Technique de prélèvement

A ce jour, le protocole d'extraction de la moelle osseuse sur les victimes présumées de noyade, n'est pas précisément décrit dans la littérature. Nous avons mis en place un protocole simple et reproductible pour tous nos prélèvements de pulpe dentaire.

Il serait intéressant d'appliquer notre protocole d'extraction de la pulpe dentaire à la moelle osseuse, en prenant en compte un potentiel gradient de diffusion dans la moelle osseuse par rapport à des trous nourriciers. (1)

6.3 Diffusion passive la moelle osseuse

La diffusion passive des diatomées sur modèle animal a été plusieurs fois explorée par de nombreux auteurs.

Svetislav et Al. (18) ont étudié différents groupes de rats, dont un groupe de rats tués puis immergés 7 jours dans une eau riche en diatomées. Une diffusion passive était présente dans les organes mous mais la moelle osseuse n'a pas été testée.

Pour DiGiancamillo et Al. (6), sur des porcelets immergés jusqu'à 3 mois dans des bacs riches en diatomées, la diffusion passive a aussi été mise en évidence à travers les tissus mous mais la moelle osseuse n'a pas été testée.

L'étude de Lunetta et Al. (12) portait sur l'étude de la diffusion passive dans des organes de cadavres en décomposition avancée, par injection d'eau riche en diatomées dans leurs poumons. Là encore, la moelle osseuse n'a pas été vérifiée.

La présence d'une diffusion passive dans la moelle osseuse reste donc un sujet délicat qu'il serait très judicieux d'approfondir.

6.4 Diffusion passive dans la pulpe dentaire

Nous avons pour la première fois testé la présence de diatomées dans la pulpe dentaire humaine sur dents extraites immergées dans l'aquarium. Ces résultats ne paraissent pas significatifs.

Le petit nombre de lames réalisées durant nos expérimentations ne permet pas d'affirmer ou d'infirmer la présence d'une diffusion passive dans la pulpe dentaire. L'étude d'un plus grand nombre d'échantillon paraît nécessaire afin d'obtenir des résultats significatifs et d'en tirer des conclusions exploitables.

La très petite taille d'échantillon de pulpe testée peut aussi laisser supposer une trop grande dilution de l'échantillon

Le modèle animal reste toujours une solution pertinente pour approfondir nos recherches.

Les résultats encourageants sur l'étude de la diffusion passive sur dents d'agneau par Emile Hourqueig en 2015 (1) laissaient penser que la diffusion passive était très faible voire inexistante. Il faut noter que les expériences ont été réalisées sur des dents en place dans leur os alvéolaire.

L'étude de la diffusion passive sur la pulpe dentaire sur mâchoires animales permet de se rapprocher au plus près d'un milieu comparable à celui d'une victime, c'est à dire la présence autour de la dent de la barrière que constituent l'os alvéolaire et le ligament alvéolo-dentaire.

Les aspects éthiques et pratiques sont à considérer pour étudier ces différents facteurs sur modèle humain.

6.5 Test de la diatomées sur dent de noyé et perspectives

Nous avons effectué les premiers tests de diatomées sur dents appartenant à des victimes présumées de noyade.

Jusqu'ici, les principales études sur le test de la diatomée mettaient en rapport les résultats obtenus sur moelle osseuse, rein, poumons ou foie de victimes probables de noyade. Même si le prélèvement de la moelle osseuse est considéré comme l'élément essentiel de la fiabilité du test de la diatomée(4,19), une étude récente de Coelho et Al. (2016) (9) montre la présence de diatomées dans des tissus mous tels que l'estomac et les poumons mais l'absence de diatomées dans la moelle osseuse des 37 cas reste incompréhensible.

Il serait aussi judicieux de comparer des échantillons de moelle osseuse, rein, poumons, foie, et pulpe dentaire sur des victimes présumées de noyade, tout en les mettant en corrélation avec les autres éléments recueillis lors de l'autopsie et lors de l'établissement de l'histoire de la victime (habitudes alimentaire, lieu de vie et travail). L'état bucco-dentaire général de la victime pourrait aussi être pris en compte afin de voir l'impact sur la présence de diatomées ou non dans la pulpe : âge du patient, volume pulpaire, ouverture de l'apex etc.

Il serait aussi intéressant de tester des dents extraites provenant de patients ayant été exposés à un environnement riche en diatomées.

La cartographie des espèces de diatomées d'eau douce et/ou salée reste toujours un enjeu pour comparer les diatomées retrouvées dans le corps de la victime et celles présentes sur site de noyade (24,26,31). Elle peut aussi permettre de relier un suspect à scène de crime (11). Une cartographie des espèces retrouvées au sein d'un même cours d'eau semble trop compliquée à exploiter à des fins de médecine légale en raison des nombreuses variations des proportions d'espèces de diatomées selon les saisons, les variations météorologiques etc. Elle peut en outre servir à déterminer si la noyade a eu lieu en eau douce ou salée. (9)

7 – Conclusion

Le test de la diatomée est aujourd'hui controversé en raison de multiples biais d'interprétation des résultats, dus majoritairement à de nombreuses sources de contamination lors des prélèvements.

Afin d'établir avec certitude la fiabilité du test de la diatomée, l'étude de la diffusion passive des diatomées dans la moelle osseuse s'avère incontournable. D'après les travaux précédents, un doute persiste sur l'existence d'un gradient de diffusion passive dans la moelle osseuse des os longs même si les expérimentations ont été effectuées sur modèle animal. La recherche d'un milieu de prélèvement potentiellement plus fiable tel que la pulpe dentaire est un enjeu non négligeable pour l'établissement du test de la diatomée. Pour cela nous avons besoin : de constituer un biotope riche en diatomées afin de procéder aux expérimentations et d'éliminer les sources de contaminations des échantillons pour une fiabilité augmentée des résultats.

La mise en place d'un milieu réservoir à diatomées s'est avéré être un succès. Les différents contrôles ont mis en évidence la survie d'un nombre important de diatomées dans l'aquarium, ce qui a permis d'étudier la diffusion passive des diatomées sur dents humaines directement en laboratoire. Cela n'aurait pas été possible en milieu naturel.

Afin de réduire au maximum les risques de pollution externe des échantillons, nous avons établi un protocole de décontamination des instrumentations utilisées pour le test de la diatomée. En testant différentes concentrations d'hydroxyde de sodium sur des échantillons riches en diatomées, nous avons démontré qu'un trempage intégral de l'instrumentation utilisée est nécessaire dans une solution concentrée à 2 moles par litre d'hydroxyde de sodium (soit 80 grammes pour 1 litre d'eau distillée) durant 14 jours. Il est donc impératif d'utiliser ce protocole de décontamination pour tout instrument susceptible d'être mis en contact avec les prélèvements effectués.

Nous avons de plus, mis au point un protocole pour l'extraction de la pulpe dentaire sur dents monoradiculées, malgré l'échec d'un premier protocole détruisant les échantillons de moelle osseuse de volaille et de dents de veau procurés afin de préciser la présence ou non d'une diffusion passive.

Ce protocole établi pourrait s'appliquer facilement pour extraire de la moelle osseuse pour de futures expérimentations.

Le succès de ces expérimentations repose sur l'établissement d'une méthodologie fiable et reproductible pour la constitution de futurs échantillons, complétant ainsi les expérimentations précédentes (1) sur l'étude de cette diffusion passive dans la moelle osseuse animale sur os intacts.

Les résultats de l'étude de la diffusion passive des diatomées sur des dents humaines et des premiers tests de la diatomée sur dents de noyés présumés restent

prometteurs bien que non significatifs. Ces résultats restent à confirmer notamment avec des échantillons plus importants.

De nombreux aspects restent à explorer notamment sur les méthodes de préparation des échantillons et de détection automatique des diatomées par microscopie électronique ou par méthode de PCR. L'étude comparative de la détection de diatomées dans la pulpe dentaire et dans les autres organes communément testés comme les poumons et la moelle osseuse est une piste intéressante à explorer, surtout pour des cas de corps en état de putréfaction avancée.

Table des illustrations

Figure 1: L'aquarium (Photo : Jane Gourgues)	16
Figure 2: Protocole NaOH (source : Jane Gourgues).....	23
Figure 3: Nombre de frustules observées en fonction du temps et de la concentration en NaOH.....	26
Figure 4: Instrumentation dans la solution à 2M/L de NaOH (photo : Jane Gourgues).....	29
Figure 5: Bacs de décontamination et de rinçage de l'instrumentation (photo : Jane Gourgues).....	30
Figure 6: Maxillaire de veau dans l'aquarium (photo : Jane Gourgues).....	30
Figure 7: Dents de veau et os de poulets utilisés pour l'immersion dans NaOH à 2M/L (photo : Jane Gourgues).....	31
Figure 8: Os de poulet et dents de veau immergés dans la solution à 2M/L de NaOH (photo : Jane Gourgues)	31
Figure 9: Os de poulet et dents de veau après 7 jours d'immersion dans la solution de NaOH à 2M/L (photo : Jane Gourgues).....	32
Figure 10: Protocole d'extraction de la pulpe de dents de noyés ou immergées (source : Jane Gourgues)	33
Figure 11: Dents immergées dans l'aquarium (photo : Jane Gourgues).....	34
Figure 12: Instrumentation utilisée pour les prélèvements, après trempage dans la solution de NaOH (photo : Jane Gourgues).....	34
Figure 13: Echantillon des pulpes issues des 7 dents immergées (photo : Jane Gourgues)	34
Figure 14: Dents de noyés après nettoyage de la surface (photo : Jane Gourgues).....	37
Figure 15: Les deux dents de noyés après section au disque de l'apex (photo : Jane Gourgues).....	37
Figure 16: Les deux dents de noyés après section de l'apex (photo : Jane Gourgues).....	37
Figure 17: Instruments endodontiques utilisés pour l'extraction de la pulpe, la partie travaillante sectionnée (photo : Jane Gourgues).....	37
Figure 18: Echantillon de pulpe issue d'une dent d'une victime de noyage supposée (photo : Jane Gourgues)	38
Tableau 1: Diatomées de l'aquarium. Les échantillons ont été observés à l'état frais, sans préparation optimale pour l'identification des frustules. (crédit photo Jane Gourgues)	18
Tableau 2: Résultats qualitatifs: effet de NaOH à 48h sur la structure silicieuse des diatomées (crédit photo Jane Gourgues).....	24
Tableau 3: Résultats quantitatifs obtenus après comptage systématique des lames	25
Tableau 4: Nombre de diatomées observées sur les lames à l'état frais des échantillons obtenus après prélèvement des pulpes de dents immergées dans l'aquarium (source Jane Gourgues)	35
Tableau 5: Nombre de diatomées observées sur les lames à l'état frais des échantillons obtenus après prélèvement des pulpes de dents de noyés (source : Jane Gourgues).....	39
Tableau 6: Résultats obtenus après digestion enzymatique des échantillons et fixation des lames à l'Eukitt® (source : Jane Gourgues).....	40

Bibliographie

1. Hourqueig É. Diatomées en médecine et odontologie légale: fiabilité et diffusion passive. 2015 Oct 5;62.
2. Seckbach J, Kociolek P, The Diatom World. Dordrecht: Springer Netherlands; 2011
3. Delly J. G, Gill S. An Introduction to the Microscopical Study of Diatoms. Modern Microscopy. 2013
4. Grandmaison G. L, Paraire F. Place de l'anatomie pathologique dans le diagnostic médico-légal d'une noyade. EM-Consulte. [cited 2016 Jun 14].
5. Zhu R, Xu G, Hu B, Shen R, Pan X, Zhou X. Applications for Drowning Identification by Planktonic Diatom Test on Rats in Forensic Medicine. Procedia Eng. 2011 Jan 1;18:417–21.
6. Di Giancamillo A, Giudici E, Andreola S, Porta D, Gibelli D, Domeneghini C, et al. Immersion of piglet carcasses in water--the applicability of microscopic analysis and limits of diatom testing on an animal model. Leg Med Tokyo Jpn. 2010 Jan;12(1):13–8.
7. Kumar M, Deshkar J, Naik SK, Yadav PK. Diatom Test-Past, Present and Future: A brief review. Indian J Res Rep Med Sci 2(3). 2012;
8. 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. Int J Legal Med. 1998;111(5):229–37.
9. Coelho S, Ramos P, Ribeiro C, Marques J, Santos A. Contribution to the determination of the place of death by drowning - A study of diatoms' biodiversity in Douro river estuary. J Forensic Leg Med. 2016 Jul;41:58–64.
10. Zimmerman KA, Wallace JR. The potential to determine a postmortem submersion interval based on algal/diatom diversity on decomposing mammalian carcasses in brackish ponds in Delaware. J Forensic Sci. 2008 Jul;53(4):935–41.
11. Silver PA, Wayne DL, MacCarthy DJ. Forensic Limnology: The Use of Freshwater Algal Community Ecology to Link Suspects to an Aquatic Crime Scene in Southern New England. Journal of Forensic Sciences. 1994;847.
12. Lunetta P, Miettinen A, Spilling K, Sajantila A. False-positive diatom test: a real challenge? A post-mortem study using standardized protocols. Leg Med Tokyo Jpn. 2013 Sep;15(5):229–34.

13. DiGiancamillo A, Domeneghini C, Gibelli D, Cattaneo C. Diatom extraction with HCl from animal tissues: a technical note. *Leg Med Tokyo Jpn.* 2011 Sep;13(5):268–71.
14. Wang H, Liu Y, Zhao J, Hu S, Wang Y, Liu C, et al. A simple digestion method with a Lefort aqua regia solution for diatom extraction. *J Forensic Sci.* 2015 Jan;60 Suppl 1:S227–30.
15. Ming M, Meng X, Wang E. Evaluation of four digestive methods for extracting diatoms. *Forensic Sci Int.* 2007 Jul 20;170(1):29–34.
16. Lin C-Y, Yen W-C, Hsieh H-M, Tsai L-C, Huang T-Y, Huang C-C, et al. Diatomological investigation in sphenoid sinus fluid and lung tissue from cases of suspected drowning. *Forensic Sci Int.* 2014 Nov;244:111–5.
17. Verma K. Role of Diatoms in the World of Forensic Science. *J Forensic Res.* 2013;04(02).
18. Krstic S, Duma A, Janevska B, Levkov Z, Nikolova K, Noveska M. Diatoms in forensic expertise of drowning--a Macedonian experience. *Forensic Sci Int.* 2002 Jul 17;127(3):198–203.
19. Ludes B, Coste M. *Diatomées et médecine légale.* Librairie Lavoisier. 1996
20. Pollanen MS, Cheung C, Chiasson DA. The diagnostic value of the diatom test for drowning, I. Utility: a retrospective analysis of 771 cases of drowning in Ontario, Canada. *J Forensic Sci.* 1997 Mar;42(2):281–5.
21. Rajvinder S, Rajinder S, Mukesh Kumar T. *Drowning Associated Diatoms.* 2005;
22. Yen LY, Jayaprakash PT. Prevalence of diatom frustules in non-vegetarian foodstuffs and its implications in interpreting identification of diatom frustules in drowning cases. *Forensic Sci Int.* 2007 Jul 20;170(1):1–7.
23. Piette MHA, De Letter EA. Drowning: still a difficult autopsy diagnosis. *Forensic Sci Int.* 2006 Nov 10;163(1-2):1–9.
24. Ago K, Hayashi T, Ago M, Ogata M. The number of diatoms recovered from the lungs and other organs in drowning deaths in bathwater. *Leg Med Tokyo Jpn.* 2011 Jul;13(4):186–90.
25. Ludes B, Quantin S, Coste M, Mangin P. Application of a simple enzymatic digestion method for diatom detection in the diagnosis of drowning in putrified corpses by diatom analysis. *Int J Legal Med.* 107(1):37–41.
26. 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. *Int J Legal Med.* 1999;112(3):163–6.

27. Hürlimann J, Feer P, Elber F, Niederberger K, Dirnhofer R, Wyler D. Diatom detection in the diagnosis of death by drowning. *Int J Legal Med.* 2000;114(1-2):6–14.
28. Takeichi T, Kitamura O. Detection of diatom in formalin-fixed tissue by proteinase K digestion. *Forensic Sci Int.* 2009 Sep 10;190(1-3):19–23.
29. Seo Y, Sato S, Kuroki K, Kishida T. A simple DNA coprecipitation method for the detection of diatoms in heart blood. *Forensic Sci Int.* 2013 Oct 10;232(1-3):154–9.
30. Hu S, Liu C, Wen J, Dai W, Wang S, Su H, et al. Detection of diatoms in water and tissues by combination of microwave digestion, vacuum filtration and scanning electron microscopy. *Forensic Sci Int.* 2013 Mar;226(1-3):e48–51.
31. Thakar MK, Singh R. Diatomological mapping of water bodies for the diagnosis of drowning cases. *J Forensic Leg Med.* 2010 Jan;17(1):18–25.

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 :

Odontologie légale

Diatomées et odontologie légale
Mise en place d'un protocole méthodologique pour l'étude
de la diffusion passive des diatomées au niveau des dents
au sein d'un milieu de culture

Résumé :

Introduction : Pour le diagnostic de la noyade, le test de la diatomée est encore controversé du fait d'une potentielle diffusion passive dans la moelle osseuse en cas de séjour prolongé en milieu aquatique. Nous voulons mettre en application le test de la diatomée sur la pulpe dentaire. **Matériel et Méthode :** Nous avons élaboré un milieu de culture pour diatomées et étudié l'effet de NaOH sur les diatomées afin de mettre au point un protocole de décontamination de l'instrumentation utilisée pour les prélèvements. Un protocole d'extraction de la pulpe dentaire a été mis en place. Nous avons étudié la diffusion passive des diatomées dans des dents extraites et avons appliqué le test de la diatomée sur dents de noyés. **Résultats :** Un trempage des instruments dans un bain de NaOH à 2 moles par litre durant 14 jours est nécessaire. Le protocole d'extraction a été appliqué sur 7 dents immergées dans l'aquarium et 2 dents de noyés. **Discussion :** Les résultats ne sont pas significatifs et ne permettent pas de démontrer la présence d'une diffusion passive dans la pulpe dentaire des dents immergées. La présence de diatomées dans la pulpe des dents de noyés est encourageante.

Mots clés : Médecine légale, Odontologie légale, Noyade/Diagnostic, Diatomées, Décontamination, Diffusion passive, Pulpe dentaire

Summary :

Introduction : For the diagnosis of drowning, the diatom test is still controversial due to the potential passive diffusion in the bone marrow in case of an extended stay in water. We want to carry out the diatom test on the dental pulp. **Materials and Methods :** We have worked out a culture environment for diatoms and studied the effect of NaOH on diatoms to develop an instrumentation decontamination protocol used for sampling. An extraction protocol of the pulp was set up. We studied the passive diffusion of diatoms in extracted teeth and have applied the diatom test on teeth of drowned people. **Results :** A soaking of instruments in a 2 moles per liter NaOH bath during 14 days is required. The extraction protocol was applied to 7 teeth submerged in the aquarium and 2 teeth from 2 drowned victims. **Discussion :** The results are not significant and do not demonstrate the presence of a passive diffusion in the dental pulp of immersed teeth. The presence of some diatoms in the pulp of teeth from drowned victims is promising.

Key-words : Forensics, Legal odontology, Drowning/Diagnosis, Diatoms, Decontamination, Passive diffusion, Dental pulp

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