



Diatomées et centrifugation : évaluation des résultats par acquisition scanner

Emma Lacaze Saint Jean

► To cite this version:

Emma Lacaze Saint Jean. Diatomées et centrifugation : évaluation des résultats par acquisition scanner. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02060370

HAL Id: dumas-02060370

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02060370>

Submitted on 7 Mar 2019

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.

U.F.R. D'ODONTOLOGIE

Année 2019

Thèse n°10

THESE POUR L'OBTENTION DU

**DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN CHIRURGIE
DENTAIRE**

Présentée et soutenue publiquement

Par LACAZE SAINT JEAN Emma

Née le 11 octobre 1993 à Pau

Le 21 février 2019

**DIATOMEES ET CENTRIFUGATION :
EVALUATION DES RESULTATS PAR ACQUISITION
SCANNER**

Sous la direction du : Docteur Christophe BOU

Membres du jury :

Mme le Professeur Véronique DUPUIS
M. le Docteur Christophe BOU
Mme le Docteur Cécile BADET
M. le Docteur Cédric FALLA

Président
Directeur
Rapporteur
Examineur

UNIVERSITE DE BORDEAUX

MAJ 01/11/2018

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	58-01
Directeur Adjoint à la Pédagogie	Mr DELBOS Yves	56-01
Directeur Adjoint – Chargé de la Recherche	M. FRICAIN Jean-Christophe	57-01
Directeur Adjoint – Chargé des Relations Internationales	M. LASSERRE Jean-François	58-01

ENSEIGNANTS DE L'UFR

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mme	Caroline	BERTRAND	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Marie-José	BOILEAU	Orthopédie dento-faciale	56-01
M	Sylvain	CATROS	Chirurgie orale	57-01
M	Raphaël	DEVILLARD	Odontologie restauratrice et endodontie	58-01
Mme	Véronique	DUPUIS	Prothèse dentaire	58-01
M.	Bruno	ELLA NGUEMA	Sciences anatomiques et physiologiques - Biomatériaux	58-01
M.	Jean-Christophe	FRICAIN	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-01

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme	Elise	ARRIVÉ	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mme	Cécile	BADET	Sciences biologiques	57-01
M.	Etienne	BARDINET	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Michel	BARTALA	Prothèse dentaire	58-01
M.	Cédric	BAZERT	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Christophe	BOU	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mme	Sylvie	BRUNET	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-01
M.	Jacques	COLAT PARROS	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
M,	Jean-Christophe	COUTANT	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
M.	François	DARQUE	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	François	DE BRONDEAU	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Yves	DELBOS	Odontologie pédiatrique	56-01
M,	Emmanuel	D'INCAU	Prothèse dentaire	58-01
M.	Dominique	GILLET	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	Jean-François	LASSERRE	Prothèse dentaire	58-01
M.	Yves	LAUVERJAT	Parodontologie	57-01
Mme	Odile	LAVIOLE	Prothèse dentaire	58-01
M.	Jean-Marie	MARTEAU	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-01
Mme	Javotte	NANCY	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Adrien	NAVEAU	Prothèse dentaire	58-01
M.	Jean-François	PELI	Odontologie restauratrice – Endodontie	58-01
M.	Philippe	POISSON	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02

M.	Patrick	ROUAS	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Johan	SAMOT	Biologie Orale	57-01
Mme	Maud	SAMPEUR	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Cyril	SEDARAT	Parodontologie	57-01
Mme	Noémie	THEBAUD	Sciences biologiques	57-01
M.	Eric	VACHEY	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01

AUTRES ENSEIGNANTS

Mme	Audrey	AUSSEL	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
Mme	Elsa	GAROT	Odontologie pédiatrique	56-01

ASSISTANTS

Mme	Mathilde	BOUDEAU	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	Wallid	BOUJEMAA AZZI	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Mlle	Camille	BOULÉ-MONTPEZAT	Odontologie pédiatrique	56-01
Mlle	Anaïs	CAVARE	Orthopédie dento-faciale	56-01
M	Hubert	CHAUVEAU	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M,	Jean-Baptiste	CULOT	Fonctions/dysfonctions, imagerie, biomatériaux	58-01
M	Pierre-Hadrien	DECAUP	Fonctions/dysfonctions, imagerie, biomatériaux	58-01
Mme	Severine	DESCAZEUX	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	Cédric	FALLA	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mme	Mathilde	FENELON	Chirurgie Orale	57-01
Mme	Agathe	GREMARE	Biologie orale	57-01
M	Mickaël	HYVERNAUD	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Clémence	JAECK	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Olivia	KEROUREDAN	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Mme	Claudine	KHOURY	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
M	Adrien	LASTRADE	Prothèse dentaire	58-01
M.	Emmanuel	MASSON REGNAULT	Chirurgie Orale	57-01
Mme	Marie	MÉDIO	Orthopédie dento-faciale	56-01
Mme	Aude	MENARD	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Meryem	MESFIOUI	Parodontologie	57-01
Mme	Chloé	PELOURDE	Orthopédie dento-faciale	56-01
M	Antoine	POPELUT	Parodontologie	57-01
M	Florian	PILEU	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Noëlla	RAJONSON	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mr	Thibaut	ROULLAND	Prothèse dentaire	58-01
M.	François	ROUZÉ L'ALZIT	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Rawen	SMIRANI	Orthopédie dento-faciale	56-01
Mme	Sophia	ZIANE	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01

Remerciements

A notre Présidente de thèse

Madame le Professeur Véronique DUPUIS

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Sous-section Prothèse 58-02

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 56-02

Je vous adresse mes chaleureux remerciements pour m'avoir fait découvrir le monde passionnant des diatomées. Je vous remercie pour votre enthousiasme, votre bonne humeur et votre dynamisme tout au long de nos expérimentations. Un grand merci également pour ces années de clinique à Saint André.

A notre Rapporteur de thèse

Madame le Docteur Marie-Cécile BADET

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Sous-section Sciences Biologiques 57-01

Je vous remercie du temps que vous avez accordé à la lecture et à la correction de mon travail. Votre aide et votre bonne humeur ont toujours contribué à l'agréable ambiance de l'hôpital Saint André. Soyez assurée de ma profonde gratitude.

A notre Assesseur

Monsieur le Docteur Cédric FALLA

Assistant Hospitalo-Universitaire

Sous-section Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale 56-02

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de faire partie de ce jury, ainsi que pour votre enseignement de qualité au cours de ma formation. Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Remerciements personnels

A mes parents, mon frère, ma sœur, ma famille, pour votre amour, votre patience, vos conseils, votre éducation, pour avoir toujours cru en moi, je vous remercie du fond du cœur,

A Martin, pour ton amour,

Aux CS, pour nos souvenirs d'enfance, notre amitié à toute épreuve, votre affection, votre soutien, et votre exemple qui m'a amenée jusque-là,

A mes Népalaises, pour toutes ces joyeuses années de fac, pour notre complicité nos fous rires et notre amitié,

A Séléna, Sonia, Diane, et Marie-Line, pour avoir illuminé toutes ces journées d'hôpital et bien plus encore,

A tous les autres dentaires et aux soirées mémorables que l'on a pu partager,

Au Dr Iragne et au Dr Ninnin pour m'avoir transmis le goût de cet art,

A Emile et à Jane pour tout le travail accompli en amont.

Table des matières

Introduction	9
1. Les diatomées et la médecine légale.....	11
1.1. Généralités sur les diatomées	11
1.1.1 Le frustule	11
1.1.2 Cytologie	12
1.1.3 La reproduction des diatomées	12
1.1.4 Champs d'application	12
1.2. Utilisation des diatomées en médecine légale	13
1.2.1 La mort par noyade	13
1.2.2 Intérêt du test de la diatomée	14
1.2.3 Limites du test de la diatomée.....	14
2. Traitement chimique de l'échantillon.....	16
2.1. Problématique	16
2.2. Objectifs	16
2.3. Méthodologie.....	17
2.3.1 Protocole appliqué à la solution T.....	17
2.3.2 Protocole appliqué à la solution J	17
2.4. Résultats	18
2.4.1 Solution T	18
2.4.2 Solution J	19
2.5. Conclusion	19
3. Centrifugation des diatomées	20
3.1. Problématique	20
3.2. Objectifs	20
3.3. Méthodologie.....	20
3.3.1 Protocole de centrifugation pour la solution T.....	20
3.3.2 Protocole de centrifugation pour la solution J	23
3.3.3 Coloration des solutions	24
3.3.4 Détermination volume goutte.....	24
3.3.5 Préparation des lames	25

4. Scanner microscopique	27
4.1. Problématique	27
4.2. Objectifs	27
4.3. Méthode de comptage des diatomées.....	28
5. Etude des lames.....	29
5.1. Effet de la centrifugation sur les tubes issus de la solution T	29
5.1.1 Comportement des diatomées en fonction du temps de centrifugation.....	31
5.1.2 Comportement des diatomées en fonction de la vitesse.....	32
5.2. Effet de la centrifugation sur les tubes issus de la solution T '	35
5.3. Effet de la centrifugation sur les tubes issus de la solution J	37
6. Discussion.....	38
6.1. Digestion des tissus et coloration des frustules	38
6.2. Apport de la centrifugation.....	38
6.2.1 Première centrifugation	38
6.2.2 Deuxième centrifugation.....	39
6.3. Performance du scanner optique.....	39
6.4. Perspectives et études à réaliser.....	40
7. Conclusion	41
Table des illustrations.....	42
Bibliographie	43

Introduction

En termes de statistiques, la noyade représente la quatrième cause des décès dus aux accidents de la vie courante en France.

La découverte d'un corps immergé dans un milieu aquatique peut induire deux hypothèses sur la cause médicale de décès, soit il s'agit d'une noyade vraie, soit il s'agit d'un dépôt en milieu aquatique d'un décès antérieur. A cet égard les circonstances exactes du décès sont recherchées. Le diagnostic positif de la mort par noyade est l'un des plus difficiles à établir car il s'appuie sur des critères cliniques difficilement identifiables après une immersion prolongée dans de l'eau.

Le diagnostic de noyade se fait essentiellement après les constatations cliniques lors de l'acte autopsique, à l'aide du test de la diatomée.

Les diatomées sont des micro-organismes eucaryotes présents dans la majorité des milieux aquatiques. Lors d'une noyade, l'eau chargée en diatomées pénètre les voies respiratoires pour ensuite, au niveau des capillaires, infiltrer la circulation sanguine. Le cœur, encore en activité durant quelques minutes, propulse le sang contenant les diatomées dans les organes, les tissus vascularisés jusqu'à atteindre la moelle osseuse.

Lors de l'autopsie, un prélèvement de tissus va permettre la recherche de diatomées, et donc établir le diagnostic de noyade.

Bien que reconnu comme indispensable en médecine légale, ce test présente aujourd'hui encore de nombreux biais et difficultés d'application.

En premier lieu, lors du prélèvement de la moelle, aucune contamination de diatomées extérieures ne doit avoir lieu. Ce critère, impératif pour la fiabilité du test, s'avère d'autant plus complexe en raison de la présence de diatomées sur l'ensemble des tissus cutanés et vêtements du noyé, mais aussi celles contenues dans l'eau servant à rincer le corps.

A l'issue de cette analyse, les résultats obtenus suite à la contamination pourraient induire un risque de diagnostic positif erroné de noyade lié en partie à la présence de faux positifs.

En second lieu, suite au prélèvement des tissus humains et après traitement chimique, la recherche des diatomées sur des lames histologiques se révèle délicate et chronophage. Les diatomées présentes et non identifiées créent de faux négatifs.

L'objectif de notre travail consiste à rechercher des méthodes afin d'améliorer la fiabilité et la pertinence de ce test dans l'identification et le comptage des diatomées.

Dans un premier temps, ces diatomées étant incluses dans les divers tissus humains ou aquatiques prélevés, différents traitements chimiques sont appliqués afin de procéder à un nettoyage initial des tissus organiques et minéraux présents. Ainsi une meilleure observation des diatomées, en essayant de préserver leur enveloppe siliceuse sera recherchée.

Dans un second temps, les divers articles retrouvés dans la littérature sont assez partagés sur l'utilisation ou non de la centrifugation comme outil complémentaire pour isoler les diatomées. Afin de tester la pertinence de la centrifugation, les solutions contenant des diatomées sont centrifugées à différentes vitesses et durées afin d'évaluer le nombre et l'intégrité physique des diatomées obtenues.

Dans une dernière partie, afin de favoriser le comptage et l'identification des diatomées entières ou fragmentées sur les lames histologiques, l'utilisation d'un outil d'acquisition numérique permettant de scanner les lames est évalué.

Ce système permet une lecture facilitée des diatomées et un système de comptage des lames ainsi numérisées est jaugé permettant finalement de valider ou non la pertinence de la centrifugation dans le test des diatomées en médecine et odontologie légale.

1. Les diatomées et la médecine légale

1.1. Généralités sur les diatomées ¹⁻³

Les diatomées sont des algues jaunes et brunes vivant dans l'eau, soit en suspension, soit sur le fond, libres ou fixées à des supports divers.

Dans les mers froides, voire tempérées, elles constituent l'essentiel du plancton végétal et ont une grande importance écologique.

Ce sont des organismes microscopiques unicellulaires dont la taille varie entre deux micromètres et un millimètre.

Leur particularité réside dans le fait que la cellule possède une enveloppe externe, transparente et rigide, appelée le frustule. Cette enveloppe est constituée de silice faiblement cristallisée, semblable à du verre, et associée à des composants organiques.

Selon la forme du frustule deux types de diatomées coexistent. Chez les diatomées centrales, le frustule a la forme d'un cylindre plat, avec une symétrie radiale. Chez les diatomées pennées ou pennales, le frustule est allongé et possède généralement une symétrie bilatérale.

1.1.1 Le frustule

Fondamentalement, le frustule se présente comme une boîte, il comporte deux parties, le couvercle et le fond, s'emboîtant l'une dans l'autre. On parle alors d'épithèque pour le couvercle et d'hypothèque pour le fond. (Figure 1)

Chaque partie ou thèque se compose elle-même de deux éléments. L'un appelé valve correspond au fond du couvercle et est plus ou moins bombé. L'autre paroi verticale entourant la valve, le manteau, fait la liaison avec la seconde thèque.

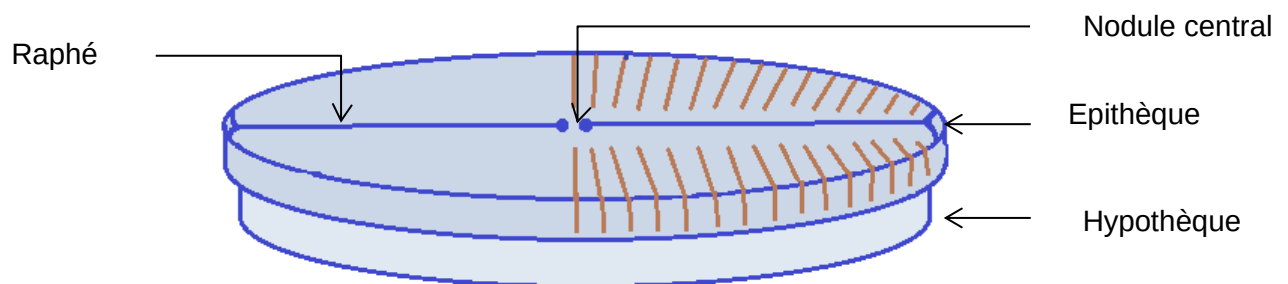


Figure 1 Structure d'un frustule d'une diatomée (source E. Lacaze)

Chez de nombreuses diatomées pennales les valves peuvent être parcourues par une fente étroite plus ou moins longue, le raphé. Il permet une communication avec le milieu extérieur. Cette fente est interrompue en son milieu par un épaississement siliceux, le nodule central.

Les valves peuvent porter des ornements extrêmement fines. Chez les diatomées pennales, les ornements des valves sont souvent disposés comme les dents d'un peigne, tandis que chez les centrales, ils sont souvent radiaux.

Apparaissant au microscope optique comme des stries ou des perles, ces ornements sont en réalité de fines perforations dont le diamètre est de l'ordre du micromètre. Ces orifices permettent des échanges entre la cellule et le milieu extérieur.

1.1.2 Cytologie

Les diatomées, comme les autres algues et plantes, sont dites autotrophes (du grec signifiant « qui se nourrit soi-même »). Grâce à la chlorophylle contenue dans les chloroplastes elles utilisent l'énergie de la lumière pour produire de la matière organique tout en créant de l'oxygène.

Chez quelques rares espèces, incapables de réaliser la photosynthèse, ou vivants dans des milieux sans lumière, l'hétérotrophie est obligatoire. Les diatomées utilisent alors des matières organiques assimilables.

Comme toute cellule, une membrane plasmique enveloppe le cytoplasme. Ce dernier contient un noyau, des chloroplastes, mitochondries, un réticulum endoplasmique, un appareil de golgi et des vacuoles.

1.1.3 La reproduction des diatomées

Lorsque les conditions sont favorables à leur prolifération, les diatomées se multiplient par bipartition, c'est-à-dire que chaque cellule se divise pour donner deux cellules identiques. Chaque cellule fille garde une des deux thèques de la cellule mère comme épithèque, et sécrète une nouvelle hypothèque.

L'ancienne hypothèque de la cellule mère devenue à présent une épithèque, la cellule fille ainsi créée est alors plus petite que la cellule mère. Ce fait a pour conséquence la diminution progressive de la taille au fil des générations. Lorsqu'une taille minimale est atteinte, la reproduction sexuée intervient alors entre deux diatomées.

Une diatomée devient un gamète femelle tandis qu'une autre devient un gamète male, puis ces deux gamètes fusionnent. L'œuf résultant de la fusion des gamètes grossit puis sécrète un frustule, c'est-à-dire une nouvelle diatomée de grande taille.

1.1.4 Champs d'application

Le frustule siliceux étant imputrescible, leur accumulation lors de périodes géologiques a conduit à la formation de gisements de roches appelées diatomites, constituées à plus de 80% par des frustules. Les diatomites à porosité élevée sont

utilisées comme abrasif dans l'industrie, mais aussi pour le raffinage du sucre ou la filtration du vin.

Les diatomées sont utilisées également comme indicateur de la qualité des eaux, car elles sont sensibles aux variations physiques et chimiques.

Les cultures de diatomées constituent des sources de nourriture pour les larves de poissons ou pour les invertébrés tels que les moules, huîtres, etc.

Certaines espèces de diatomées produisent des molécules intéressantes employées à la fabrication d'antibiotiques et de substances anti-tumorales.

1.2. Utilisation des diatomées en médecine légale

1.2.1 La mort par noyade¹⁻⁴

La noyade est définie comme une mort par asphyxie résultant de l'inhalation d'un liquide dans les voies respiratoires. Le liquide inonde rapidement les poumons, entraîne une destruction des parois alvéolaires et pénètre ainsi dans la circulation sanguine.

On parle de noyade vraie qui est à différencier de la noyade sèche ou de la noyade par hydrocution. Cette dernière appelée aussi noyade-inhibition résulte d'une syncope vagale en général dans l'eau froide. Dans ce cas, il n'y a pas ou très peu de pénétration hydrique dans les voies respiratoires.

La noyade sèche, peu fréquente, se caractérise par une contraction soudaine du larynx empêchant la pénétration du liquide dans les voies aériennes.

Lorsqu'un corps est retrouvé dans un milieu aquatique il appartient au médecin légiste de rechercher la cause du décès. Il détermine ainsi s'il y a eu noyade ou immersion du corps après le décès. Ce diagnostic de mort par noyade est un l'un des plus difficiles en médecine légale.

Lors de l'autopsie des examens histochimiques et anatomo-pathologiques sont réalisés. Les signes macroscopiques les plus caractéristiques d'une immersion sont la présence d'une collection de mousse autour des orifices nasaux et buccal, et la turgescence des poumons. Ceux-ci sont volumineux et portent l'empreinte des côtes.

Lors de l'examen interne les médecins légistes constatent également que la muqueuse qui tapisse les bronches est rouge et congestive. L'estomac et les intestins contiennent de l'eau et des éléments du lieu de noyade (sable, algue, etc.).⁵

Les autres organes possèdent aussi les stigmates d'un corps immergé dans l'eau mais aucun de tous ces critères n'est spécifique à la noyade.⁶

De plus toutes ces caractéristiques disparaissent rapidement avec la putréfaction du corps qui survient très rapidement en milieu aquatique.

1.2.2 Intérêt du test de la diatomée

Au cours de la noyade, l'asphyxie provoque la perte de connaissance du sujet. Ses poumons se remplissent d'eau, qui sous l'effet de la pression, traverse la paroi pulmonaire pour s'infiltrer dans la circulation sanguine.

Or à ce stade, et durant encore quelques minutes, le cœur ne cesse pas de battre. Ainsi sous l'impulsion de cette activité cardiaque, le sang et l'eau sont propulsés dans les organes comme le cerveau, le foie, les reins mais aussi dans la moelle osseuse.⁷

Les diatomées se retrouvent ainsi dans cette moelle osseuse, elle-même emprisonnée au sein d'un os constitué d'une corticale osseuse très dense.

La présence de ces diatomées dans ce tissu si difficile d'accès est d'autant plus importante qu'il existe, sur les autres tissus, un phénomène de diffusion passive.

En effet après quelques jours passés dans l'eau une progression des diatomées est observée au niveau de tissus mous tels que le foie les reins ou le cœur⁸⁻¹⁰. La présence de diatomées au sein de ces tissus ne peut donc pas suffire pour conclure qu'il s'agit d'un décès par noyade.¹¹ La moelle osseuse constitue, elle, un tissu protégé de cette pénétration passive grâce à sa corticale.

La présence de diatomée au sein de la moelle osseuse fémorale est donc fréquemment recherchée pour poser le diagnostic de noyade.

Une comparaison entre les espèces de diatomées retrouvées dans l'échantillon et les espèces présentes sur le lieu de découverte du corps, peut donner des indices sur le lieu réel de la noyade.

Le test des diatomées est actuellement considéré comme le «gold standard» pour le diagnostic de noyade, bien que la littérature récente ait souligné sa relative fiabilité et les fréquents problèmes de contamination.⁸

1.2.3 Limites du test de la diatomée

Le test de la diatomée repose sur le principe que, chez un sujet sain, aucune diatomée ne peut être retrouvée au sein de son organisme. Or cela n'est pas applicable chez les personnes en contact avec un environnement riche en diatomée (pêcheurs, personnes travaillant dans les carrières de diatomites) ou consommant fréquemment des produits de la mer.^{10,12}

De plus, lors de l'autopsie, la technique de prélèvement des organes peut être à l'origine de contamination. Les diatomées présentes à la surface du corps, sur les gants ou sur les instruments utilisés peuvent se retrouver au sein de l'échantillon.^{6,13} Selon les travaux du Dr Gourgues, 14 jours de trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2 moles par litre sont nécessaires afin d'éliminer les éventuelles diatomées déjà présentes sur les instruments.¹⁴

Selon le Dr Hourqueig, les prélèvements de moelle doivent être effectués à distance des trous nourriciers qui constituent une porte d'entrée au passage des

diatomées. Selon la même logique les os fracturés, fissurés ou endommagés doivent être exclus.

Une fois le tissu prélevé, l'échantillon doit être traité afin d'éliminer le tissu organique pour obtenir une meilleure visibilité lors de la recherche des diatomées. On utilise pour cela de l'acide, des enzymes, des filtres ou du solvène 350.²

L'addition de ces solvants augmente le volume de l'échantillon, ce qui rend plus complexe la recherche de diatomées.

Lors du décès par hydrocution ou par noyade sèche, aucune diatomée n'est retrouvée dans la moelle osseuse du fait de l'absence d'inhalation d'eau dans les poumons. Le risque est donc de conclure par un décès antérieur à l'immersion.

Tous ces facteurs sont à l'origine de biais qui diminuent la fiabilité du test de la diatomée.

2. Traitement chimique de l'échantillon

2.1. Problématique

Lors de l'autopsie, un échantillon de moelle est prélevé en respectant le protocole nécessaire pour éviter la contamination. Ce tissu est ensuite traité afin de dissoudre la matière organique. Lors de cette digestion, le frustule siliceux de la diatomée doit résister afin de pouvoir être ensuite observé.²

Tous les auteurs s'accordent sur la nécessité du test de la diatomée, cependant il n'existe pas de protocole standard concernant la préparation de l'échantillon. Chaque laboratoire ou chaque étude impose son propre protocole de digestion des tissus et des débris organiques.

L'acide sulfurique est utilisée dans plusieurs études, seul ou couplé à du peroxyde d'hydrogène, ou encore à de l'acide chlorhydrique.^{7,10,15,16}

L'acide nitrique, lui, est employé par Pollanen sur la moelle osseuse, mais aussi par plusieurs auteurs qui y ajoutent eux aussi du peroxyde d'hydrogène ou de l'acide chlorhydrique.^{5,17-20}

En 1994, Ludes et Al. comparent la digestion des tissus avec de l'acide nitrique et avec la protéinase K. Ils en arrivent à la conclusion que pour la même efficacité, la technique enzymatique semble la plus pratique en terme de sécurité et d'impact sur l'environnement.²¹ Elle aurait également l'avantage de ne pas endommager les diatomées.²² Cependant cette protéinase K demande un temps de digestion très long.

Le solvène-350 doit quant à lui être utilisé avec précaution sur les diatomées d'eau de mer, plus fragiles que les diatomées d'eau douce.²³

En 2011, après plusieurs essais comparatifs, DiGiancamillo conclut que la technique la plus appropriée consiste en l'utilisation combinée de peroxyde d'hydrogène et d'acide chlorhydrique. Celle utilisant de l'acide sulfurique étant trop agressive et celle utilisant des enzymes trop longue et coûteuse.²⁴

2.2. Objectifs

Dans cette première phase expérimentale, l'objectif est de définir un protocole pour éliminer les impuretés et résidus organiques tout en préservant l'intégrité des diatomées. La solution libérée des débris pourra ainsi être analysée au microscope optique.

Nous avons choisi de comparer deux méthodes, l'une combinant l'utilisation d'acide chlorhydrique et de peroxyde d'hydrogène chauffé, et l'autre utilisant seulement de l'hypochlorite de sodium.

2.3. Méthodologie

Dans un cours d'eau près de Saint Martin de Touch dans la banlieue Ouest de Toulouse, de l'eau est prélevée après agitation de mousse et de cailloux.

Au laboratoire d'odontologie, l'eau est répartie dans deux flacons : un flacon T et un flacon J.

Les premières étapes sont communes aux deux flacons. Puis les traitements divergent, dans le flacon T est ajouté de l'acide chlorhydrique et de l'eau oxygénée chauffée. Dans le flacon J, seul de l'hypochlorite de sodium est ajouté.

Le matériel de laboratoire utilisé est : béchers, pipettes graduées et ballon de décantation.

2.3.1 Protocole appliqué à la solution T

- 1L d'eau est prélevé dans la rivière.
- L'eau est laissée durant plusieurs heures dans un **ballon à décanter**.
La vase, phase la plus lourde, est retirée et servira pour une analyse parallèle.
La solution restante est répartie dans 4 béchers de 250 mL pour une question pratique.
- Les béchers sont à nouveaux laissés au **repos** pendant 24h.
- Pour chaque bécher, 125 mL de surnageant est retiré à l'aide d'une pipette graduée.
- 50 mL d'**acide chlorhydrique à 26%** est ajouté dans les 4 béchers.
- Repos 36h
- Ajout d'eau distillée pour l'obtention d'un pH neutre, et répétition à 4 reprises de ces **lavages**.
Les 4 béchers sont réunis dans un seul contenant.
- Le surnageant est retiré et on obtient un concentré de 100mL.
- 35 mL d'**eau oxygénée** est ajouté.
- La solution est chauffée au **bain marie** durant 4h.

2.3.2 Protocole appliqué à la solution J

- 1 L d'eau est prélevé dans la rivière.
- L'eau est laissée durant plusieurs heures dans un **ballon à décanter**.
La vase, phase la plus lourde, est retirée.
La solution restante est répartie dans 4 béchers de 250 ml.
- **Repos** pendant 24h
- Pour chaque bécher, 125 mL de **surnageant** est retiré à l'aide d'une pipette graduée.
- 25 mL d'**hypochlorite de sodium à 9.5%** est ajouté.

2.4. Résultats

2.4.1 Solution T

La solution T est observée à l'état frais. Les résidus restants sont infimes, les diatomées sont parfaitement bien visibles. Elles ne sont plus vivantes, seul le frustule perdure. (Figure 2)

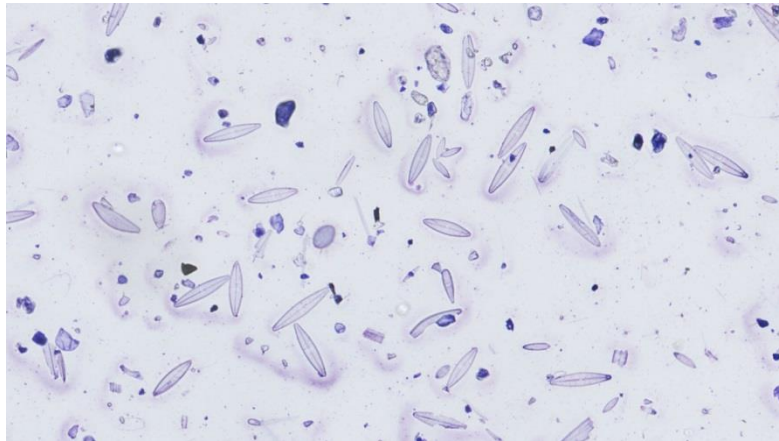


Figure 2 : Photo d'une lame de la solution T (source : BIC à Bordeaux, numérisation au Nanozoomer)

Etude de la vase récoltée :

Les sédiments collectés à l'aide du ballon à décanter vont subir un traitement particulier. A cet échantillon est ajouté de l'eau oxygénée, puis l'ensemble est chauffé pendant 4h. Il s'agit là du même protocole que pour la solution T mais sans l'ajout d'acide chlorhydrique. Ce traitement est préconisé par Ludes et Costes.²⁵

Suite à l'observation à l'état frais au microscope, on constate que les diatomées sont bien visibles et pour la plupart intactes et non ouvertes. En revanche un nombre très important de résidus gêne l'observation.

Ce protocole n'est donc pas concluant. L'ajout seul d'eau oxygénée chauffée n'est pas satisfaisant ou du moins pas sur un échantillon aussi chargé en résidus.

2.4.2 Solution J

A l'état frais on note la présence de diatomées vides, seul le frustule est présent. Celui-ci est néanmoins très difficilement observable du fait de l'abondance des débris organiques. (Figure 3)

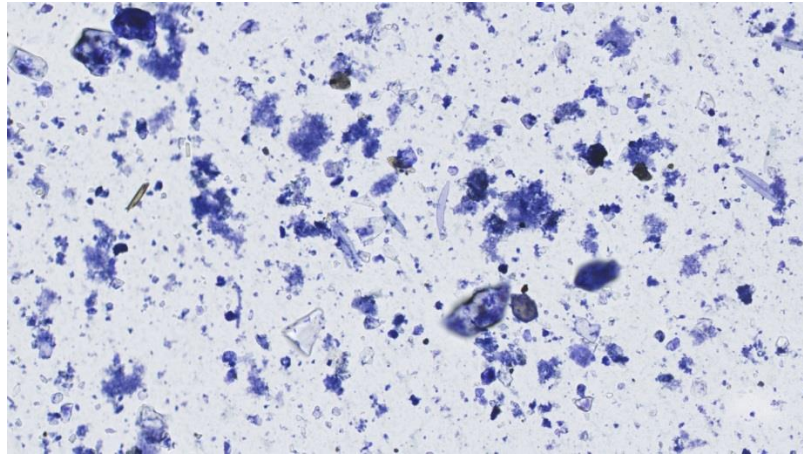


Figure 3 : Photo d'une lame de la solution J (source : BIC à Bordeaux, numérisation au Nanozoomer)

2.5. Conclusion

Deux protocoles ont été testés afin d'éliminer les débris organiques et permettre l'observation des diatomées.

L'utilisation d'acide chlorhydrique et d'eau oxygénée chauffée produit les résultats escomptés, les diatomées sont intactes et parfaitement visibles. Les débris organiques sont éliminés rendant l'observation idéale.

En revanche l'utilisation de l'hypochlorite de sodium se révèle moins performante.

3. Centrifugation des diatomées

3.1. Problématique

Comme évoqué dans la partie précédente, plusieurs auteurs ont mené des études comparatives sur les différentes méthodes utilisées lors des traitements chimiques afin de trouver le protocole le plus adapté.

De même, si la majorité des études utilisent la centrifugation aucune n'a, à ce jour, analysé l'influence de la vitesse et de la durée sur les diatomées.

3.2. Objectifs

Dans les différentes études sur les diatomées, les auteurs utilisent la centrifugation à des vitesses allant de 1500 à 4000 tours/min durant 10 à 25min.^{7,10,15–21,25–28} La vitesse la plus fréquemment employée est entre 2000 et 3000 tours/min pendant 15 à 20 minutes.

Notre étude expérimentale a pour objectif premier de déterminer la vitesse et la durée minimum de centrifugation nécessaires pour séparer les diatomées des résidus organiques non désirés.

Il est également impératif de déterminer si la centrifugation peut être à l'origine de fragmentation des diatomées, et si oui, à partir de quelles vitesses et durée. Ces paramètres sont alors examinés afin de déceler le juste milieu idéal entre séparation et conservation de l'intégrité du frustule.

Des vitesses allant jusqu'à 4000 tours/min sont utilisées. Cependant avec la centrifugeuse disponible au laboratoire, cette vitesse maximale ne peut être testée du fait du risque de fracture des tubes. Notre centrifugation la plus élevée se limite donc à 2000 tours/min.

Ces tests sur la vitesse et le temps vont être appliqués aux deux solutions préparées précédemment.

3.3. Méthodologie

3.3.1 Protocole de centrifugation pour la solution T

La solution T est agitée précautionneusement, puis 10 mL de son contenu est prélevé et versé dans 40 tubes. Un tube témoin, non centrifugé, sera conservé.

A chaque centrifugation deux tubes sont placés dans l'appareil avec une durée et une vitesse choisie. (Tableau 1)

A la fin de celle-ci, les surnageants des deux tubes sont placés dans une fiole appelée "s". Le culot d'un des tubes, nommé à présent le tube T, est conservé et on y ajoute de l'eau bidistillée.

Le second tube est lui centrifugé une deuxième fois. Puis son surnageant est placé dans une fiole appelé “ s’ ” tandis que le culot reste dans le tube, nommé T’, auquel on ajoute de l’eau bidistillée. (Figure 4 et 5)

Tours/min	500	1000	1500	2000
30'	T1 / T1'	T2 / T2'	T3 / T3'	T4 / T4'
2 min	T5 / T5'	T6 / T6'	T7 / T7'	T8 / T8'
5 min	T9 / T9'	T10 / T10'	T11 / T11'	T12 / T12'
10 min	T13 / T13'	T14 / T14'	T15 / T15'	T16 / T16'
20 min	T17 / T17'	T18 / T18'	T19 / T19'	T20 / T20'

Tableau 1 : Numérotation des tubes en fonction de la vitesse et du temps appliqués lors de la centrifugation (source : E. Lacaze)

Protocole centrifugation

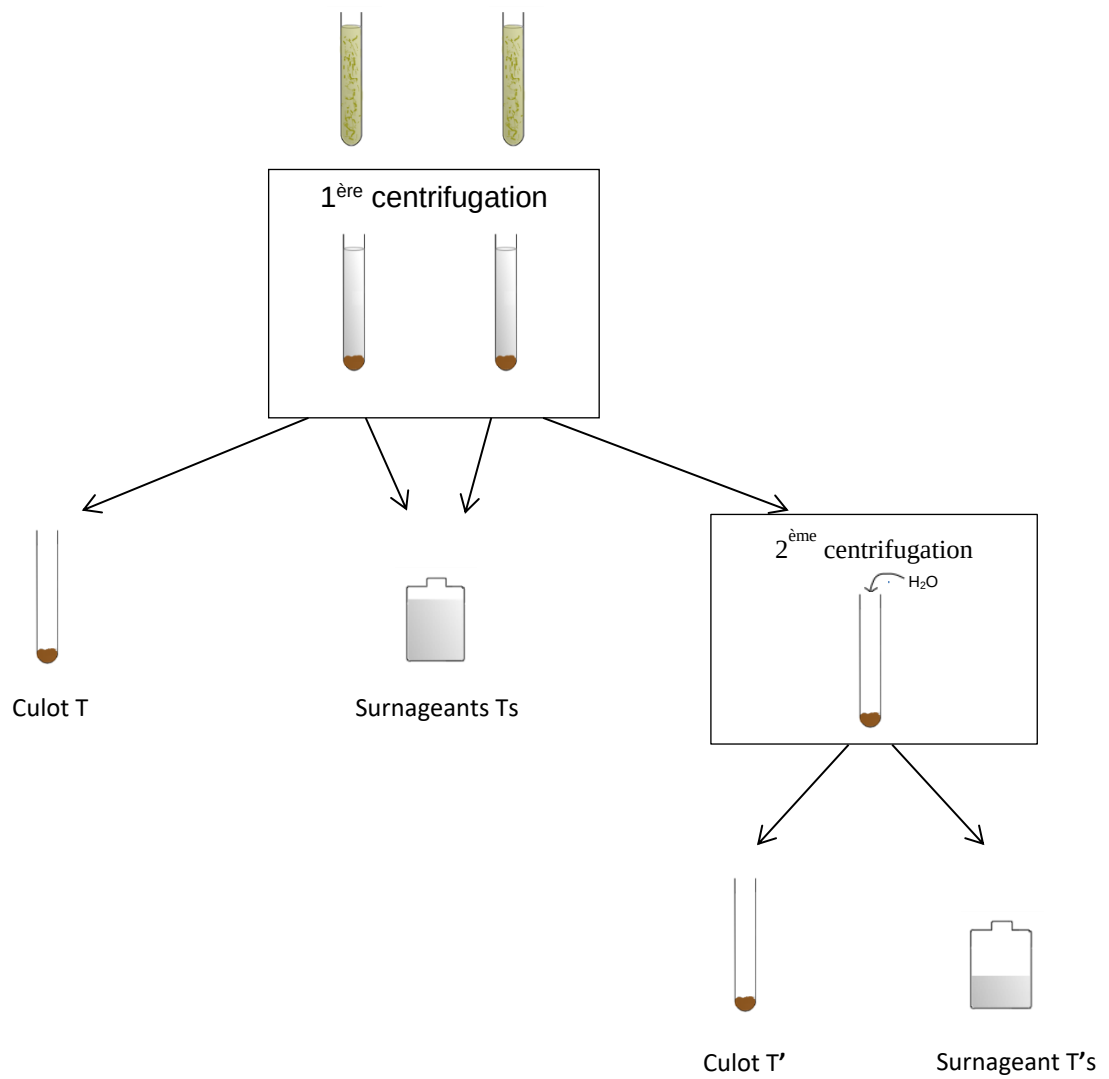


Figure 4 : Protocole de centrifugation appliqué aux tubes T (source : E. Lacaze)



Figure 5 : Centrifugeuse du laboratoire d'odontologie et tubes utilisés pour centrifugation et le stockage (source : Emma Lacaze)

3.3.2 Protocole de centrifugation pour la solution J

Dans la centrifugeuse est placé un tube J, solution traitée à l'hypochlorite de sodium. Après la centrifugation, le surnageant est placé dans une fiole appelée Js. De l'eau distillée est ajoutée au culot.

Tours/min	500	1000	1500	2000
30'	J1	J2	J3	J4
2 min	J5	J6	J7	J8
5 min	J9	J10	J11	J12
10 min	J13	J14	J15	J16
20 min	J17	J18	J19	J20

Tableau 2 : Numérotation des tubes en fonction de la vitesse et du temps appliqués lors de la centrifugation (source : E. Lacaze)

3.3.3 Coloration des solutions

Une fois les centrifugations réalisées, l'observation à l'état frais révèle une identification complexe, non à cause d'éventuels résidus, mais par la couleur très claire des diatomées. Afin d'optimiser leur reconnaissance une coloration s'annonce alors nécessaire.

Les colorants utilisés doivent être basiques afin de se fixer sur le frustule. Lors de nos expérimentations trois colorants sont alors testés : le bleu de méthylène, la safranine et hématoxyline alunée (hemalun). (Figure 6)

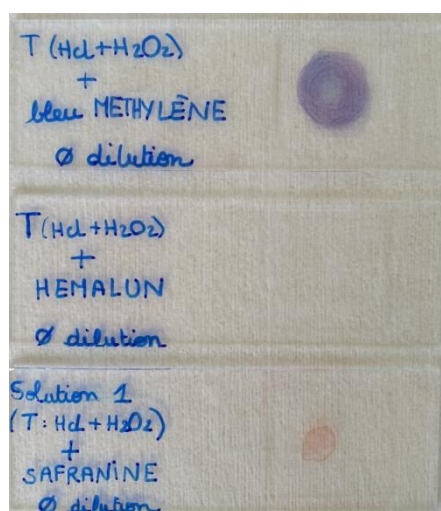


Figure 6 : Coloration de la solution à l'aide de trois colorants (source : E. Lacaze)

La safranine présente des résultats peu concluants : les diatomées prennent une teinte rosée, mais celles-ci restent difficilement identifiables.

L'hématoxyline alunée les colore de façon un peu plus soutenue.

Le colorant le plus adapté se révèle être le bleu de méthylène. En effet les diatomées prennent une couleur bleutée, permettant un contraste et donc, une meilleure visibilité. La solution du bleu de méthylène rend également le liquide plus hydrophile. Ainsi une goutte de solution colorée détient une plus grande mouillabilité et s'étale davantage sur la lame. Les diatomées sont donc moins concentrées et plus facilement identifiables.

3.3.4 Détermination volume goutte

Afin d'obtenir des lames comparables, le même volume de solution a été déposé sur chaque lame. Scientifiquement une goutte correspond à un volume de 50 μ L. Or une goutte de ce volume, une fois colorée avec le bleu de méthylène présente un étalement extrêmement grand. Cela peut ainsi augmenter les biais lors de l'analyse des lames et fausser les résultats.

Une goutte réduite semble plus adaptée. Grâce à un prélève-goutte deux tailles sont alors testées : 12 μL et 24 μL . Cette dernière paraissant encore trop grande, nous avons choisi de régler le prélève-goutte sur 12 μL .

3.3.5 Préparation des lames

L'instrumentation nécessaire à la préparation des lames est sélectionnée :

- Lames
- Lamelles
- Eukitt : solution à base de résine acrylique et xylène permettant la fixation rapide de la goutte entre la lame et la lamelle
- Prélève-goutte et micropipette
- Plaque chauffante et banc thermique. (Figure 7)



Figure 7: Plaque chauffante, Eukitt et prélève-goutte (source : E. Lacaze)

Pour chaque tube T ou J une goutte de 12 μL est prélevé et apposé sur 3 lames selon le protocole suivant :

- Dépose d'une goutte sur une lamelle en l'étalant au maximum
- Séchage de la lamelle sur le banc thermique
- Une goutte d'Eukitt est placée sur une lame
- La lamelle est renversée sur la goutte d'Eukitt

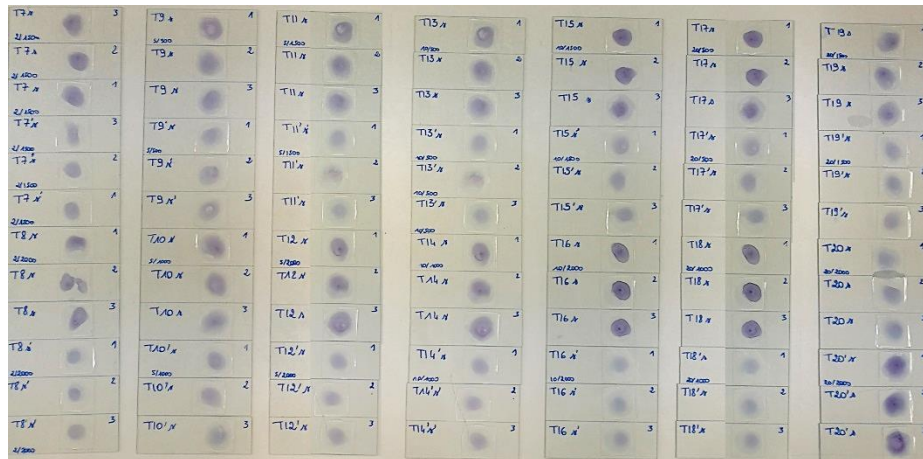


Figure 8 : Lames fixées contenant une goutte colorée au bleu de méthylène issues des tubes T (source : E. Lacaze)

Nous obtenons un ensemble de lames colorées, sur lesquelles les diatomées devront être comptabilisées afin d'étudier l'influence des vitesses et temps de centrifugation. (Figure 8)

4. Scanner microscopique

4.1. Problématique

Afin de poser le diagnostic de noyade, les médecins légistes recherchent la présence de diatomées au sein de la moelle osseuse. L'échantillon prélevé est analysé sur une lame de verre à l'aide de microscopes optiques. Cette longue et difficile recherche, peut aboutir à de faux négatifs si les diatomées présentes dans l'échantillon ne sont pas identifiées. De ce fait le diagnostic de noyade sera, à tort, écarté des scénarios possibles.

Un grand nombre d'automates permettent aujourd'hui de scanner des lames de verre afin d'obtenir une reproduction numérisée en une seule image à forte densité en pixel. La lecture se fait alors sur l'écran d'un ordinateur via un logiciel de visionnage qui reproduit les fonctions d'un microscope. La numérisation donne accès à des images d'une grande netteté qui peuvent être ensuite enregistrées et conservées.

Ces outils sont utilisés en médecine pour des études d'immunomarquage, la numérisation se fait alors en lumière blanche ou en fluorescence.²⁹

Le Bordeaux Imaging Center, BIC, est un institut bordelais offrant un grand nombre de microscopes et mettant à disposition un Nanozoomer de chez HAMAMATSU, un des appareils les plus performants pour scanner une lame. (Figure 9)

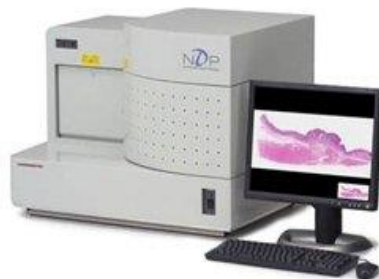


Figure 9 : Scanner microscopique Nanozoomer (source : HAMAMATSU)

4.2. Objectifs

Scanner une lame, puis l'observer sur un écran, permettrait un comptage facilité des diatomées. Pour cela l'image scannée obtenue doit être d'une excellente qualité et d'un grossissement suffisamment important. Les diatomées doivent également se situer sur le même plan afin qu'elles puissent apparaître toutes aussi nettes les unes que les autres.

Le premier objectif consiste à étudier si l'ensemble de ces critères est respecté et conclure sur l'apport que peut avoir un outil comme le Nanozoomer lors du test de la diatomée.

Le deuxième objectif de cette approche consiste à exploiter les lames réalisées lors des précédentes expérimentations. Ces lames issues de la centrifugation sont ainsi analysées sur un écran et profitent d'un comptage fiable.

4.3. Méthode de comptage des diatomées

- Plus d'une vingtaine de lames en verre issues de la précédente étude sur la centrifugation sont scannées au Bordeaux Imaging Center.
- Présentes par milliers sur l'intégralité de la lame, les diatomées sont comptées pour une zone délimitée d'une surface de 8 mm² avec un grossissement x15.
- Lors de la constitution de la lame, la goutte s'était étalée entraînant les diatomées de façon inhomogène d'un côté ou de l'autre. Les diatomées se concentrent donc au centre et se font plus rare sur les bords. Deux techniques sont étudiées sur trois lames différentes afin de déterminer la forme de la surface choisie.

La première consiste à dessiner virtuellement deux rectangles radiaux à partir du centre de la goutte, puis à compter les diatomées retrouvées dans les rectangles. D'après les résultats observés sur les trois lames, une forte différence apparaît entre les deux rectangles.

En revanche les diatomées comptabilisées sur un cercle semblent réparties de façon homogène et représentative de chaque lame. Cette technique s'avère alors la plus pertinente et est finalement retenue.

- Le cercle est dessiné et positionné non pas au centre de la lame de verre mais au centre de la goutte. Les diatomées paraissent ainsi tourner autour de ce point. (Figure 10)
- Un quadrillage est mis en place afin de faciliter le comptage et ne délaissier aucune zone. (Figure 10)
- Toutes les diatomées présentes dans le cercle sont comptabilisées et réparties en deux catégories : les diatomées dont le frustule est intact, et les diatomées endommagées.

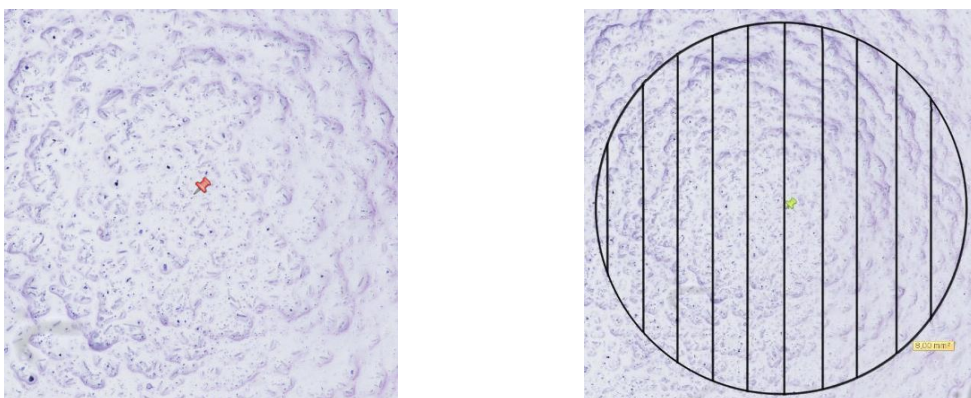


Figure 10 : Détermination du centre de la goutte et mise en place d'un cercle quadrillé (source : BIC à Bordeaux, numérisation au Nanozoomer)

5. Etude des lames

5.1. Effet de la centrifugation sur les tubes issus de la solution T

L'utilisation du scanner optique représentant un coût important, toutes les lames ne peuvent pas être étudiées. Aussi nous avons choisi les lames issues des échantillons T1, T4, T6, T9, T12, T15, T17, T20 afin d'être scannées. La quantité et l'intégrité physique des diatomées sont étudiées successivement en fonction du temps et de la vitesse. (Tableaux 3 et 4)

Nom lame	Vitesse (tr/mn)	Temps (s)	Nombre de diatomées au total	Nombre de diatomées entières	Nombre de diatomées fracturées	% de diatomées entières
T1	500	30	1243	1059	184	85
T4	2000	30	1222	956	266	78
T6	1000	120	1385	998	387	72
T9	500	300	1554	1213	341	78
T12	2000	300	884	639	245	72
T15	1500	600	3082	1536	1546	50
T17	500	1200	2474	1302	1172	53
T20	2000	1200	1586	1157	429	73

Tableau 3 : Résultats obtenus après comptage de la zone délimitée pour chaque lame issue du culot

Nom lame	Vitesse (tr/mn)	Temps (s)	Nombre de diatomées au total	Nombre de diatomées entières	Nombre de diatomées fracturées
T1s	500	30	1166	684	482
T4s	2000	30	1160	652	508
T6s	1000	120	198	86	112
T9s	500	300	288	78	210
T12s	2000	300	148	59	89
T15s	1500	600	118	46	72
T17s	500	1200	48	16	32
T20s	2000	1200	69	36	33

Tableau 4: Résultats obtenus après comptage de la zone délimitée pour chaque lame issue du surnageant

- Relation entre le nombre de diatomées collectées au sein du culot et du surnageant associé :

L'étude de la variation du nombre de diatomées au sein du culot et du surnageant peut révéler l'existence ou non d'une corrélation, preuve de l'efficacité de la centrifugation dans la collecte des diatomées.

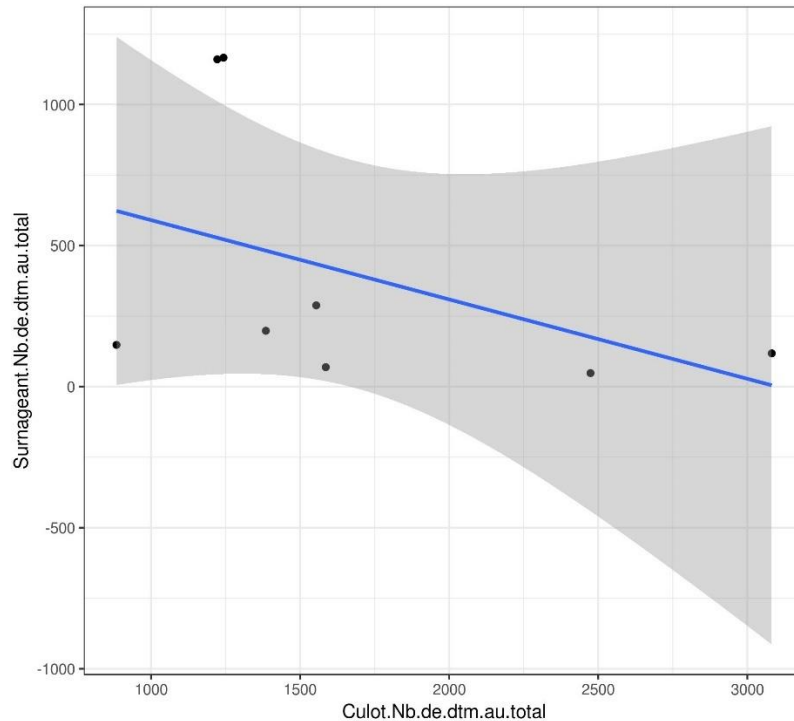


Figure 11 : Evolution du nombre de diatomées présentes dans le culot en fonction du nombre de diatomées présentes dans le surnageant

L'élaboration du graphique ci-dessus met en évidence une tendance visible par la ligne bleue : lorsque le nombre de diatomée au sein du culot augmente, la quantité au sein du surnageant diminue. La centrifugation permet donc réellement une collecte des diatomées au sein du culot. (Figure 11)

5.1.1 Comportement des diatomées en fonction du temps de centrifugation

- Quantité de diatomées dans le culot :

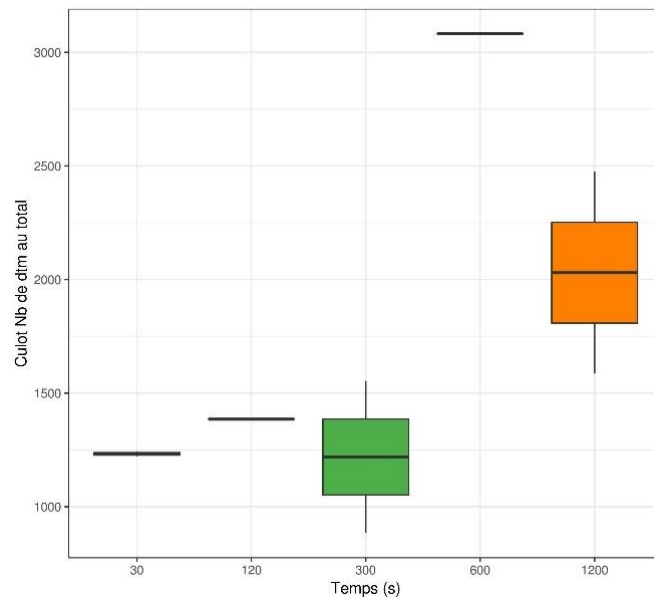


Figure 12 : Nombre de diatomées comptabilisées dans le culot en fonction du temps

Le nombre de diatomées présentes dans le culot augmente avec la durée de centrifugation, mais de façon non régulière puisque pour 600 secondes le nombre de diatomées comptabilisée est doublé pour finalement diminuer à nouveau. (Figure 12)

- Quantité de diatomées dans le surnageant :

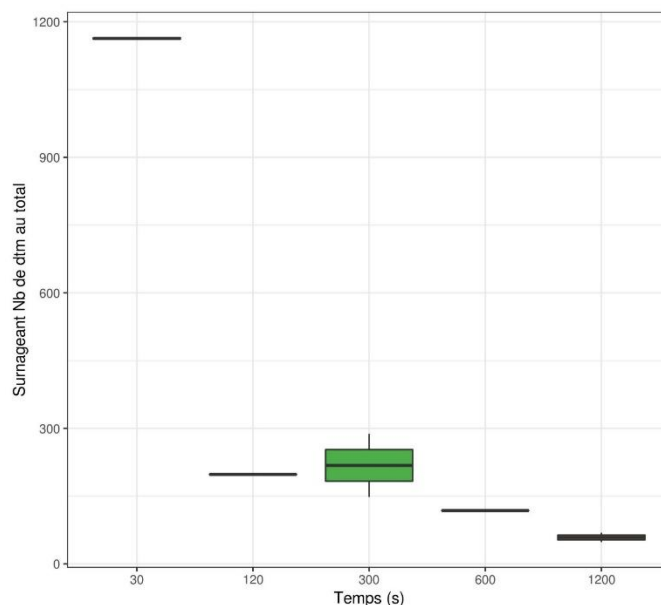


Figure 13: Nombre de diatomées comptabilisées dans le surnageant en fonction du temps

Au sein du surnageant le nombre de diatomées chute dès 120 secondes, soit au bout de 2 minutes de centrifugation. (Figure 13)

- Détérioration des diatomées du culot en fonction du temps :

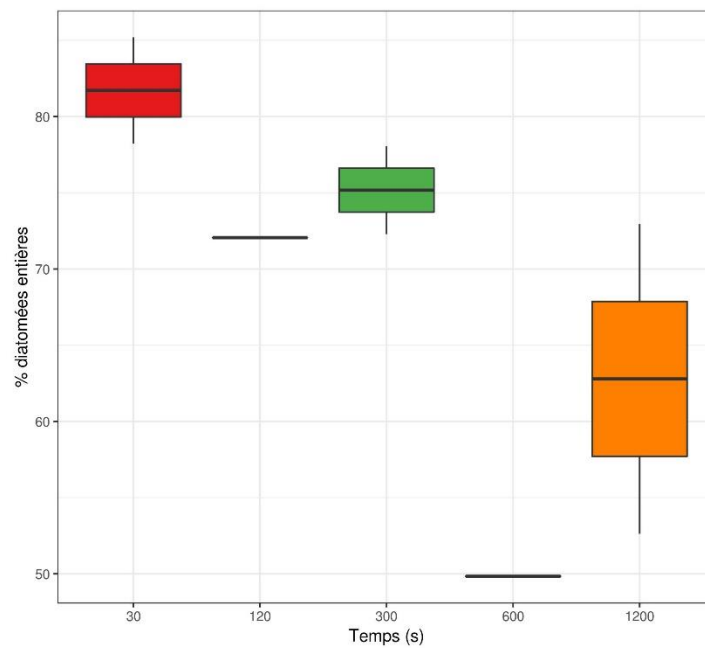


Figure 14 : Proportion de diatomées entières comptabilisées dans le culot en fonction du temps

Le pourcentage de diatomées entières régresse, notamment pour un temps de 600 secondes de centrifugation. Ainsi en augmentant la durée de la centrifugation, l'intégrité physique des frustules se détériore. (Figure 14)

5.1.2 Comportement des diatomées en fonction de la vitesse

- Quantité de diatomées dans le culot :

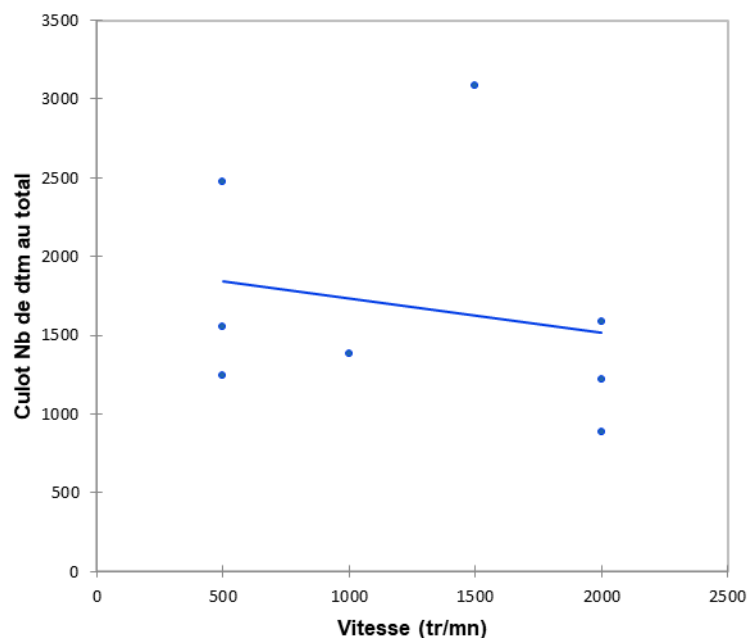


Figure 15 : Nombre de diatomées comptabilisées dans le culot en fonction de la vitesse

Pour une même vitesse de centrifugation, que ce soit à 500 tours/min comme à 2000 tours/min, le nombre de diatomées collectées peut être très différent. D'une manière générale le nombre de diatomées diminue peu en fonction de la vitesse. (Figure 15)

- Quantité de diatomées dans le surnageant :

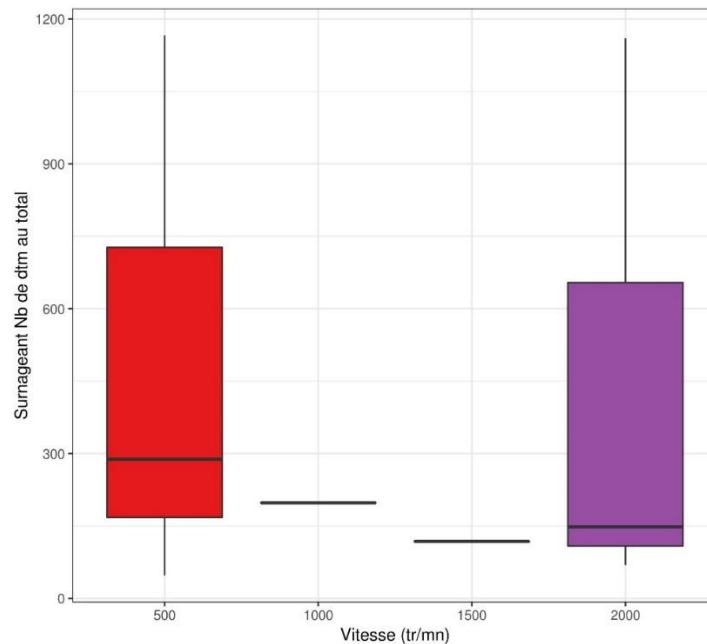


Figure 16 : Nombre de diatomées comptabilisées dans le surnageant en fonction de la vitesse

D'après le graphique ci-dessus, le nombre de diatomées comptabilisées dans le surnageant ne présente pas de tendance spécifique. Deux résultats se démarquent cependant, ils correspondent aux tubes T1s et T4s respectivement centrifugés à 500 et 2000 tours/min mais pendant seulement 30 secondes les deux. (Figure 16)

La vitesse ne semble donc pas, à elle seule, être un paramètre permettant d'expliquer une baisse du nombre de diatomées au sein du surnageant.

- Détérioration des diatomées du culot en fonction de la vitesse :

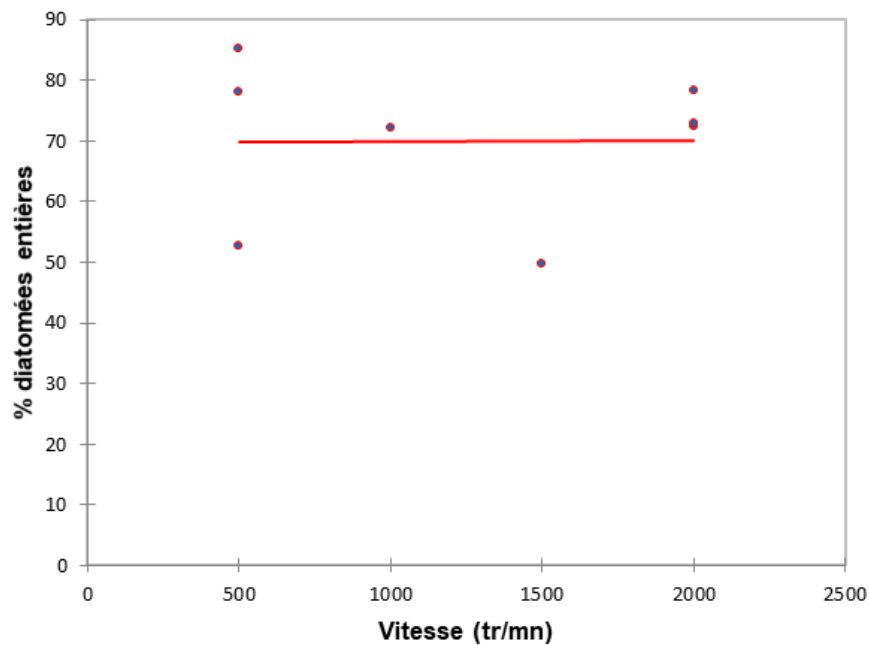


Figure 17 : Proportion de diatomées entières comptabilisées dans le culot en fonction de la vitesse

La ligne rouge du graphique ci-dessus, ne révèle pas de tendance particulière, malgré un pourcentage de diatomées entières qui chute à 1000 et 1500 tours/min. Pour ses valeurs, on retrouve donc, un pourcentage de diatomées fracturés plus élevés.

Puis à 2000 tours/min, les diatomées entières semblent à nouveau très majoritaires. (Figure 17)

Or nous avons vu que le nombre total de diatomées était justement en baisse pour cette vitesse. Les diatomées sont donc moins nombreuses en quantité et celles présentes sont moins endommagées.

Il est donc possible d'émettre l'hypothèse suivante : au fur et à mesure que la vitesse augmente, les diatomées se fracturent jusqu'à un certain point où les fragments deviennent si petits qu'ils ne sont plus identifiables.

5.2. Effet de la centrifugation sur les tubes issus de la solution T '

Les lames T1s, T9s, et T20s proviennent des surnageants d'une première centrifugation. Les culots de ces échantillons sont centrifugés une deuxième fois. Leurs surnageants T1s', T9s', et T20s' sont l'objet d'une analyse pour mettre en évidence la pertinence de cette deuxième centrifugation. (Tableau 5)

Nom lame	Vitesse (tr/mn)	Temps (s)	Nombre de diatomées au total	% diatomées entières
T1s	500	30	1166	59
T1s'	500	30	814	27
T9s	500	300	288	52
T9s'	500	300	832	63
T20s	2000	1200	69	26
T20s'	2000	1200	240	46

Tableau 5 : Résultats obtenus après comptage des lames 1, 9 et 20 issues des surnageants d'une première centrifugation Ts ou d'une deuxième centrifugation Ts'

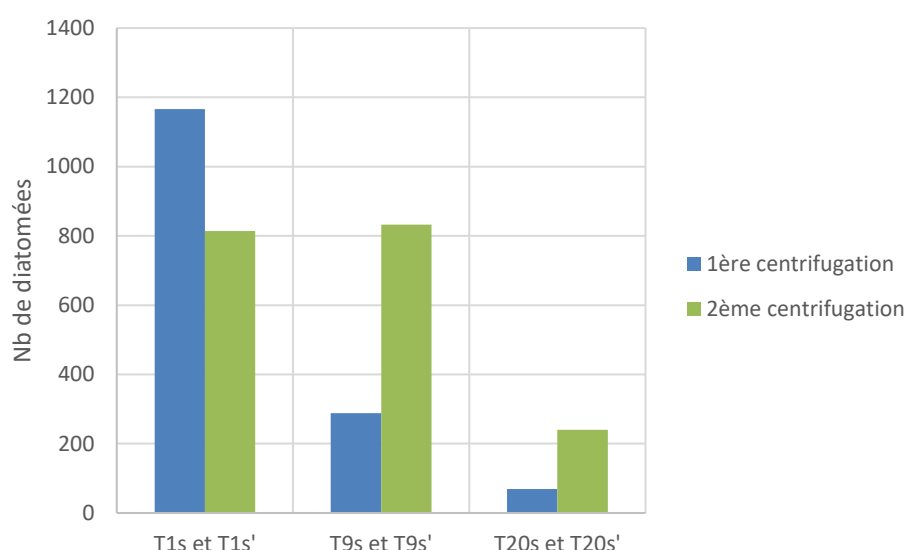


Figure 18 : Nombre de diatomées comptabilisées dans les surnageants d'une première et d'une deuxième centrifugation

Le comptage de diatomées révèle que leur quantité ne diminue pas suite à la deuxième centrifugation, exceptée pour les lames 1. (Figure 18) La deuxième centrifugation n'apporte pas d'intérêt à une collecte plus exhaustive des diatomées.

Cependant il est important de noter que cette analyse repose sur seulement trois échantillons. De plus l'objectif étant de collecter le maximum de diatomées, il aurait été préférable que le surnageant subisse cette deuxième centrifugation, et non le culot, afin que les diatomées encore présentes à la surface soient finalement concentrées.

La deuxième centrifugation n'engendre pas de fracture supplémentaire des frustules. La proportion de diatomée entières est semblablement identique dans la première ou la deuxième centrifugation, même pour une vitesse et durée importante comme pour T20s'. (Figure 19)

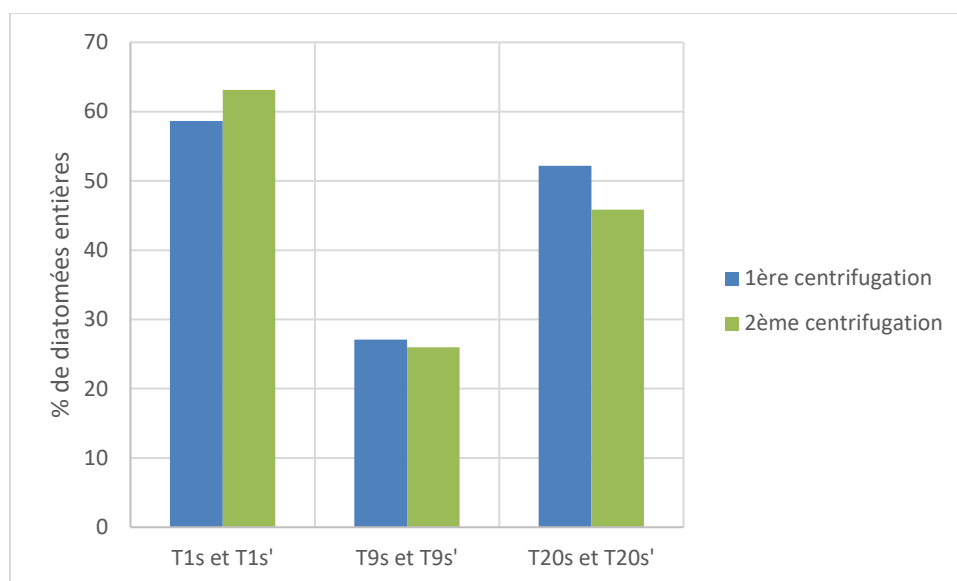


Figure 19 : Proportion de diatomées entières comptabilisées dans le surnageant d'une première puis deuxième centrifugation

5.3. Effet de la centrifugation sur les tubes issus de la solution J

Nom lame	Vitesse (tr/mn)	Temps (s)	Nombre de diatomées au total	Nombre de diatomées entières	% de diatomées entières
J1	500	30	154	72	47
J9	500	300	62	20	32
J15	1500	600	94	34	36
J17	500	1200	290	140	48
J20	2000	1200	62	10	16

Tableau 6 : Résultats obtenus après comptage au sein du culot des solutions J

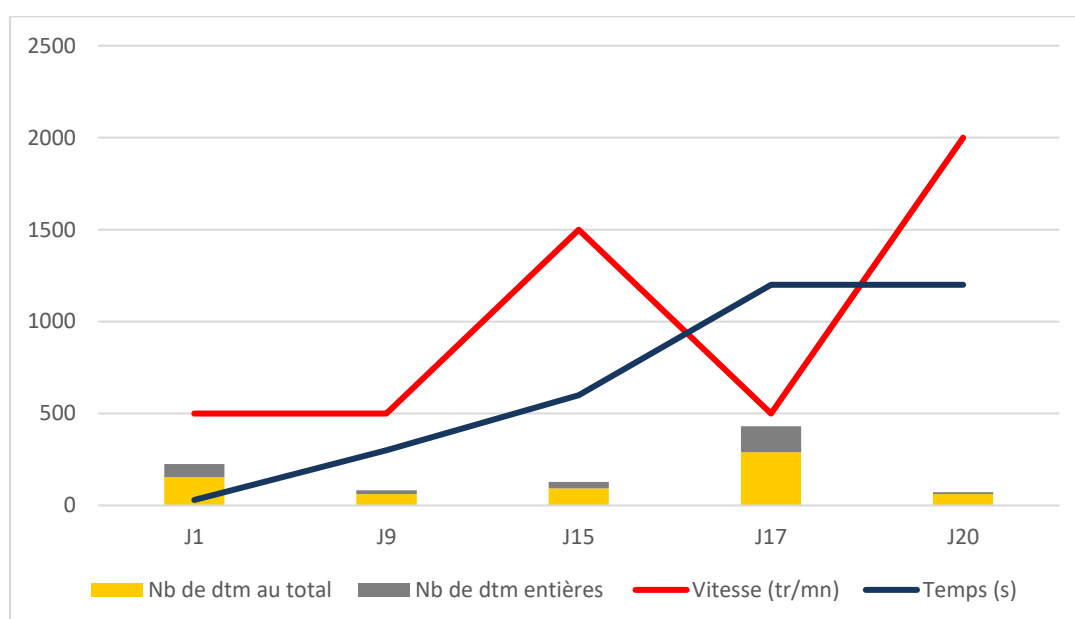


Figure 20 : Evolution du nombre de diatomées et de diatomées entières dans le culot, associée à la vitesse et au temps de centrifugation

L'observation des lames issues des tubes J a démontré une trop forte densité de débris empêchant la bonne observation.

Il est néanmoins possible d'observer que pour une durée de centrifugation de 1200 sec, le nombre de diatomées au sein du culot est nettement inférieur lorsque les vitesses dépassent les 500 tours/min. Ainsi pour la même durée, une centrifugation à 500 tours/min (J17) collecte plus de diatomées qu'à 2000 tours/min (J20).

De plus la proportion de diatomées entières diminue fortement : 16% pour J20 au lieu de 36 et 48% pour J15 et J17. (Tableau 6 et Figure 20)

Sur la lame J20 les diatomées sont donc plus fracturées et leur plus faible nombre peut s'expliquer par une détérioration des frustules si importante que ceux-ci ne sont plus identifiables.

6. Discussion

Notre objectif de départ était de rechercher des protocoles afin d'améliorer certaines étapes du test de la diatomée : digestion des débris, collecte des diatomées et leur mise en évidence. Nos expérimentations nous ont permis de répondre en partie à ces objectifs.

6.1. Digestion des tissus et coloration des frustules

La méthode de digestion que nous avons utilisée repose sur l'utilisation d'acide chlorhydrique et d'eau oxygénée chauffée. Nous avons obtenu une solution libérée des résidus organiques, les impuretés restantes ne gênant pas la correcte observation. Bien que les diatomées ne soient plus vivantes, leurs frustules sont préservés et une identification est possible.

En revanche la digestion des débris à l'aide d'hypochlorite de sodium s'est révélée être inefficace. L'abondance de ces impuretés gênant entièrement l'observation des diatomées. De plus, fragilisés par l'hypochlorite de sodium, les frustules ne résistent pas à la centrifugation et se fracturent en petits morceaux non identifiables.

Après avoir expérimenté la safranine et l'hémalun, le bleu de méthylène s'avère être le colorant permettant une meilleure visibilité et détection des diatomées.

Il est à noter que nos expérimentations ont été réalisées sur de l'eau de rivière dont les composants organiques sont différents de ceux issus des tissus humains, prélevés lors de l'autopsie.

6.2. Apport de la centrifugation

6.2.1 Première centrifugation

Nous avons pu pour la première fois tester la pertinence de la centrifugation sur les diatomées.

Une centrifugation de 10 minutes, semble avoir la plus grande efficacité sur le culot et une centrifugation de 2 minutes se révèle être suffisante sur le surnageant. Mais c'est également à partir de ces 10 minutes que le nombre de diatomées fracturées augmente.

Une durée de 5 minutes semble être le juste milieu entre efficacité et préservation du frustule.

La vitesse n'influe pas sur la collecte des diatomées au sein du culot, celle-ci étant aussi efficace à 500 tours/min qu'à 2000 tours/min. De plus les diatomées endommagées sont aussi nombreuses à faible ou forte vitesse.

La vitesse n'est donc pas un critère fondamental, une centrifugation à 500 tours/min se révèle être suffisante.

A partir des résultats obtenus, il nous est permis de recommander l'utilisation de la centrifugation à 500 tours/min durant 5 minutes.

Néanmoins le faible nombre de lames scannées et la petite superficie de comptage doivent nous faire relativiser l'exactitude de ces recommandations.

De plus on constate des résultats surprenants pour la lame T20, correspondant à une centrifugation de 2000 tours/min pendant 20 minutes. En effet après avoir eu une concentration de diatomées de plus en plus grande pour les précédentes valeurs, le nombre de diatomée récoltées cette fois dans le culot diminue.

Deux explications sont possibles :

- Une centrifugation trop forte qui fracture les diatomées en éléments si petits qu'ils ne sont pas identifiables,
- Une erreur de manipulation lors du prélèvement de la solution T20. En effet une trop faible agitation préalable ou un prélèvement trop en surface peuvent être à l'origine de cette anomalie.

6.2.2 Deuxième centrifugation

La deuxième centrifugation ne fracture pas d'avantage les frustules mais elle ne permet pas non plus une meilleure collecte des diatomées au sein du culot. Lors de prochaines expérimentations, le surnageant devrait être centrifugé une deuxième fois à la place du culot.

6.3. Performance du scanner optique

La numérisation des lames présente de multiples avantages :

- L'identification des diatomées grâce à une numérisation d'une grande qualité.
- L'élaboration d'un quadrillage permettant de délimiter des zones et faciliter le comptage.
- Le pointage numérique d'une diatomée identifiée, permettant de la retrouver ultérieurement.
- L'enregistrement numérique permettant la conservation à long terme de la lame.
- La possibilité de travailler en réseau et de partager les images.

Néanmoins il est important de noter que l'identification des diatomées n'est possible qu'en l'absence de débris et avec une coloration suffisante de leurs frustules.

6.4. Perspectives et études à réaliser

La méthode de digestion semble adaptée mais il serait intéressant d'analyser si une concentration plus faible en acide chlorhydrique ou en eau oxygénée fragiliserait moins le frustule des diatomées, tout en éliminant suffisamment les débris.

D'après nos expérimentations, une centrifugation à 500 tours/min durant 5 minutes semble idéale. Un comptage de la totalité des lames permettrait une étude plus fine permettant de confirmer ou d'infirmer ces vitesses et temps de centrifugation.

D'autre part, en médecine légale le nombre de diatomées présent dans l'échantillon étant minime, il est important que toutes les diatomées soient collectées au niveau du culot. Il faut donc impérativement centrifuger à nouveau le surnageant et plusieurs fois si nécessaire sans dégrader le frustule.

Le scanner optique permet une identification nette des diatomées et un comptage sur écran facilité. Cependant les échantillons en médecine légale étant très nombreux, la recherche des diatomées peut s'avérer fastidieuse, source d'erreurs.

Ainsi il serait avantageux d'utiliser un logiciel utilisant la reconnaissance automatisée des diatomées afin de réaliser un comptage exhaustif des celles-ci. Mais cette utilisation nécessite d'améliorer la coloration des frustules afin que le contraste avec le fond soit suffisamment important pour la détection du logiciel. Ainsi après coloration, de nombreuses phases de lavages seront nécessaires.

7. Conclusion

Le test de la diatomée est utilisé en médecine légale dans des cas complexes afin de poser le diagnostic de mort par noyade. A cet égard, de la moelle osseuse est prélevée afin d'y rechercher des diatomées.

Les techniques utilisées au laboratoire ont une importance capitale dans la garantie des résultats obtenus. L'objet de ce travail a consisté à améliorer la qualité d'un échantillon dans lequel les diatomées sont recherchées.

Nous avons établi un protocole de traitement chimique afin d'éliminer les débris organiques présents dans l'échantillon. L'utilisation d'acide chlorhydrique et d'eau oxygénée chauffée a su démontrer son efficacité dans la suppression des impuretés tout en conservant l'intégrité physique des diatomées. Une coloration au bleu de méthylène nous a permis de mettre en évidence les diatomées pour faciliter leur reconnaissance.

La centrifugation, préconisée dans de nombreux articles, permet de concentrer les diatomées pour favoriser leur identification. Cependant à ce jour aucune étude n'a analysé ses effets sur les frustules. Nous nous sommes donc interrogés sur la pertinence de son utilisation et sur les paramètres d'une centrifugation idéale.

Pour mener à bien ce projet, nous avons centrifugé à différentes vitesses et durées les solutions chargées en diatomées et préalablement traitées. Puis une goutte de chaque échantillon a été déposée et fixée sur une lame. Plusieurs de ces lames ont été scannées numériquement, puis les diatomées ont été comptabilisées sur une surface définie, en différenciant les diatomées intactes des fracturées.

En nous basant sur les résultats obtenus, nous pouvons conclure qu'une centrifugation à 500 tours par minute durant 5 minutes est idéale pour collecter le maximum de diatomées sans une détérioration trop importante du frustule.

Les résultats de nos expérimentations, nous ont permis d'affiner nos connaissances sur le comportement des diatomées lors de la centrifugation. Ces résultats restent à confirmer notamment avec un nombre de lames étudiées plus important.

L'autre intérêt de ces recherches a concerné l'évaluation d'une méthodologie d'acquisition des lames microscopiques par scanner au sein du BIC, Bordeaux Imaging Center. La numérisation de lames s'est révélée être un outil incontournable. La qualité de résolution est adaptée à l'observation des diatomées, sous réserve que celles-ci soient suffisamment colorées au bleu de méthylène. L'analyse d'une lame à l'aide d'un logiciel permet un comptage facilité réduisant le risque de faux négatifs.

Même si le test de la diatomée est utilisé de façon courante, de nombreux aspects restent à explorer. Le comptage exhaustif automatisé permettrait une identification plus rapide des diatomées, autorisant l'analyse d'échantillons bien plus grands ce qui augmenterait la fiabilité de ce test.

Table des illustrations

Figure 1 Structure d'un frustule d'une diatomée (source E. Lacaze)	11
Figure 2 : Photo d'une lame de la solution T (source : BIC à Bordeaux, numérisation au Nanozoomer)	18
Figure 3 : Photo d'une lame de la solution J (source : BIC à Bordeaux, numérisation au Nanozoomer)	19
Figure 4 : Protocole de centrifugation appliqué aux tubes T (source : E. Lacaze).....	22
Figure 5 : Centrifugeuse du laboratoire d'odontologie et tubes utilisés pour centrifugation et le stockage (source : Emma Lacaze)	23
Figure 6 : Coloration de la solution à l'aide de trois colorants (source : E. Lacaze).....	24
Figure 7: Plaque chauffante, Eukitt et prélève-goutte (source : E. Lacaze).....	25
Figure 8 : Lames fixées contenant une goutte colorée au bleu de méthylène issues des tubes T (source : E. Lacaze)	26
Figure 9 : Scanner microscopique Nanozoomer (source : HAMAMATSU).....	27
Figure 10 : Détermination du centre de la goutte et mise en place d'un cercle quadrillé	28
Figure 11 : Evolution du nombre de diatomées présentes dans le culot en fonction du nombre de diatomées présentes dans le surnageant	30
Figure 12 : Nombre de diatomées comptabilisées dans le culot en fonction du temps.....	31
Figure 13: Nombre de diatomées comptabilisées dans le surnageant en fonction du temps	31
Figure 14 : Proportion de diatomées entières comptabilisées dans le culot en fonction du temps	32
Figure 15 : Nombre de diatomées comptabilisées dans le culot en fonction de la vitesse	32
Figure 16 : Nombre de diatomées comptabilisées dans le surnageant en fonction de la vitesse	33
Figure 17 : Proportion de diatomées entières comptabilisées dans le culot en fonction de la vitesse	34
Figure 18 : Nombre de diatomées comptabilisées dans les surnageants d'une première et d'une deuxième centrifugation.....	35
Figure 19 : Proportion de diatomées entières comptabilisées dans le surnageant d'une première puis deuxième centrifugation	36
Figure 20 : Evolution du nombre de diatomées et de diatomées entières dans le culot, associée à la vitesse et au temps de centrifugation	37
Tableau 1 : Numérotation des tubes en fonction de la vitesse et du temps appliqués lors de la centrifugation (source : E. Lacaze)	21
Tableau 2 : Numérotation des tubes en fonction de la vitesse et du temps appliqués lors de la centrifugation (source : E. Lacaze)	23
Tableau 3 : Résultats obtenus après comptage de la zone délimitée pour chaque lame issue du culot	29
Tableau 4: Résultats obtenus après comptage de la zone délimitée pour chaque lame issue du surnageant	29
Tableau 5 : Résultats obtenus après comptage des lames 1, 9 et 20 issues des surnageants d'une première centrifugation Ts ou d'une deuxième centrifugation Ts'.....	35
Tableau 6 : Résultats obtenus après comptage au sein du culot des solutions J.....	37

Bibliographie

1. Loir M. *Guide Des Diatomées*. Delachaux et Niestlé; 2004.
2. Ludes B, Coste M, Coste M. *Diatomées et Médecine Légale: Applications de La Recherche Des Diatomées Au Diagnostic de La Submersion Vitale*. Technique et documentation Lavoisier; Editions médicales internationales; 1996.
3. Lorin de la Grandmaison, G, Paraire F. Place de l'anatomie pathologique dans le diagnostic médico-légal d'une noyade. In: *Annales de Pathologie*. Vol 23. Masson; 2003:400–407.
4. Emile H. Diatomées en médecine et odontologie légale: fiabilité et diffusion passive. October 2015.
5. Lunetta P, Penttilä A, Sajantila A. Circumstances and macropathologic findings in 1590 consecutive cases of bodies found in water. *Am J Forensic Med Pathol*. 2002;23(4):371–376.
6. Piette MH., A. de Letter E. Drowning: still a difficult autopsy diagnosis; *Forensic Science International*, 2006, Vol.163(1), pp.1-9
7. Verma K. Role of diatoms in the world of forensic science. *J Forensic Res*. 2013;4(2):181–184.
8. Di Giancamillo A, Giudici E, Andreola S, et al. Immersion of piglet carcasses in water—The applicability of microscopic analysis and limits of diatom testing on an animal model. *Leg Med*. 2010;12(1):13–18.
9. 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;18:417-421. doi:10.1016/j.proeng.2011.11.067
10. 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;127(3):198-203. doi:10.1016/S0379-0738(02)00125-1
11. Zhao J, Ma Y, Liu C, et al. A quantitative comparison analysis of diatoms in the lung tissues and the drowning medium as an indicator of drowning. *J Forensic Leg Med*. 2016;42:75–78.
12. 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;170(1):1–7.
13. Lunetta P, Miettinen A, Spilling K, Sajantila A. False-positive diatom test: A real challenge? A post-mortem study using standardized protocols. *Leg Med*. 2013;15(5):229-234. doi:10.1016/j.legalmed.2013.03.002
14. Gourgues J. 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. November 2016:52. doi:<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01402410/document>

15. 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;41:58–64.
16. Fucci N. A new procedure for diatom extraction in the diagnosis of drowning. *Clin Exp Pharmacol*. 2012;2(2):1–2.
17. Auer A. Qualitative diatom analysis as a tool to diagnose drowning. *Am J Forensic Med Pathol*. 1991;12(3):213–218.
18. Pollanen MS. Diatoms and homicide. *Forensic Sci Int*. 1998;91(1):29–34.
19. Thakar MK, Singh R. Diatomological mapping of water bodies for the diagnosis of drowning cases. *J Forensic Leg Med*. 2010;17(1):18–25.
20. Lin C-Y, Yen W-C, Hsieh H-M, et al. Diatomological investigation in sphenoid sinus fluid and lung tissue from cases of suspected drowning. *Forensic Sci Int*. 2014;244:111–115.
21. 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*. 1994;107(1):37–41.
22. Ming M, Meng X, Wang E. Evaluation of four digestive methods for extracting diatoms. *Forensic Sci Int*. 2007;170(1):29–34.
23. Sidari L, Di Nunno N, Costantinides F, Melato M. Diatom test with Soluene-350 to diagnose drowning in sea water. *Forensic Sci Int*. 1999;103(1):61–65.
24. DiGiancamillo A, Domeneghini C, Gibelli D, Cattaneo C. Diatom extraction with HCl from animal tissues: a technical note. *Leg Med*. 2011;13(5):268–271.
25. Ludes B, Coste M, North N, Mangin P. Intérêt de l'étude de la flore des diatomées du lieu de submersion dans le diagnostic de noyade. *Bull Fr Pêche Piscic*. 1996;(341-342):133–137.
26. Kakizaki E, Kozawa S, Imamura N, et al. Detection of marine and freshwater bacterioplankton in immersed victims: post-mortem bacterial invasion does not readily occur. *Forensic Sci Int*. 2011;211(1):9–18.
27. Gruspier KL, Pollanen MS. Limbs found in water: investigation using anthropological analysis and the diatom test. *Forensic Sci Int*. 2000;112(1):1–9.
28. Matsumoto H, Fukui Y. A simple method for diatom detection in drowning. *Forensic Sci Int*. 1993;60(1):91–95. doi:10.1016/0379-0738(93)90096-S
29. Zheng P-P, Weiden M van der, Kros JM. Fast Tracking of Co-Localization of Multiple Markers by Using the Nanozoomer Slide Scanner and NDPViewer. *J Cell Physiol*. 229(8):967–973. doi:10.1002/jcp.24538

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 :

**Titre : Diatomées et centrifugation :
Evaluation des résultats par acquisition scanner**

Résumé :

Introduction : Le test de la diatomée est reconnu comme indispensable en médecine légale pour poser le diagnostic de noyade. Cependant ce test présente aujourd'hui encore de nombreux biais et difficultés d'application. Nous recherchons à améliorer les méthodes d'identification et de comptage des diatomées. **Matériel et Méthode :** Sur une solution chargée en diatomée, nous avons appliqué deux traitements chimiques différents : l'un combinant l'utilisation d'acide chlorhydrique et de peroxyde d'hydrogène chauffé, et l'autre utilisant de l'hypochlorite de sodium. Nous avons centrifugé à différentes vitesses et durées les solutions traitées. Après coloration au bleu de méthylène, une goutte de chaque échantillon a été déposée et fixée sur une lame. Ces lames ont été scannées numériquement, puis les diatomées ont été comptabilisées sur une surface définie, en différenciant les diatomées intactes des fracturées. **Résultats :** L'utilisation d'acide chlorhydrique et d'eau oxygénée chauffée est efficace dans l'élimination des impuretés. Une centrifugation à 500 tours par minute durant 5 minutes est idéale pour collecter le maximum de diatomées. La numérisation de lames par scanner microscopique s'est révélée être un outil incontournable dans l'identification des diatomées. **Discussion :** Ces résultats restent à confirmer avec un nombre d'échantillons bien plus important et un logiciel de comptage automatisé pour une identification plus exhaustive des diatomées.

Mots clés : Médecine légale, Odontologie légale, Noyade, Diatomées, Centrifugation, Scanner microscopique

**Title : Diatoms and centrifugation:
Results analysis by scanner acquisition**

Abstract :

Introduction : The diatom test is recognized as essential in forensic to diagnose drowning. However, this test still presents many biases and application issues. We are looking to improve methods the current for identifying and counting diatoms. **Materials et Methode :** On a solution loaded with diatoms, we applied two different chemical treatments: one combining the use of hydrochloric acid and heated hydrogen peroxide, and the other using sodium hypochlorite. We then centrifuged the processed solutions at different speeds and durations. After staining with methylene blue, one drop of each sample was placed and fixed on a slide. These slides were digitally scanned, then the diatoms were counted over a defined area, by differentiating between intact and fractured diatoms. **Results :** The use of hydrochloric acid and heated hydrogen peroxide is effective in removing impurities. A centrifugation at 500 rpm for 5 minutes is ideal for collecting as many diatoms as possible. The digitization of slides by microscopic scanning has proven to be an essential tool in the identification of diatoms. **Discussion :** These results have yet to be confirmed by a much larger number of samples and automated counting software for more exhaustive identification of diatoms.

Keywords : Forensic, Legal odontology, Drowning, Diatoms, Centrifugation, Microscopic Scanner