



**HAL**  
open science

# Diatomées et diffusion passive au niveau des os et des dents : noyade ou diagnostic faux positif

Jennifer Bertin

► **To cite this version:**

Jennifer Bertin. Diatomées et diffusion passive au niveau des os et des dents : noyade ou diagnostic faux positif. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. dumas-03351274

**HAL Id: dumas-03351274**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03351274>**

Submitted on 22 Sep 2021

**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.

Année 2021

Thèse n°53

THESE POUR L'OBTENTION DU  
**DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN CHIRURGIE  
DENTAIRE**

Présentée et soutenue publiquement

Par BERTIN Jennifer  
Née le 27 mars 1995 à Royan  
Le 2 septembre 2021

**Diatomées et diffusion passive au niveau des os  
et des dents : noyade ou diagnostic faux positif**

Sous la direction de : Christophe BOU  
(co-directeur : Jane GOURGUES)

Membres du jury :

M. CATROS Sylvain	Président
M. BOU Christophe	Directeur
Mme GOURGUES Jane	Co-directeur
M. BENALI Larbi	Rapporteur
Mme BADET Marie-Cécile	Assesseur

# UNIVERSITE DE BORDEAUX

MAJ  
01/11/2020

**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. CATROS Sylvain 57-01  
**Directeur Adjoint – Chargé des Relations Internationales** M.SEDARAT Cyril 57-01

### **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	Dentisterie 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 lécale	56-02
Mme	Audrey	AUSSEL	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
Mme	Cécile	BADET	Biologie Orale	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
Mme	Mathilde	FENELON	Chirurgie Orale	57-01
Mme	Elsa	GAROT	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Dominique	GILLET	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
Mme	Olivia	KEROUREDAN	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
M.	Jean-François	LASSERRE	Prothèse dentaire	58-01
M.	Yves	LAUVERJAT	Parodontologie	57-01
Mme	Odile	LAVIOLE	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Javotte	NANCY	Odontologie pédiatrique	56-01

M.	Adrien	NAVEAU	Prothèse dentaire	58-01
M.	Jean-François	PELI	Dentisterie restauratrice et 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	Noélie	THEBAUD	Biologie Orale	57-01
M.	Eric	VACHEY	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01

### **AUTRES ENSEIGNANTS**

M.	Cédric	FALLA	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
M.	François	ROUZÉ L'ALZIT	Prothèse dentaire	58-01

### **ASSISTANTS**

M.	Bastien	BERCAULT	Chirurgie Orale	57-01
M.	Baptiste	BERGES	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Mathilde	BOUDEAU	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Mme	Virginie	CHUY	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
M	Pierre-Hadrien	DECAUP	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Laura	DONNET	Biologie Orale	57-01
Mme	Julia	ESTIVALS	Odontologie pédiatrique	56-01
Mr	Pierre-André	GUILLAUD	Parodontologie	57-01
Mme	Jane	GOURGUES	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mr	Louis	HUAULT	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
Mme	Mathilde	JACQUEMONT	Parodontologie	57-01
Mme	Clémence	JAECK	Prothèse dentaire	58-01
Mr	Aymeric	JOUBERT DU CELLIER	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
Mr	Jean-Baptiste	IRIBARREN	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
Mme	Claudine	KHOURY	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mme	Camille	LACAULE	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Antoine	LAFITTE	Orthopédie dento-faciale	56-01
Mme	Léa	MASSE	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Aude	MENARD	Prothèse dentaire	58-01
M	Florian	PILEU	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Rawen	SMIRANI	Parodontologie	57-01
Mme	Florianne	VILLAT	Dentisterie restauratrice et endodontie	58-01
M.	Clément	VACHEY	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M	Paul	VITIELLO	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Sophia	ZIANE	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01



## **Remerciements**

### **A notre Président de thèse**

Monsieur le Professeur Sylvain CATROS

Professeur des Universités

Sous-section Chirurgie orale – 57-01

*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

Sous-section Odontologie médico-légale – 56-02

*Je vous remercie pour votre enseignement, votre passion et de m'avoir fait découvrir ce sujet. Votre bienveillance, votre passion et votre enthousiasme ont toujours été très communicatif et source de motivation durant nos expériences au laboratoire et à l'Hôpital Saint André. Merci de m'avoir accompagné tout au long de cette thèse.*

A notre Co-directeur

Madame le Docteur Jane GOURGUES

Assistant Hospitalo-Universitaire

Sous-section Odontologie médico-légale – 56-02

*Je te remercie pour ton implication tout au long de cette thèse. Ton aide au cours des expériences au laboratoire mais également au cours de la rédaction a été précieuse, très formateur et bénéfique. Merci pour ton soutien et ta présence.*

A notre Rapporteur de thèse

Monsieur le Docteur Larbi BENALI

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Sous-section Médecine légale et expertises médicales

*Je vous remercie du temps que vous avez accordé à la lecture et à la correction de mon travail ainsi que de votre rapport élogieux à mon égard.  
Veuillez accepter mes remerciements les plus sincères.*

A notre Assesseur

Madame le Docteur Cécile BADET

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Sous-section Odontologie orale – 57-01

*Je vous remercie d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse.  
Votre implication auprès des étudiants a toujours été très formateur. Veuillez  
accepter mes remerciements les plus sincères.*

## **Remerciements personnels**

A mes parents, mes héros du quotidien, ceux sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci pour votre soutien sans faille, votre bienveillance, votre dévouement et votre générosité. Aucun mot n'est assez fort pour décrire à quel point je suis reconnaissante de tout ce que vous avez fait pour moi. Je vous aime tellement.

A Morgan, ma moitié, mon tout. Ton soutien indéfectible et ta patience durant l'élaboration de cette thèse a été pour moi une source incroyable d'énergie, de motivation et d'amour. Notre vie à deux ne fait que commencer et j'ai tellement hâte de la vivre avec toi. Je t'aime.

A ma famille, votre bienveillance et votre confiance en ma réussite a toujours été une source de bonheur et de motivation. Merci pour votre amour.

A ma belle-famille, à votre amour, soutien et gentillesse. Merci d'avoir été présents pendant toutes ces années et de m'avoir aussi bien accueilli au sein de votre famille. Je suis heureuse d'en faire partie.

A Julie, ma sœur de cœur, mon homonyme. Ces années d'externat ont vu naître le début de notre amitié et j'en suis tellement heureuse et reconnaissante. On a vécu beaucoup d'épreuves, de peines mais aussi de joies toutes les deux et sans ton soutien et ton amour cela n'aurait pas été pareil. Merci de faire partie de ma vie et sache que tu pourras toujours compter sur moi quoi qu'il arrive.

A Laura, merci d'avoir été là pendant toutes ces années. On s'est toujours soutenue et entraînée toutes les deux et même si tu as vécu des épreuves difficiles je sais que tu finiras par en être encore plus forte. N'aie pas peur de t'exprimer et de dire non, tu es une belle personne et je suis heureuse que l'on se soit trouvée.

A Morgane, ma binôme de TP et de thèse. Ta présence, ton soutien et ta bonne humeur ont toujours été très motivant et encourageant. On a eu pas mal d'obstacles au cours de cette thèse mais nous y sommes arrivées toutes les deux et je suis très heureuse que l'on puisse célébrer cette nouvelle et dernière étape ensemble.

A mes autres copines de dentaire, votre amitié a été une véritable source de joie au quotidien. Chacune d'entre vous apporte un petit quelque chose qui rend notre groupe unique et soudé. Merci de me faire autant rire et de m'apporter autant de bonheur.

A Lisa, ma Lili. Merci d'avoir toujours été là, dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci pour ton soutien et ton amitié indéfectible depuis notre adolescence et je suis fière de la femme que tu es devenue, belle, forte et indépendante.

A Pauline, notre année de colocation n'a pas été facile mais je suis heureuse et fière que l'on est réussi à dépasser tout ça en grandissant et de notre amitié retrouvée.

A Caroline, merci pour ta confiance et ta bienveillance au cours de ces dernières années, cela m'a fait grandir et prendre confiance en moi. Merci pour tout.

Au Docteur Du Verdier, merci pour ta confiance, ta pédagogie et ton envie de transmettre. J'ai beaucoup appris au cours de cette année grâce à toi. Merci encore.

Au CHU de Poitiers, merci à toute l'équipe du service d'Odontologie du CHU de Poitiers. A Coco, Claire, et Stéphanie pour votre bonne humeur et votre aide. Aux Dr. Carrel et Dr. Lindas pour votre encadrement et pédagogie et enfin au Dr. Florentin pour votre bienveillance, votre pédagogie, votre enseignement, votre bonne humeur, j'ai beaucoup appris à vos côtés durant cette année et vos conseils me guide encore aujourd'hui.

A toutes les personnes qui ont été présentes au cours de ces années et que j'ai oublié : merci.

# Table des matières

<b>Introduction .....</b>	<b>10</b>
I. Généralités sur les diatomées en médecine légale .....	11
1. Rappels sur les diatomées .....	11
a. Morphologie des diatomées .....	11
b. Écologie des diatomées .....	12
c. Diatomées d'eau douce et d'eau salée .....	13
d. Champ d'application des diatomées .....	14
2. Définition et généralités de la mort par noyade .....	15
a. Définition d'une noyade .....	15
b. Mécanismes de la noyade .....	16
c. Eau douce et eau salée : quelles conséquences ? .....	18
d. Signes de mort par noyade .....	18
3. Rappels sur les connaissances actuelles du diagnostic de mort par noyade ....	20
a. Test de la diatomée .....	20
b. Limites du protocole actuel en médecine légale .....	21
II. Protocoles expérimentaux d'analyse de la diffusion passive des diatomées dans les os et les dents .....	23
1. Rappels des travaux précédemment réalisés ayant permis l'élaboration des protocoles expérimentaux .....	23
a. Protocole de décontamination des instruments .....	23
b. Protocole de digestion des diatomées .....	23
c. Protocole de coloration des diatomées .....	25
d. Protocole de fixation des lames pour observation au microscope des diatomées .....	26
2. Protocole d'analyse de la diffusion passive dans les fémurs de porc et les dents immergés dans l'aquarium .....	26
a. Immersion des fémurs de porc et des dents dans l'aquarium .....	26
b. Protocole d'extraction de la moelle osseuse .....	28
c. Protocole d'extraction de la pulpe dentaire .....	30
d. Digestion et coloration des diatomées .....	32
e. Difficultés rencontrées au cours du protocole de digestion des diatomées ....	35
f. Protocole synthétisé .....	37
.....	37
III. Résultats .....	38
1. Aquarium .....	38
2. Os immergés dans l'aquarium .....	39
3. Dents de noyés et dents immergées dans l'aquarium .....	45
IV. Discussion .....	47
1. Faux positifs .....	47
a. Protocole de digestion .....	47
b. Alimentation et vie ante-mortem .....	48
2. Faux négatifs .....	48
3. Échantillonnage .....	49
4. Résultats et perspectives .....	50
Conclusion .....	52
<b>Table des illustrations .....</b>	<b>53</b>
<b>Table des tableaux .....</b>	<b>54</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>55</b>
.....	58
.....	59

## Introduction

Dans le monde, 372 000 personnes meurent noyées chaque année. La noyade représente l'une des dix principales causes de décès accidentelles chez les 1-24 ans. Malgré ce constat, en médecine légale, le diagnostic de mort par noyade reste l'un des plus complexes à établir du fait de l'absence de signes spécifiques permettant de poser un diagnostic sans hésitation, difficulté qui s'accroît avec la putréfaction du corps.

Le diagnostic repose donc sur les constatations cliniques externes et internes avec notamment la présence de micro-algues dans les voies aériennes et la moelle osseuse. C'est le test de la diatomée, seul test qui permettrait d'établir un diagnostic positif de noyade.

Ces micro-algues, appelées diatomées, sont des micro-organismes unicellulaires présents dans tous les milieux hydriques et dont la particularité est de posséder un exosquelette appelé frustule composé de silice. On dénombre plus de 30 000 espèces différentes. Lors du processus de noyade, la personne meurt noyée par inhalation d'eau, douce ou salée, provoquant une asphyxie et la mort. Lors de l'inhalation de l'eau, les diatomées présentes dans le milieu hydrique, pénètrent dans l'organisme jusqu'aux poumons. Les diatomées ayant pénétré dans les poumons sont diffusées à travers les alvéoles pulmonaires vers les organes alimentés par la circulation sanguine pulmonaire : cœur, reins, foie, cerveau, estomac, moelle osseuse.

Il est communément admis que le sang enrichi en diatomées lors de l'inhalation d'eau diffuse dans les organes et qu'en l'absence de circulation sanguine, en l'occurrence chez une personne déjà morte au moment de l'immersion, les diatomées ne sont pas distribuées aux organes. Cependant, le test de la diatomée est fortement controversé depuis ces dernières années. En effet, au cours d'une immersion prolongée d'un corps, ce dernier se décompose devenant ainsi plus perméable et laissant diffuser les diatomées plus aisément. Ce phénomène peut-être à l'origine d'une contamination de la moelle osseuse rendant le diagnostic de noyade biaisé par de potentiels phénomènes de diffusion passive.

Cette controverse actuelle a orienté notre raisonnement vers la recherche d'une alternative fiable et reproductible au protocole existant du test de la diatomée. Toute la difficulté étant de trouver un environnement qui serait protégé où une diffusion passive serait impossible. Le seul organe semblable à la moelle osseuse en termes de vascularisation et protégé est l'organe dentaire. La pulpe dentaire et ses diverses structures histologiques semblent une alternative idéale au problème de faux positif.

L'objectif de notre travail sera de démontrer l'existence d'une diffusion passive des diatomées dans la moelle osseuse animale et une absence de cette dernière dans la pulpe dentaire ainsi que valiser un protocole de traitement des prélèvements.

Dans un premier temps, des fémurs de porcs et des dents humaines ont été sélectionnés puis immergés dans un aquarium enrichi en diatomées. Ils en ont été retirés après différents temps d'immersion : 7, 14, 21, 30 et 60 jours.

Par la suite, les prélèvements de moelle osseuse et de pulpe dentaire ont été traités chimiquement à l'aide des protocoles élaborés lors des travaux de thèse précédents (Hourqueig, Gourgues et Lacaze Saint Jean) afin d'éliminer tous les résidus organiques et de confectionner les lames histologiques.

La dernière phase de notre protocole a consisté à effectuer le comptage et l'identification des diatomées au microscope dans le cadre de cette expérimentation.

# I. Généralités sur les diatomées en médecine légale

## 1. Rappels sur les diatomées

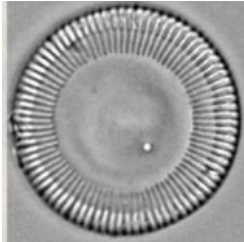
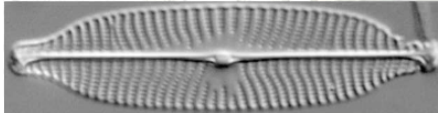
### a. Morphologie des diatomées

Les diatomées sont des algues microscopiques unicellulaires dont la taille varie entre 5 et 500  $\mu\text{m}$ . Elles se caractérisent notamment par la présence d'une paroi cellulaire constituée de silice appelée le frustule (exosquelette ou coquille de silice).

A l'intérieur de ce squelette siliceux se trouve le contenu cellulaire constitué entre autres par un noyau, des chloroplastes, des mitochondries et des vacuoles. (1)(2)(3)

En fonction de la géométrie du frustule on distingue ainsi deux types de diatomées :

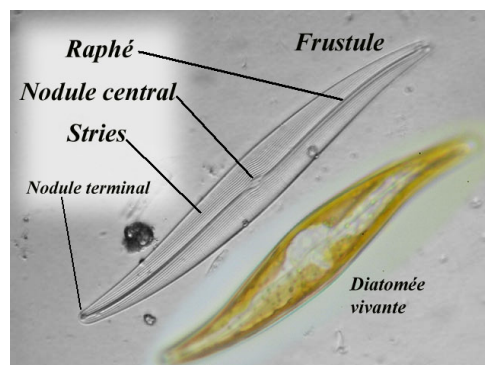
- Centrales dont la forme du frustule est circulaire à symétrie radiale
- Pennales ou pennées avec ou sans raphé dont le frustule est allongé à symétrie bilatérale.

Diatomée à symétrie radiale	Diatomée à symétrie bilatérale
	

**Tableau 1:** Diatomées à symétrie radiale (à gauche) et bilatérale (à droite) (4)

Le raphé constitue une fissure traversant la diatomée dans toute son épaisseur le long de son grand axe. Il est formé de deux fentes séparées l'une de l'autre par un nodule médian lui-même percé d'un fin canal. Les deux fentes sont également pourvues à leur extrémité distale d'un nodule terminal.

Ce dernier joue un rôle important dans les échanges de la cellule avec le milieu extérieur et dans la locomotion, en effet, les diatomées dépourvues de raphé sont incapables de se mouvoir.(5)



**Figure 1:** Schéma interne d'une diatomée à raphé (6)



Plus communément appelées « micro-algues brunes » en raison de leur couleur brunâtre, elles constituent l'un des groupes d'algues le plus diversifié. En effet, leur nombre total varierait entre 20 000 et 30 000 espèces différentes en fonction des auteurs. Leurs différentes formes et tailles permettent ainsi de les distinguer et d'établir une identification précise.

## **b. Écologie des diatomées**

En milieu aquatique on distingue les diatomées phytoplanctoniques vivant en suspension dans les colonnes d'eau, des diatomées benthiques vivant attachées à un substrat tels que les roches, le sable, les animaux, les sédiments organiques fins et les plantes, selon les espèces. De plus, les diatomées d'une même espèce peuvent former des colonies qu'elles soient en suspension dans une colonne d'eau ou accrochées à un substrat.

Elles sont présentes dans la majorité des milieux aquatiques et humides et sont responsables d'approximativement 20% de la fixation globale du dioxyde de carbone par photosynthèse ainsi que de 20% de la production d'oxygène atmosphérique.

Cependant, le développement des diatomées va essentiellement dépendre de son environnement et des variations qu'il subit. Ces dernières sont capables d'une acclimatation relativement efficace face aux variations des facteurs environnementaux.

Parmi les facteurs pouvant influencer le cycle des diatomées nous retrouvons : la lumière, la température, le pH, la salinité, la teneur en silice et en sels dissous.

Avec le changement climatique et l'acidification des océans, le pH est une variable intéressante. D'après les premières études, les diatomées posséderaient une adaptation très efficace face à ce phénomène. En effet, l'acidification des mers et des océans augmenterait la croissance et le taux de carbone fixé ce qui pourrait suggérer des processus d'adaptation efficaces.

Concernant la salinité, les diatomées sont capables de répondre rapidement à une variation de salinité en ajustant de nombreuses voies métaboliques comme la synthèse des acide-aminés, l'incorporation de carbone, le taux de protéines et la production de carbohydrates et de lipides notamment dans certains environnements dynamiques tels que les estuaires. Une minorité d'espèces sont malgré tout exclusivement présentes en eau douce ou en eau salée mais nous y reviendrons un peu plus tard.

La teneur en silice du frustule varie aussi en fonction de ce paramètre. La salinité influe sur la formation du frustule au niveau macroscopique et nanoscopique. Une diminution de la celle-ci entraîne une diminution de la taille des particules de silice engendrant un réseau de formation plus dense

La température quant à elle, va influencer les écosystèmes des cours d'eau et des océans. On retrouve la plus grande majorité des diatomées entre 5 et 20°C.

Certaines espèces échappent à cette règle et vivent à des températures plus extrêmes. C'est le cas des chlorophycées et les xanthophycées qui vivent entre 15 et 30°C ou encore des cyanophycées qui évoluent dans des eaux à plus de 30°C.

La lumière est particulièrement impliquée dans la variation de la croissance et de la structure d'une communauté.

Malgré la présence des études morphologiques et physiologiques, les stratégies d'acclimatation des diatomées restent très méconnues à ce jour. De récentes études sur des analyses génétiques sont en cours. (7)

### c. Diatomées d'eau douce et d'eau salée

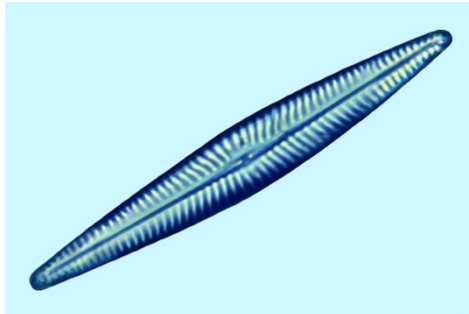
Comme expliqué précédemment, la majorité des diatomées ont une forte capacité d'adaptation à la salinité.

Cependant, certaines diatomées vivent exclusivement dans les eaux douces (rivières, lacs, cours d'eau, etc.) et ne supportent pas la présence de sels. Il en va de même pour les diatomées exclusivement présentes dans les eaux salées.

Les diatomées pennales dominent par rapport aux diatomées centrales dans les eaux douces.

Les diatomées d'eau douce sont des espèces dites sténohalines. Ces dernières représentent une source de nourriture pour divers organismes unicellulaires et pour des invertébrés aquatiques brouteurs qui eux-mêmes seront consommés par des poissons.

Les diatomées benthiques d'eau douce sont également un très bon indicateur de la qualité des eaux.

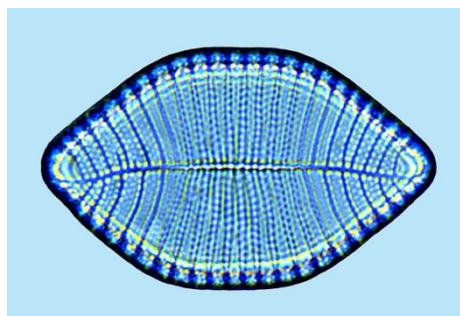


**Figure 2:** Exemple de diatomées d'eau douce (*Navicula pseudolanceolata*) (8)

Les diatomées marines sont des espèces dites euryhalines. Ces espèces de diatomées sont donc soumises à une variation plus ou moins quotidienne de la salinité.

La majorité des diatomées marines sont benthiques même si certaines espèces planctoniques sont également présentes.

Lorsque les diatomées benthiques sont mises en suspension par les vagues et les courants, elles participent, avec les diatomées planctoniques et d'autres organismes, au régime alimentaire d'invertébrés qui se nourrissent en filtrant l'eau : balanes, mollusques bivalves, par exemple.



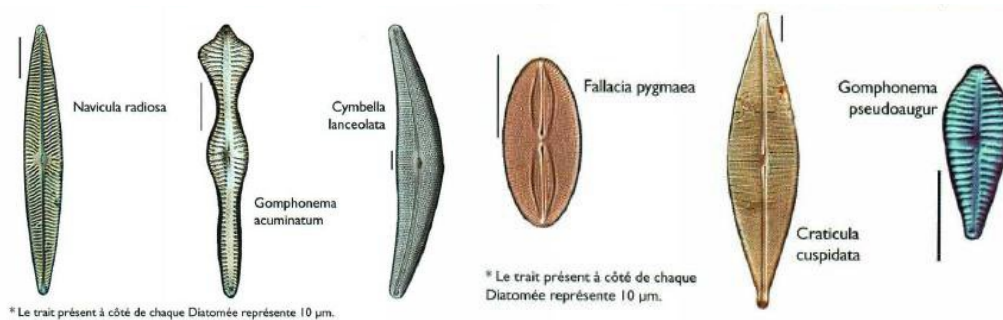
**Figure 3:** Exemple de diatomées marines avec (*Achnanthes javanica*) (8)

Ces différences de spécificité entre diatomées marines et d'eau douce auront leur importance lors de l'autopsie et du test de la diatomée.

#### d. Champ d'application des diatomées

Les diatomées sont utilisées dans de nombreux domaines et champ d'application scientifique. En effet, l'étude de ces dernières est notamment retrouvée (5,6) :

- Dans les reconstitutions paléo-environnementales et paléocéanographiques.
- Comme indicateur de la qualité des eaux : des eaux de bonne qualité ne présenteront pas les mêmes associations d'espèces de diatomées que des eaux de moindre qualité



- Dans la production d'une roche appelée à la Diatomite. En effet, l'accumulation de diatomées et la déshydratation entraîne la formation de cette roche légère, friable et poreuse très utilisée comme :
  - o Adjuvant de filtration
  - o Absorbant dans les litières pour animaux domestiques
  - o Isolant
  - o Stabilisant de la nitroglycérine dans la dynamite
  - o Insecticides
  - o Herbicides
  - o Ou encore dans l'industrie comme abrasif léger comme par exemple dans les dentifrices
- Dans le secteur des nanotechnologies grâce à l'utilisation des frustules silicieux dans des composés électroniques, optiques ou encore dans la fabrication de batteries
- Dans l'industrie pharmacologique et plus particulièrement en neuropharmacologie avec la maladie d'Alzheimer. En effet, certaines diatomées (Pseudo-nitzschia) produisent un composé chimique appelé acide domoïque. Ce dernier, ingéré suite à la consommation de fruits de mer contaminés, provoque des pertes de mémoire parfois permanentes ce qui orienterait vers un modèle de recherche pour la maladie d'Alzheimer.
- En médecine légale pour le diagnostic de morts par noyade. Leur présence dans certains organes va orienter la détermination de la cause de décès comme nous allons l'exposer plus loin.

## 2. Définition et généralités de la mort par noyade

### a. Définition d'une noyade

Selon l'OMS

*La noyade est le processus d'altération de la fonction respiratoire par asphyxie résultant d'une submersion/immersion dans un liquide ; le sujet en sort indemne, avec une pathologie, ou il décède.*

Parmi les décès survenant en milieu aquatique on distingue deux grands types de noyade (12,13) :

- Les noyades primaires dite asphyxiques. Elles correspondent à l'inondation des voies respiratoires **avant** la perte de connaissance et l'arrêt respiratoire et représentent 85 à 90% des cas. Elles peuvent se produire dans deux cas de figure :
  - Une personne ne sachant pas nager qui tombe dans l'eau puis coule par insuffisance technique après s'être débattue
  - Un nageur expérimenté ayant dépassé ses possibilités et se noie après épuisement.

Dans ce type de noyade asphyxique, une partie de l'eau est avalée tandis que l'autre passe dans les poumons et provoque une asphyxie progressive, irréversible, et dont l'état terminal est une syncope anoxique par manque d'oxygénation. Le noyé aura un « aspect » cyanosé.

- Les noyades secondaires dites syncopales. Elles correspondent à l'inondation des voies respiratoires **après** la perte de connaissance et l'arrêt respiratoire et représentent 10 à 15% des cas.

En France, la mort par noyade représente la 4<sup>ème</sup> cause d'accidents après les traumatismes, les intoxications et les brûlures et la 2<sup>ème</sup> cause de mortalité accidentelles tous âges confondus avec 1750 décès/an et la 1<sup>ère</sup> chez les enfants de 1 à 4 ans. (12)

D'après les estimations mondiales, 320 000 personnes seraient décédées des suites de noyade en 2016 selon l'OMS.

## b. Mécanismes de la noyade

### Noyade asphyxique

Lors de la noyade asphyxique, noyade la plus courante, différentes phases vont se succéder une fois la personne immergée sous l'eau. (14)

	Première phase	Deuxième phase	Troisième phase
<b>Mécanisme</b>	Apnée réflexe dès immersion de la tête	Reprise respiratoire par inspirations rapides	Arrêt respiratoire complet Victime sombre dans le fond
<b>Durée</b>	De quelques secondes à 2 minutes	3 minutes	4 à 10 minutes après l'arrêt respiratoire pendant lequel le cœur bat encore
<b>Conséquences</b>	Perte de connaissance  Arrêt cardiaque possible	Temps de la noyade  Irruption de l'eau dans les poumons par aspiration	1 <sup>ère</sup> phase : - Etat de mort cérébrale apparente - Battement cardiaque encore présent pendant 4 à 10 min 2 <sup>ème</sup> phase : - Etat de mort clinique - Fibrillation ou arrêt cardiaque 3 <sup>ème</sup> phase : - Etat de mort réelle - Arrêt cardiaque irréversible - Manque d'oxygène aigu sur le plan cérébral

**Tableau 2:** Les différentes phases d'une noyade par asphyxie (14)

Lors de la troisième phase de la noyade asphyxique, trois stades (apparente ; clinique et réelle) sont cités et méritent d'être expliqués afin de bien comprendre les différents stades d'évolution au cours de cette troisième phase.

La **mort apparente** correspond à une absence de ventilation associée à une présence de battement cardiaque et une tension faible. État grave mais réversible

La **mort clinique** correspond à une fibrillation suivie de l'arrêt du cœur. État très grave toujours réversible mais séquelles neurologiques si l'arrêt cardiaque supérieur à 3 minutes.

Et enfin la **mort réelle** correspond un arrêt cardiaque depuis plusieurs minutes associé à un abaissement de la température centrale ainsi qu'une anoxie du tronc cérébral. C'est un état irréversible sauf exception et avec des séquelles très graves au niveau neurologique

## Noyade syncopale

L'inondation peut être active avec reprise des mouvements respiratoires par la personne qui se retrouve immergée ou bien passive par infiltration de l'eau sans reprise des mouvements respiratoires.

La perte de connaissance peut se produire dans divers cas de figure :

- Après un choc thermo-différentiel qui correspond à une différence de température entre la température cutanée d'une personne et celle de l'eau provoquant une syncope.
- Lors de traumatismes : un choc lors d'un plongeon, pratique d'une activité nautique, par exemple.
- Suite à problème cardiovasculaire
- Après une hyperventilation dans le but de parcourir une longue distance en apnée provoquant un abaissement de la teneur en gaz carbonique et une anoxie
- Une syncope réflexe lors du processus de noyade sèche
- Suite à un problème médical comme un malaise hypoglycémique, épilepsie, etc.

Dans ce type de noyade, et contrairement aux noyades asphyxiques, le noyé aura un « aspect blanc » sans signe de cyanose lors de l'autopsie. (14)

Parmi les noyades syncopales, deux mécanismes se distinguent : l'hydrocution et la noyade sèche

- **L'hydrocution ou choc thermo-différentiel**

Elle correspond, comme évoqué précédemment, à une différence de température entre la température corporelle d'un individu et celle de l'eau.

Lors d'une exposition prolongée au soleil ou d'un repas riche en calories, le sang se concentrera principalement dans les zones périphériques du corps afin de conserver une constance thermique de l'organisme. Cependant, au contact de l'eau (plus froide que le corps) et sans précaution préalable, cette masse sanguine est refoulée au centre réflexion de vasoconstriction. Ceci entraîne une augmentation de la pression artérielle et une bradycardie ce qui a pour conséquence une diminution de l'irrigation cérébrale et provoque une syncope pouvant s'accompagner d'un arrêt cardio-respiratoire (14)(15)

- **Noyade sèche**

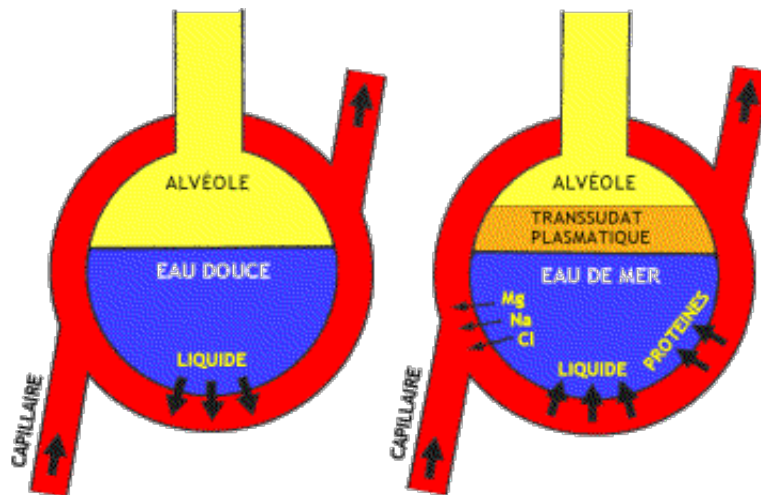
C'est une noyade peu courante et donc les mécanismes sont encore très peu connus et mal compris. Elle est provoquée par une entrée soudaine d'une petite quantité d'eau dans les voies respiratoires provoquant un spasme du larynx qui entraîne une asphyxie par obstruction. Les poumons restent quasiment secs on parle ainsi de noyade sèche. (15)(16)

### c. Eau douce et eau salée : quelles conséquences ?

Une autre particularité dans les morts par noyade se traduit par la différence de mécanismes et de conséquences pour les morts en eau douce et eau salée.

Selon le principe de l'osmose, deux compartiments de concentration différente et séparés par une membrane semi-perméable vont interagir entre eux. En effet, le compartiment le moins concentré va diffuser à travers la membrane vers le compartiment le plus concentré afin de le diluer.

En eau douce, l'eau étant moins concentrée que le sang, cette dernière va diffuser à travers la paroi alvéolaire dans le sang pour le diluer entraînant des complications trois fois plus grave que l'eau de mer. En effet, elle entraîne une hémodilution du sang alors que l'eau salée entraîne une hémococoncentration.(14)



**Figure 5:** Schéma physiopathologique des noyades en eau douce et eau salée (14)

De même que les conséquences sur le corps humain sont différentes entre eau douce et eau salée, ces dernières entraînent également des différences au niveau des espèces de diatomées.

En effet, les diatomées retrouvées en eau douce sont différentes de celles retrouvées en eau salée. Cela aura donc également son importance lors de l'autopsie et pour l'enquête puisque cela permettra de déterminer si le lieu de découverte du corps est similaire à celui de la noyade.

### d. Signes de mort par noyade

Les noyades peuvent-être accidentelles, criminelles ou suicidaires.

Les signes recueillis lors de la levée du corps (sur la scène de crime) et lors de l'autopsie médico-légale sont les suivants.

Les constatations externes réalisées sur le corps d'un noyé permettent de mettre en évidence une cyanose de la face, une rigidité cadavérique, une macération épidermique, une protrusion de la langue ainsi qu'une formation mousseuse située au niveau des orifices bucco-narinaires appelée spume.

Les constatations internes mettent en évidence une congestion multi viscérale, des poumons denses, lourds, de teinte violacée ainsi qu'un œdème intra-alvéolaire et une dilatation des espaces alvéolaires et présentant l'empreinte des côtes, la présence d'eau dans l'estomac et les intestins, un aspect « mouillé » et tendu des viscères et des tâches de Tardieu.

Cependant, tous ces signes externes et internes ne permettent pas d'affirmer avec certitude une noyade mais seulement que le corps a effectué un séjour en milieu hydrique quelle que soit l'origine du décès.

Le seul signe « fiable » évocateur d'une mort par noyade est la présence de la spume. Cette formation mousseuse provient d'un brassage de l'air, d'eau et de mucus tapissant les voies aériennes lors des derniers mouvements respiratoires effectués dans l'eau et ressemblant à l'écume de mer.(12)(15)

Elle se dépose à l'entrée des narines, bouches et voies aériennes supérieures.



**Figure 6:** *Spume bucco-narinaire (source : Christophe Bou)*

De même, suite à la noyade, le corps sera charrié par les divers courants entraînant des modifications taphonomiques diverses tels que l'apparition de lésions cutanées et la perte des signes internes et externes évoqués précédemment. De manière chronologique, les phénomènes putréfactifs apparaissent après quelques jours entraînant des modifications similaires. Ainsi, à la découverte, le corps est plus souvent méconnaissable et il est impossible de dire si la victime est morte noyée ou non.

La noyade reste donc l'un des diagnostics les plus difficiles en médecine légale du fait de l'absence de signes pathognomoniques, c'est-à-dire de signes caractéristiques permettant de poser un diagnostic sans hésitation. Cette difficulté s'accroît avec la putréfaction du corps.

Pour orienter le diagnostic vers la noyade il faut donc se diriger vers la recherche et la détection d'une micro-algue : la diatomée. Le test de la diatomée est à ce jour le gold standard dans le diagnostic de la mort par noyade en médecine légale malgré de nombreuses controverses.



### 3. Rappels sur les connaissances actuelles du diagnostic de mort par noyade

#### a. Test de la diatomée

Les premiers tests de détection des diatomées ont été effectués sur le liquide pulmonaire d'un noyé (17) par Hofmann en 1856. Par la suite, de nombreux chercheurs ont effectué des recherches et détecté des diatomées dans le sang, les reins, le foie, le cœur, le tissu cérébral mais également dans la moelle osseuse de noyés. La détection de diatomées dans la moelle osseuse a été mise en évidence par Tamasaka en 1949. (18)

Depuis leur découverte dans les tissus de noyés, les diatomées sont devenues l'un des points clés du diagnostic de mort par noyade vitale. Les protocoles et analyses se sont codifiés et consistent aujourd'hui en une identification comparative, qualitative et quantitative des diatomées dans les prélèvements cadavériques et dans les échantillons de l'eau d'immersion.

Cette méthode repose notamment sur le fait que l'inhalation massive du milieu d'immersion lors de la noyade, dont nous avons expliqué le mécanisme précédemment, fait pénétrer dans les poumons un grand nombre de diatomées présentes dans le milieu hydrique d'immersion. La pression de l'eau pénétrant dans les poumons entraîne une rupture des parois alvéolaires et permet la diffusion d'un certain nombre de diatomées dans le flux sanguin, qui les véhicule vers d'autres organes plus profonds tels les reins, le foie, la rate, le tissu cérébral et surtout la moelle osseuse. (12)

En effet, le prélèvement de moelle osseuse de noyé est le test le plus fiable car les autres tissus mous (reins, foie, cœur, tissus, cérébral, etc.), lors d'une immersion prolongée de plusieurs semaines, seront obligatoirement colonisés par les diatomées du fait de la putréfaction progressive du corps et de sa perméabilité. La moelle étant dans une cavité « fermée » serait protégée de la diffusion passive des diatomées par sa corticale. (19,20)

#### En quoi consiste le test de la diatomée ou méthode limnologique ?

La première étape consiste à prélever l'eau dans laquelle le corps immergé a été retrouvé. Une analyse de l'eau d'immersion est primordiale afin de déterminer quelles espèces de diatomées sont présentes. Deux prélèvements sont généralement réalisés : un en surface et un plus en profondeur. Le tube de prélèvement devra idéalement avoir été préparé par immersion, préalablement, à la soude molaire afin d'éviter tout risque de contamination extérieure.

La deuxième étape, quant à elle, se déroule lors de l'autopsie. Elle consiste à réaliser les prélèvements des différents tissus mous (cœur, reins, poumons, rate, foie, tissu cérébral) et de la moelle osseuse, généralement prélevée dans le fémur. Les prélèvements sont ensuite conditionnés dans des tubes à essai sec et conservés à +4°C jusqu'à leur analyse.

La troisième étape est l'analyse et le traitement de ces échantillons prélevés. Cette étape permet d'éliminer les artéfacts et de désorganiser les composants organiques pour permettre la détection des frustules en silice au microscope. Pour cela différentes analyses sont réalisées sur les échantillons.

Pour l'analyse de l'eau d'immersion, une première étape de centrifugation est nécessaire, suivie par une deuxième étape de digestion chimique par eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 130°C ou bien par calcination avec la méthode du « grillage ». Une combinaison de ces deux méthodes est également possible.

Pour l'analyse des prélèvements tissulaires, deux méthodes sont possibles : soit par digestion acide (par acide nitrique, chlorhydrique ou bien eau oxygénée), soit par méthode enzymatique par l'intermédiaire de subtilisine ou de protéinase K.

Après traitement des échantillons, ces derniers sont déposés sur une lame sur laquelle a préalablement été mis en place une résine de montage, par exemple Naphrax ou Eukitt, puis ils sont recouverts d'une lamelle afin de les observer au microscope et commencer l'analyse.  
(12)(21)(22)

## **b. Limites du protocole actuel en médecine légale**

Le protocole du test de la diatomée est aujourd'hui assez controversé de par les différents biais qui peuvent survenir au cours de l'analyse.

Voici quelques limites au protocole de la méthode limonologique dans le diagnostic de mort par noyade.

### **Possibilité de faux-positifs**

En effet, le test de la diatomée part du principe que ces dernières, retrouvées dans les organes d'un noyé, proviennent uniquement de l'eau de noyade. Cependant, de nombreux biais peuvent survenir entraînant des diagnostics de faux-positifs.

- La présence ANTE MORTEM de diatomées dans le corps humain

Il a, en effet, été démontré par certains auteurs (20)(23) que les diatomées peuvent être présentes de manière naturelle chez certaines personnes : pêcheurs, consommateurs de fruits de mer et poissons, travailleurs dans les carrières de diatomites, poissonniers, personnes vivant en bord de mer, lors de baignades, etc. Il faut donc prendre en compte, lors de l'autopsie cette caractéristique.

- Diffusion passive

Comme mentionné précédemment, on sait que lors de la décomposition du corps une perméabilité au niveau des tissus mous se crée. On peut donc se poser la question de la fiabilité du test de la diatomée sur les tissus mous et d'une potentielle diffusion passive à leur niveau et donc de diagnostic faux-positif. La putréfaction joue donc un rôle très important dans cette remise en question du test de la diatomée.

L'étude de Stephenson et Al. (24) a notamment démontré que la putréfaction peut masquer la présence de blessures et maladies organiques ante mortem.

Les études (19,20) de Svetislav en 2002 et DiGiancamillo en 2016, ont démontré l'existence d'une diffusion passive, après immersion respectivement de rats morts noyés ou non et de porcelets morts-nés, dans les tissus mous (estomac, poumons, sang). Mais aucune de ces deux études n'a testé la moelle osseuse. Ce qui est dommage car c'est précisément sur cette dernière qu'est actuellement effectué le test de la diatomée.

La qualité des os de prélèvement de la moelle est également un critère important. En effet selon les précédentes analyses effectuées par le Dr. Hourqueig, une diffusion passive existe dans un os endommagé par des fissures, des fractures ou bien présentant des trous nourriciers de taille importante (15). Lors du chariage du corps par les courants, le corps subit de nombreux dommages corporels exposant ainsi les os à la diffusion passive des diatomées.

Lors de notre étude, et afin d'éviter les résultats de faux-positifs, les os seront sélectionnés précautionneusement afin d'exclure tous os endommagés pour ne pas biaiser notre étude sur la diffusion passive au niveau de la moelle osseuse.

- Contaminations externes

Lors du prélèvement des organes et de la moelle osseuse au cours de l'autopsie, les diatomées éventuellement présentes à la surface du corps, des gants ou bien des instruments utilisés peuvent se retrouver dans les échantillons prélevés (25)(26). Une désinfection des instruments selon un protocole bien spécifique doit-être mis en œuvre mais nous en reparlerons un peu plus tard.

De nombreux auteurs se sont tournés vers cette question de la décontamination des instruments. Parmi eux, nous retrouvons Grandmaison et Lunetta (26,27) qui proposait dans leur étude une solution équimolaire de soude (NaOH) pour un temps de trempage de 24h. Ludes (28) préconisait dans son étude en 1994 une concentration à 2 N de NaOH soit 2 unité molaire de NaOH, toujours avec un temps de trempage de 24h.

### **Possibilité de faux-négatifs**

Lors des noyades sèches et par hydrocution, comme expliqué précédemment, il n'y a pas d'inhalation d'eau donc pas de diffusion active des diatomées. Une erreur de diagnostic lors de l'autopsie peut donc être faite car aucune diatomée ne sera retrouvée.

De plus, au cours des nombreuses étapes de manipulations des prélèvements, une perte d'information peut se produire.

Au vu de ces constatations, les travaux précédemment effectués au sein de notre labo avaient pour but étant d'exclure les biais de diffusion passive et de contamination. Ainsi différents protocoles ont été misent au point par les Dr. Hourqueig, Dr. Gourgues et Dr. Lacaze Saint Jean. Ces derniers ont été repris lors de notre analyse de la diffusion passive des diatomées à travers les os de porc et les dents.

## **II. Protocoles expérimentaux d'analyse de la diffusion passive des diatomées dans les os et les dents**

### **1. Rappels des travaux précédemment réalisés ayant permis l'élaboration des protocoles expérimentaux**

#### **a. Protocole de décontamination des instruments**

La décontamination des instruments utilisés pour les prélèvements ainsi que les manipulations des échantillons recueillis est un paramètre très important afin d'éviter toute contamination externe.

Une expérience récente réalisée par Jane Gourgues (3) dans le cadre de sa thèse en 2016 a montré que le temps de d'immersion des instruments préconisait par Grandmaison, Lunetta et Ludes n'était pas suffisant. De même un mélange équimolaire de NaOH ne permettait pas de détruire les frustules silicieuses des diatomées de manière efficace.

Un protocole a donc été mis au point, permettant d'obtenir une destruction des frustules et donc une décontamination efficace et suffisante pour limiter le risque de contamination externe.

Ce dernier consiste à mélanger 1L d'eau distillée avec 2 moles/L de soude caustique (NaOH) soit 80g de cristaux de soude. Le matériel est ensuite immergé dans cette solution pendant un temps minimum de 14 jours pour une destruction totale des frustules et donc des diatomées. Une phase de rinçage dans des bacs remplis d'eau distillée termine la procédure de décontamination.

Au vu des résultats concluants obtenus avec ce procédé, nous avons décidé de le mettre en application pour nos expériences.

Les instruments dont nous avons besoin ont donc été placés dans une solution de 2 moles/L de NaOH pendant 14 jours. Ces derniers ont ensuite été placés dans une solution d'eau distillée pendant 7 jours afin de les rincer et d'éliminer tous résidus de soude et ainsi éviter toute destruction des diatomées potentiellement présentes dans nos prélèvements de moelle osseuse et de pulpe dentaire dont le procédé sera expliqué par la suite.

#### **b. Protocole de digestion des diatomées**

Le test de la diatomée est un indispensable de la communauté scientifique médico-légale dans le diagnostic des morts par noyade. Cependant et malgré un consensus commun visant à démontrer son importance, il n'existe pas à l'heure actuelle un protocole standardisé et universel. Actuellement, chaque laboratoire et institut médico-légal applique son propre protocole de préparation et digestion des échantillons.

Le but de cette digestion est de dissoudre la matière organique tout en conservant la frustule silicieuse de la diatomée.

De nombreux auteurs et études se sont multipliées ces dernières années pour tenter de trouver le procédé le plus efficace et approprié à l'élimination de cette matière organique.

Ainsi, l'utilisation d'acide sulfurique seul ou couplé à du peroxyde d'hydrogène ou de l'acide chlorhydrique a fait l'objet de plusieurs expérimentations au cours de ces dernières années. (20,29-31)

De même pour l'acide nitrique utilisé seul pour la digestion de la moelle osseuse par Pollanen en 1998 (32) ou bien par Lunetta en 2002 qui l'a notamment couplé dans ces expérimentations à du peroxyde d'hydrogène et de l'acide chlorhydrique. (33)

Une autre digestion, très intéressante a également vu le jour. Celle de la digestion enzymatique par la protéinase K. Cette méthode, mise au point par Ludes (28), a l'avantage de présenter plus de sécurité lors des manipulations que les expériences précédemment citées mais également une absence de dommage sur les diatomées qui restent parfaitement intactes. Le seul inconvénient de cette méthode est son temps de digestion très long (8h) ainsi que son coût.

En 2011, DiGiancamillo, propose une autre méthode : l'association de peroxyde d'hydrogène et d'acide chlorhydrique pour la digestion de la matière organique (34) . Les résultats montrent que ce procédé est très efficace sur les résidus organiques sans être trop dégradant pour les diatomées et avec un temps de digestion beaucoup moins long qu'avec la protéinase K puisqu'ici 4h suffisent. Cette méthode est à ce jour la plus utilisée en terme d'efficacité et de coût.

C'est donc ce procédé mise au point par DiGiancamillo et évalué par le travail du Dr Hourqueig en 2015 (15) et que nous avons réutilisée pour nos propres expériences dans cette thèse.

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

**Figure 7:** Protocole de digestion de la moelle osseuse et de la pulpe dentaire à l'aide de peroxyde d'hydrogène et d'acide chlorhydrique (source : Hourqueig (15))

Dans ce protocole, c'est la décantation de 24h qui a été utilisée. Une autre technique par centrifugation existe et a notamment fait l'objet de la thèse d'Emma Lacaze (35).

La centrifugation consiste à concentrer les diatomées pour favoriser leur identification en seulement quelques minutes à l'aide d'une centrifugeuse.

Cette méthode est très intéressante car beaucoup plus rapide que la décantation.

Cependant, c'est également la méthode avec le coût le plus élevé car elle nécessite du matériel plus important et avec le plus grand risque de détérioration des diatomées.

D'après les conclusions d'Emma Lacaze, une centrifugation de 5 min à 500 tour/min est la durée maximale à ne pas dépasser afin d'éviter la détérioration d'un trop grand nombre de frustules.

Dans notre étude nous nous sommes donc orientés vers la méthode de décantation car notre objectif étant de démontrer la présence d'une diffusion passive dans la moelle osseuse nous ne voulions pas risquer de perdre des données par destruction des frustules lors de la centrifugation.

### **c. Protocole de coloration des diatomées**

Les échantillons une fois préparés et digérés doivent être colorés afin de faciliter le repérage et le comptage des diatomées au microscope.

Emma Lacaze, dans le cadre de sa thèse (35), a testé différents colorants afin de déterminer lequel serait le plus approprié pour l'observation des diatomées au microscope. Elle a donc testé 3 colorants : la safranine, l'hématoxyline et le bleu de méthylène.

Après ces différentes observations, elle en a conclu que la coloration au bleu de méthylène était la plus appropriée et efficace à la mise en évidence des diatomées.

#### **Méthode retenue**

Pour un échantillon de 20 ml, à l'aide d'une petite pipette, verser 4 gouttes (= 0.3 ml) de la solution de bleu de méthylène (0.2 ml de bleu de méthylène pur dans 125 ml d'eau distillée) dans l'échantillon,

Refermer le bouchon, secouer et laisser décanter au moins 6h

#### **d. Protocole de fixation des lames pour observation au microscope des diatomées**

A l'aide d'une résine de montage (Eukitt® ou Naphrax®) qui a pour but la conservation des échantillons ainsi qu'une meilleure observation des diatomées, les lames sont fixées.

##### **Méthode**

- S'assurer que les lames décontaminées à la soude ont bien été rincées dans l'eau distillée, les laisser sécher à l'air libre *sans les essuyer avec du papier*
- A l'aide de la pipette à volume réglable, prélever au fond du tube à essai contenant les échantillons préalablement digérés et colorés
- Mettre 2 gouttes au centre d'une lame et laisser évaporer sur la plaque chauffante
- Avec une tige en bois, déposer 1 goutte de résine sur la lame, poser une lamelle et appliquer à l'aide d'une précelle
- Faire chauffer environ 5 secondes sur la plaque jusqu'à disparition des bulles, bien manipuler la lame à l'horizontale
- Laisser refroidir puis enlever les excès autour de la lamelle
- Numéroter la lame

Une fois les lames préparées, il ne nous reste plus qu'à les observer au microscope. Cela consiste à balayer toute la lame de droite à gauche et de haut en bas en objectif X40 afin de les repérer et les comptabiliser (screening des lames)

## **2. Protocole d'analyse de la diffusion passive dans les fémurs de porc et les dents immergés dans l'aquarium**

Après avoir défini les protocoles précédents, nous les avons appliqués à nos échantillons.

### **a. Immersion des fémurs de porc et des dents dans l'aquarium**

L'aquarium a été enrichi en diatomées provenant d'un cours d'eau, « le Touch » près de Toulouse avant toute immersion des os et des dents.

#### **Immersion des fémurs de porc**

Un traitement des os a été préalablement réalisé avant leur immersion dans l'aquarium. Ces derniers ont été décharnés et mise à nu.

Leur état de surface a également été inspecté afin de vérifier l'absence de trous nourriciers trop conséquents mais également l'absence de fissure ou de fracture pour ne pas biaiser les résultats.(15)



**Figure 8:** *Fémur de porc - Vérification de l'état de surface (source : Jennifer Bertin)*

Une fois cette analyse des os effectuée, ces derniers ont été attaché deux par deux soit 12 os au total et immergés dans l'aquarium durant des temps différents :

- T0 : os témoins non immergés
- T1 : 7 jours
- T2 : 14 jours
- T3 : 21 jours
- T4 : 1 mois
- T5 : 2 mois



**Figure 9:** *Immersion dans l'aquarium enrichi en diatomées des fémurs de porc attachés deux par deux (source : Jennifer Bertin)*



## Immersion des dents

Les dents ont également été soigneusement sélectionnées : monoradiculées, apex fermés et absence de caries et reconstitutions prothétiques.

Nous avons sélectionné 4 dents pour chaque temps d'immersion soit au total 24 dents, puis ces dernières ont été immergées dans l'aquarium durant des temps semblables au fémurs de porc :

- T0 : dents témoins non immergées
- T1 : 7 jours
- T2 : 14 jours
- T3 : 21 jours
- T4 : 1 mois
- T5 : 2 mois

Nous avons aussi inclus 2 dents extraites sur un noyé suite à une autopsie à l'institut médico-légal de Bordeaux.



**Figure 10:** Sélection des dents de T0 à T5 (source : Jennifer Bertin)

### **b. Protocole d'extraction de la moelle osseuse**

Les os ont été retirés de l'aquarium aux temps indiqués précédemment. Ces derniers ont ensuite été disposés sur un champ stérile afin de procéder à l'extraction de la moelle osseuse.

Deux sites d'extraction ont été déterminés : un au niveau de l'épiphyse et un au niveau de la diaphyse.

A l'aide d'instruments préalablement décontaminés comme expliqué dans le protocole de décontamination des instruments, la surface des fémurs a été grattée au niveau des deux sites d'extraction afin d'éliminer tout risque de contamination externe au cas où il y aurait des diatomées à la surface des fémurs.

Les fémurs ont ensuite été rincés à l'eau distillée puis les instruments ont été changés afin de découper une fenêtre osseuse (disque diamanté) au niveau des 2 sites prédéfinis pour accéder à la moelle osseuse.

Une fois la fenêtre osseuse réalisée, la moelle osseuse a été prélevée à l'aide de curettes décontaminées puis disposée dans les tubes à essai (figure 11).

De l'eau distillée a été ajoutée sur ces échantillons en attendant le protocole de digestion.



**Figure 11:** Étapes du protocole d'extraction de la moelle osseuse sur les fémurs de porc (source : Jennifer Bertin)



### c. Protocole d'extraction de la pulpe dentaire

Les dents ont été retirées de l'aquarium aux différents temps d'immersion précédemment énumérés.

Ces dernières ont ensuite été disposées sur un champ stérile afin de procéder à l'extraction de la pulpe dentaire.

A l'aide d'une pièce à main et d'un disque diamanté, préalablement décontaminé, la surface des dents a été « grattée » de manière à éliminer la couche d'émail et de ciment. De même que pour les os animaux, cette technique permet d'éviter toute contamination externe, lors de l'ouverture des dents, dans le cas où des diatomées seraient présentes à la surface du ciment.

Puis les dents ont été rincées à l'eau distillée.

Par la suite, un autre disque, coupant, a été utilisé afin de séparer la couronne de la racine dans le sens horizontal.

Une fois cette séparation effectuée, la racine a été découpée en deux parties jusqu'aux deux tiers dans le sens longitudinal.

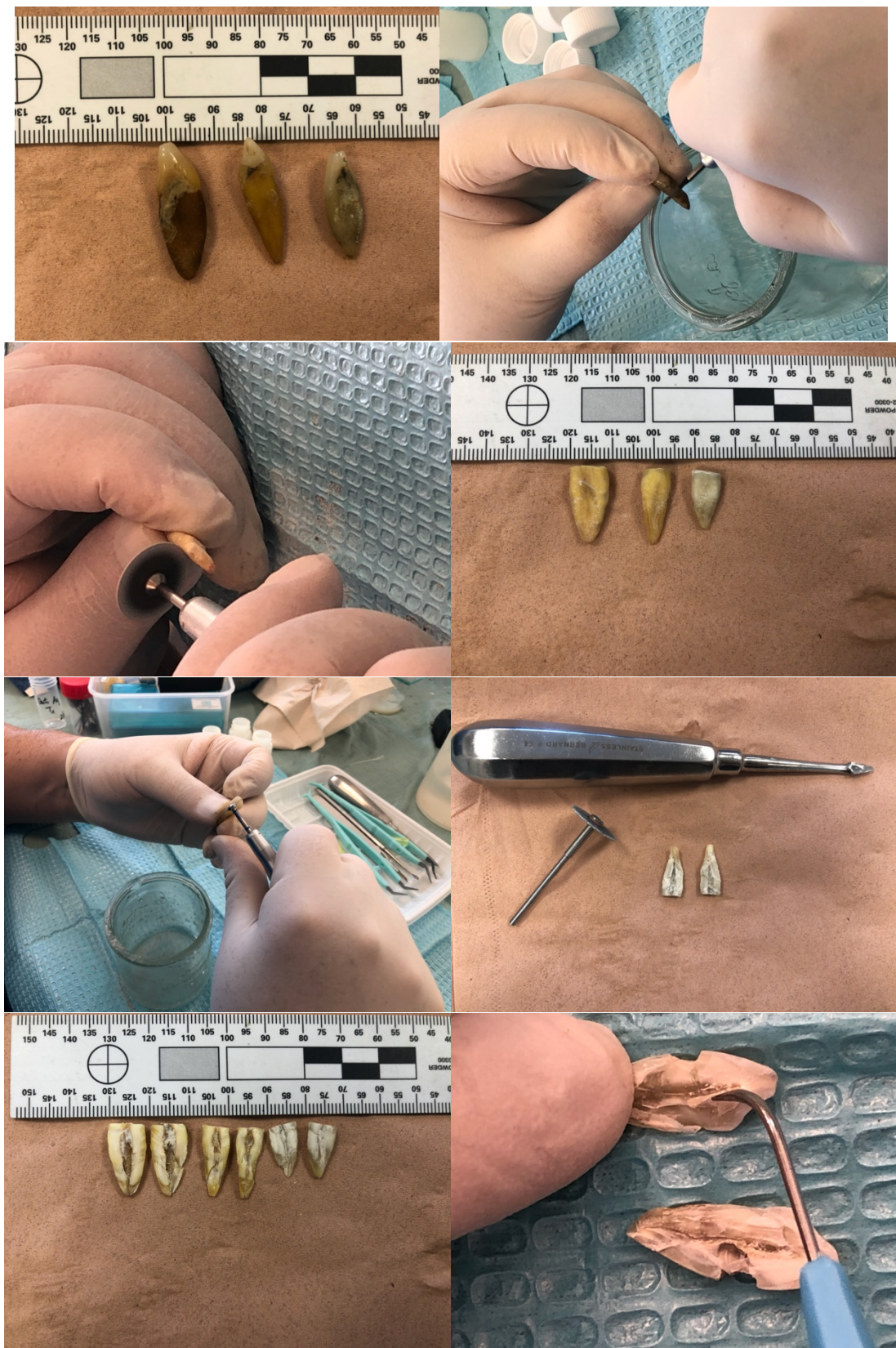
Enfin, un élévateur a été utilisé afin de séparer les deux parties de la racine contenant chacune du tissu pulpaire.

Les racines ainsi désolidarisées ont ensuite été disposées dans les tubes à essai avec de l'eau distillée pour éviter que la pulpe ne sèche en attendant le protocole de digestion.

### Matériels utilisés



**Figure 12:** Matériels utilisés pour le protocole d'extraction de la pulpe dentaire : micromoteur, pièce à main et disques (diamanté et coupant) (en haut); Élévateur préalablement affûté (en bas) (source : Jennifer Bertin)



**Figure 13:** *Étapes du protocole d'extraction de la moelle osseuse sur les fémurs de porc (source : Jennifer Bertin)*



#### d. Digestion et coloration des diatomées

Au cours de cette expérience, le protocole de digestion et de coloration des diatomées que nous avons mis en application provient des différents travaux préalablement réalisés au cours de ces dernières années et que nous avons précédemment détaillé. Nous avons cependant légèrement modifié l'organisation du protocole de digestion. En effet, au lieu d'ajouter directement l'acide chlorhydrique, l'eau oxygénée est ajoutée en premier et chauffée au bain marie.

##### Protocole de digestion et coloration des diatomées

- 1) Pour les échantillons de moelle osseuse, la première étape consiste à faire chauffer le tube de prélèvement au bain marie pendant quelques minutes afin de dissoudre la graisse déposée sur les parois

Cette première étape est absente dans le cas de la pulpe dentaire.

- 2) Le surnageant (eau distillée) présent dans le tube à essai de prélèvement est retiré à l'aide d'une pipette
- 3) L'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) à 30% est ensuite ajoutée dans les tubes à essai de même volume que le volume initial du surnageant précédemment retiré
- 4) Les tubes contenant l'eau oxygénée sont ensuite chauffés au bain marie jusqu'à ce que l'effervescence s'arrête soit environ 4 heures



**Figure 14:** Étape du mélange prélèvement - l'eau oxygénée chauffée bain marie et présence de l'effervescence en cours au centre du bécher (source : Jennifer Bertin)

- 5) Une fois l'effervescence stoppée, les tubes à essai sont retirés du bain marie et on laisse en décantation pendant 24h
- 6) Après la décantation, le surnageant est retiré à l'aide d'une pipette puis de l'eau distillée est ajoutée de même volume que le volume initial d'eau oxygénée.

- 7) Une nouvelle décantation pendant 24h est nécessaire après cette étape. Cette opération est répétée jusqu'à obtention d'un pH neutre.
- 8) Une fois le pH neutre obtenu, le surnageant est retiré et de l'acide chlorhydrique (HCl) à 10% est ajouté de même volume que le volume initial.
- 9) Décantation pendant 24h
- 10) Le surnageant est une nouvelle fois retiré mais contrairement aux précédents protocoles mis en place et effectués dans les anciens travaux, cette étape n'est pas réalisée jusqu'à l'obtention d'un pH neutre. Nous avons décidé d'ajouter de l'hydroxyde de sodium NaOH (base) afin de neutraliser plus rapidement l'acidité provoqué par le HCl.
- 11) Décantation pendant 24h
- 12) Vérification du pH neutre. Si à ce stade le pH est neutre on passe à l'étape de la coloration. En revanche si le pH est encore acide, on renouvelle les étapes 10 et 11.
- 13) Coloration au bleu de méthylène (3g/125 ml dans un flacon soit 24g dans chaque échantillon) : 4 gouttes sont ajoutées dans les tubes à essai. Bien agiter puis laisser décanter pendant 24h.

Une fois toutes ces étapes réalisées, on peut passer à la réaliser des lames qui nous permettront l'observation au microscope.

Nous avons décidé de réaliser 4 lames pour chaque échantillon soit 48 lames pour la moelle osseuse et 28 lames pour la pulpe dentaire. Deux autres lames sont réalisées afin d'établir un échantillonnage des différentes espèces de diatomées présentes dans l'aquarium.

- 1) Les lames et lamelles sont préalablement disposée sur un champ stérile. Les pipettes de prélèvement décontaminées, sont également préparées et disposées sur le champ stérile.
- 2) A l'aide de la pipette, nous effectuons un prélèvement de quelques gouttes au fond de chaque échantillon puis on les disperse sur une lamelle.



**Figure 15:** Prélèvement de quelques gouttes de l'échantillon au fond du tube à essai (source : Jennifer Bertin)

- 3) La lamelle est ensuite disposée sur une plaque chauffante afin d'évaporer le surplus d'eau.



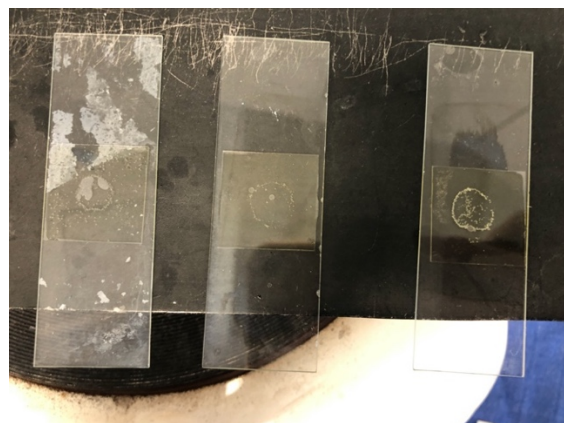
**Figure 16:** Évaporation de l'excédent d'eau (source : Jennifer Bertin)

- 4) Une fois la lamelle sèche, une résine de fixation, le Naphrax®, est mise en place sur les lames de microscope. Puis la lamelle est disposée sur ce fixateur.



**Figure 17:** Naphrax (fixateur) déposé sur la lame de microscope (source : Jennifer Bertin)

- 5) On remet une nouvelle fois le couple lame-lamelle sur la plaque chauffante quelques secondes afin de bien répartir le Naphrax.



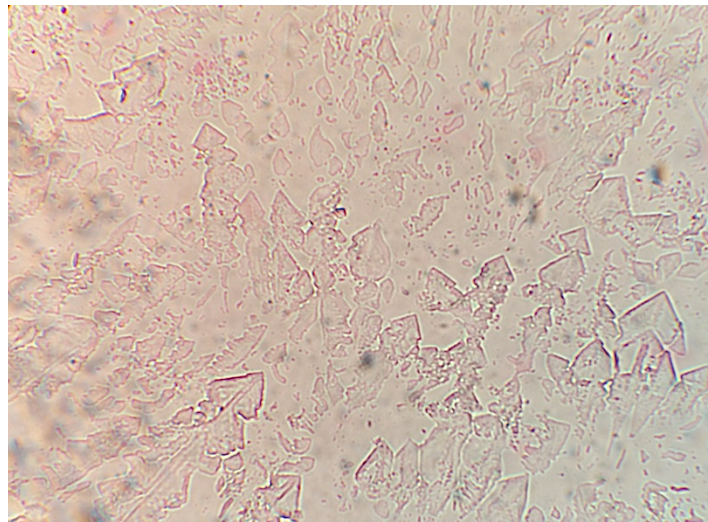
**Figure 18:** Répartition du fixateur à l'aide de la chaleur (source : Jennifer Bertin)

- 6) Une fois la lame retirée de la plaque chauffante, une compression au centre de la lamelle est réalisée le temps que cette dernière colle à la lame. Les excès sont nettoyés et la numérotation de chaque lame est effectuée.
- 7) L'observation au microscope peut alors commencer.

**e. Difficultés rencontrées au cours du protocole de digestion des diatomées**

Étant donné que l'étape de l'ajout de NaOH afin de neutraliser l'acidité des échantillons était une nouvelle expérience, nous avons préféré réaliser ce traitement sur seulement quelques échantillons au début afin d'observer le résultat.

Lors de l'observation au microscope, nous avons remarqué la présence de très nombreux cristaux de chlorure de sodium empêchant la lecture correcte des lames. Nous en avons donc déduit que les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{OH}^-$  avait précipité avec ceux de HCl et ainsi formés ces cristaux de chlorure de sodium NaCl et de l'eau  $\text{H}_2\text{O}$ .



***Figure 19:*** Cristaux de NaCl observés au microscope en objectif x40 sur lame T0 Diaphyse après protocole initial (source : Jennifer Bertin)

Afin d'éliminer ces cristaux de sel dans les échantillons traités par NaOH, le surnageant a été retiré puis nous avons ajouté de l'eau distillée afin de diluer le mélange obtenu. Une décantation de 24h est ensuite nécessaire.

Après ces 24h de décantation, une nouvelle lame est réalisée afin de vérifier le résultat. Les cristaux de NaCl sont encore présents mais en plus petite quantité.



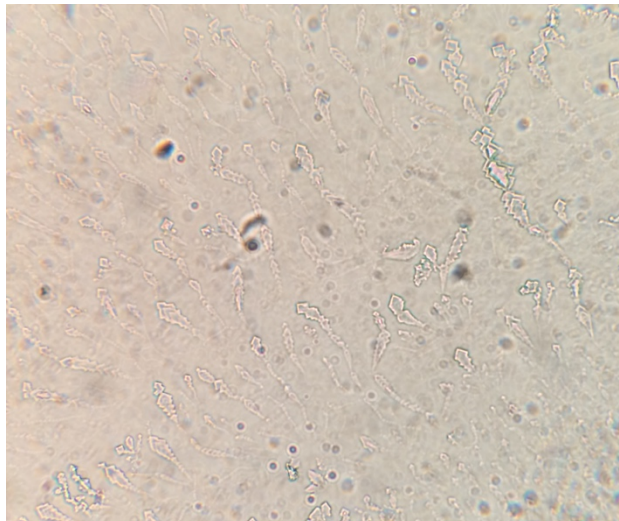


**Figure 20:** Cristaux de NaCl en plus faible proportion observés au microscope en objectif x40 sur lame T0 Diaphyse après ajout de HCl et décantation pendant 24h (source : Jennifer Bertin)

Une nouvelle dilution (HCl) – décantation (24h) est mise en place.

De nouvelles lames sont réalisées.

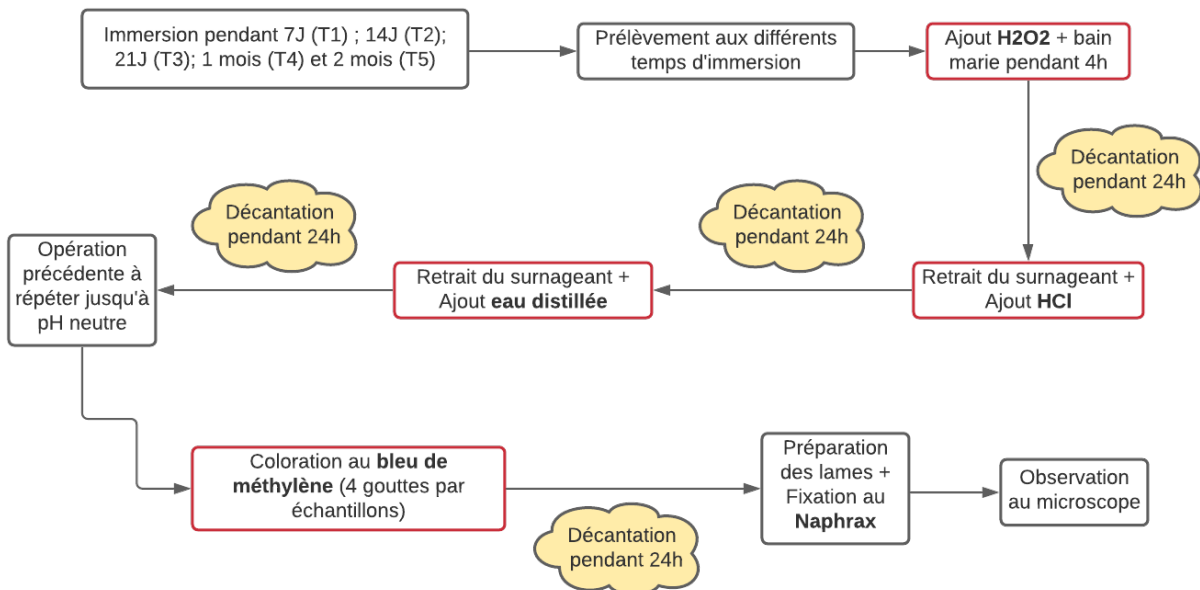
**Résultat :** cette fois-ci les cristaux ont quasiment disparu des échantillons traités par l'hydroxyde sodium. Il faudra donc réaliser deux dilutions – décantation pour les échantillons de T0 qui avaient reçu un traitement de neutralisation par NaOH.



**Figure 21:** Cristaux de NaCl quasiment disparus observés au microscope en objectif x40 sur lame T0 Diaphyse après une deuxième dilution avec HCl et nouvelle décantation pendant 24h (source : Jennifer Bertin)

Cette étape de neutralisation des ions HCl par l'ajout de NaOH est donc abandonnée au profit de celle de l'ancien protocole consistant à retirer le surnageant d'hypochlorite de sodium des échantillons et de réaliser au minimum deux dilutions à l'eau distillée – décantations de 24h afin d'obtenir un pH neutre et l'absence de cristaux d'hydroxyde de sodium sur les lames.

## f. Protocole synthétisé








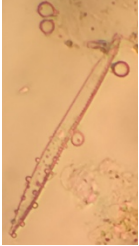




**Figure 22:** Organigramme protocole de digestion et coloration des diatomées (source : Jennifer Bertin)

### III. Résultats

#### 1. Aquarium

Un prélèvement d'eau de l'aquarium, préalablement enrichi en diatomée, a été réalisé puis traité avec le même protocole précédemment énoncé.

Nous avons réalisé plusieurs lames afin d'établir un catalogue des diatomées présentes dans l'aquarium à l'instant T.

Hantzschia-amphioxys	Navicula	Craticula	Eunotia pectinalis		
					
	Cymatopleura elliptica	Cocconeis	Gomphonema	Cymbella	
					

**Tableau 3:** Cartographie des espèces de diatomées retrouvées dans l'échantillons d'eau d'aquarium (source : Jennifer Bertin)

## 2. Os immergés dans l'aquarium

Après traitement de nos échantillons, 48 lames fixées au Naphrax ont été réalisées puis observées au microscope afin de réaliser un comptage des diatomées présentes ainsi qu'un recensement de ces dernières.

Temps	Localisation	Lames	Nombre de diatomées
T0	E	T0E1	2
		T0E2	1
		T0E3	1
		T0E4	0
	D	T0D1	6
		T0D2	0
		T0D3	14
		T0D4	18
T1	E	T1E1	2
		T1E2	0
		T1E3	0
		T1E4	1
	D	T1D1	0
		T1D2	0
		T1D3	1
		T1D4	0
T2	E	T2E1	0
		T2E2	0
		T2E3	0
		T2E4	0
	D	T2D1	0
		T2D2	0
		T2D3	0
		T2D4	0
T3	E	T3E1	0
		T3E2	0
		T3E3	0
		T3E4	0
	D	T3D1	43
		T3D2	41
		T3D3	56
		T3D4	42
T4	E	T4E1	0
		T4E2	0
		T4E3	6
		T4E4	0
	D	T4D1	244
		T4D2	158
		T4D3	76
		T4D4	38
T5	E	T5E1	1538
		T5E2	809
		T5E3	379
		T5E4	47
	D	T5D1	1
		T5D2	5
		T5D3	0
		T5D4	0

**Tableau 4:** Comptage des diatomées à T0, T1, T2, T3, T4 et T5 (source : Jennifer Bertin)

A T0, on note la présence de quelques diatomées sur les lames analysées. Or, ce sont des échantillons de moelle osseuse qui n'ont pas été immergés dans l'aquarium mais prélevés directement à l'état frais.

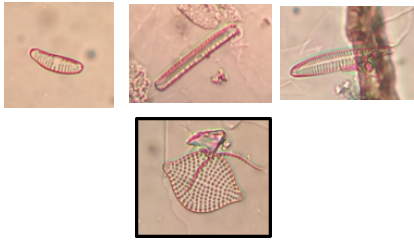



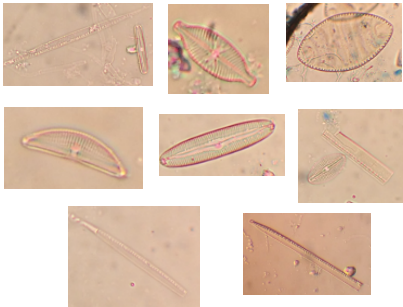




A T1 et T2, seulement 4 diatomées sont retrouvées sur les lames, épiphyses et diaphyses confondues.

A T3 en revanche, on note une forte augmentation du nombre de diatomées, uniquement recensées dans les diaphyses. Les espèces retrouvées sont semblables à celles que l'on a cartographié dans l'aquarium.

A T4, après 1 mois d'immersion, on retrouve un résultat semblable à celui de T3 (3 semaines) avec cependant une proportion encore plus élevée de diatomées dans les diaphyses et 6 diatomées retrouvées dans les épiphyses, qui étaient absentes à T1, T2 et T3.

A T5, après 2 mois d'immersion dans l'aquarium, on observe une inversion des résultats avec un nombre de diatomées extrêmement élevé cette fois-ci dans les épiphyses et très peu dans les diaphyses.

Les espèces retrouvées sont semblables à celles que l'on a répertorié dans l'aquarium excepté à T0 au niveau des épiphyses où une espèce différente de *Cymatopleura elliptica* a été répertorié (tableau 5).

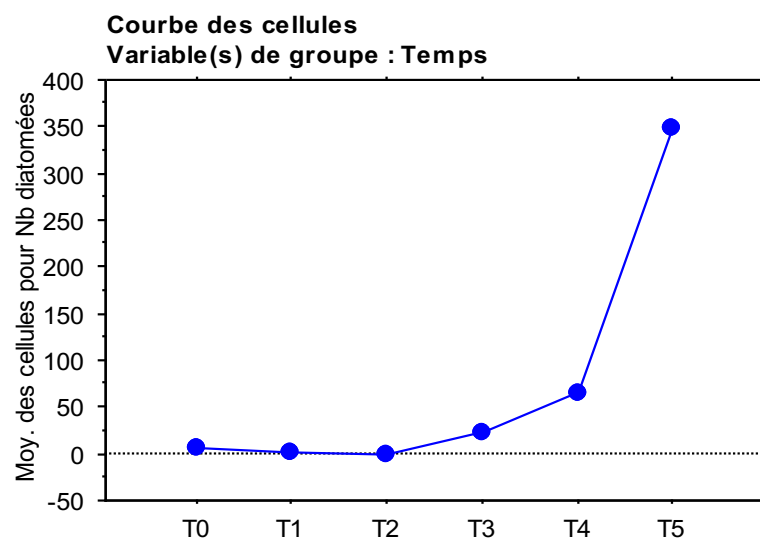
Temps	Localisation	Type de diatomées	Observations microscope
T0	E	Cymbella / Eunotia / Gomphonema / Cymatopleura elliptica	
	D	Navicula / Cymatopleura elliptica / Craticula / Sirirella / Eunotia pectinalis / Cymbella tumida / Caloneis / fragments	
T1	E	Craticula / Coconeis	
	D	Eunotia pectinalis	
T3	D	Caloneis silicula / Gyrosigma / Craticula / Cymbella Tumida / Navicula / Eunotia pectinalis / Cymatopleura elliptica / Coconeis	
T4	E	Navicula / Fragments	
	D	Craticula / Hantzschia-amphioxys / Navicula / Coconeis / Cymbella / Eunotia / Fragments	
T5	E	Craticula / Navicula / Eunotia / Coconeis / Cymatopleura elliptica / Cymbella / Fragments	
	D	Craticula / Cyclotella / Sirirella	

**Tableau 5:** Catalogue des différentes espèces de diatomées recensées aux différents temps d'immersion (source : Jennifer Bertin)

Au vu de ce comptage et après analyses des tableaux, nous avons pu extraire différentes données intéressantes.

Comme le démontre le graphique, ci-après, on note qu'il y a une augmentation progressive et significative du nombre de diatomées en fonction du temps d'immersion.

Il y a donc bien une diffusion passive après un certain temps d'immersion. Au vu de nos résultats, cette diffusion devient certaine à partir de 3 semaines d'immersion (T3 sur le graphique).



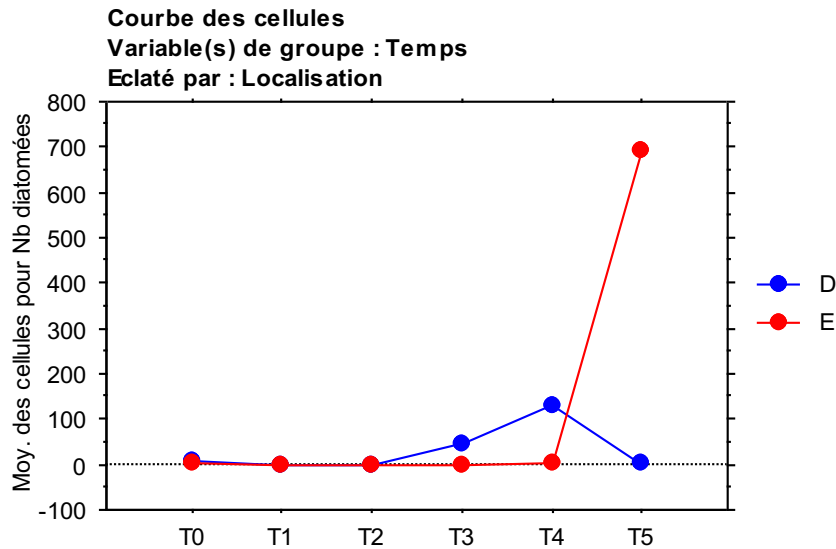
**Figure 23:** Courbe prouvant la corrélation entre le nombre de diatomées recensées et le temps d'immersion dans l'aquarium (source : Jennifer Bertin)

Il existe ainsi un lien significatif entre le nombre de diatomées recensées et le temps d'immersion avec  $p < 0,05$  démontré à l'aide d'un test univarié.

Comme vu précédemment dans les tableaux, le nombre de diatomées recensées évolue considérablement entre les diaphyses et les épiphyses au cours du temps.

En effet, nous passons d'une majorité de diatomées dans les diaphyses à T3 et T4 à une minorité de ces dernières à T5 au profit des épiphyses.

Nous avons donc voulu savoir si une corrélation existait entre le temps d'immersion et la présence des diatomées dans les diaphyses et épiphyses (figure 24).



**Figure 24:** Courbe du nombre de diatomées présentes dans les épiphyses et diaphyses en fonction du temps d'immersion (source : Jennifer Bertin)

Le graphique permet de mettre en évidence que la présence des diatomées dans les épiphyses et les diaphyses ne suit pas d'ordre logique.

On constate que les diatomées sont présentes dans les épiphyses et diaphyses indépendamment du temps d'immersion contrairement à nos suppositions de départ.

En effet, nous avons émis l'hypothèse que le nombre de diatomées serait plus élevé dans les épiphyses durant les premiers temps d'immersion (T0 à T3) dû à la présence des trous nourriciers puis que la tendance s'inverserait à T4 et T5.

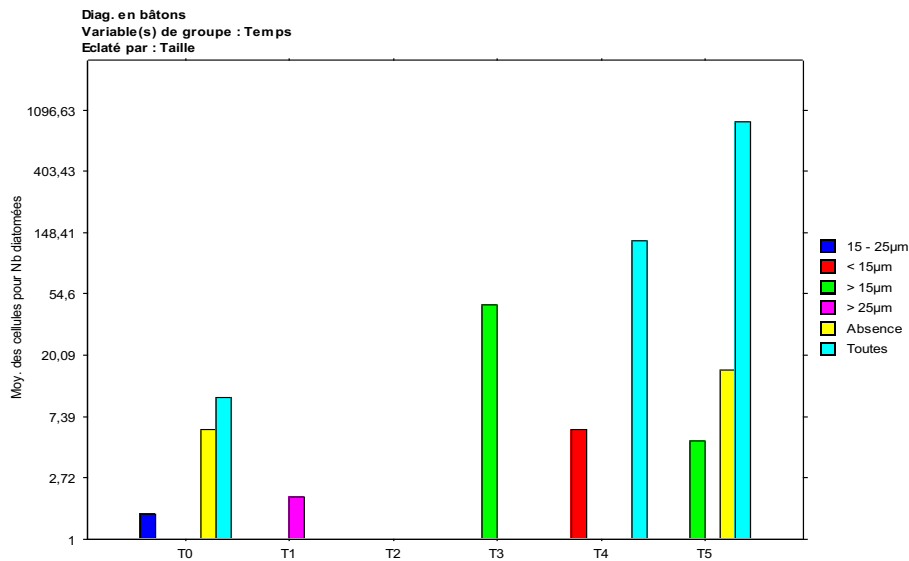
Nous pouvons donc en conclure qu'il n'y a pas de corrélation entre le temps d'immersion et le nombre de diatomées dans les épiphyses et diaphyses. En effet, tout comme le reste des organes mous, la moelle osseuse se putréfie, se liquéfie au fur et à mesure du temps que le corps reste immergé, La moelle osseuse des épiphyses se retrouverait donc mélangée avec celle des diaphyses.

En résumé, pour un corps retrouvé avec un état de putréfaction plus ou moins avancé, le prélèvement de moelle osseuse pourrait être réalisé indifféremment dans les épiphyses ou la diaphyse du fémur du fait de la diffusion passive engendré par la putréfaction, ainsi que par les potentiels phénomènes de charriage du corps dans l'eau.



Autre élément que nous avons voulu mettre en évidence est la corrélation entre la taille des cellules de diatomées et le temps d'immersion. En effet, de nombreuses espèces de diatomées sont recensées dans les différents tableaux, mais y-a-t-il un lien entre les espèces présentes et le temps d'immersion ?

Notre hypothèse de départ était que les plus petites diatomées seraient les premières à diffuser au sein de la moelle osseuse.



**Figure 25:** Diagramme en bâtonnet de la taille des cellules de diatomées en fonction du temps d'immersion (source: Jennifer Bertin)

Dans ce diagramme, différentes tailles de cellules sont représentées. Lors de notre analyse des diatomées présentes dans l'aquarium ainsi que celles retrouvées aux différents temps d'immersion, nous avons pu répartir les diatomées selon leur taille comme suit :

- < 15 µm : navicula
- De 15 à 25 µm : Coconeis, cymbella, nistzichia, eurotia, surirella
- > 25 µm : craticula, gomphonema, gyrosigma, cymatopleura, caloneis

Cette analyse était intéressante à réaliser, cependant, comme le montre le graphique, des diatomées de toutes tailles sont présentes aux différents temps d'immersion. Il n'y a donc pas de corrélation entre la taille des différentes cellules de diatomées et les différents temps d'immersion.

### 3. Dents de noyés et dents immergées dans l'aquarium

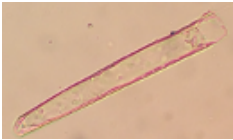
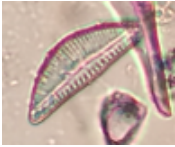
Concernant l'évaluation de la diffusion passive au niveau des dents, après traitement de nos échantillons, 28 lames ont été réalisées puis observées au microscope afin de compter et d'identifier les diatomées présentes.

Temps	Localisation	Lames	Nombre de diatomées
T0	Pulpe	D0-1	1
		D0-2	0
		D0-3	0
		D0-4	0
T1		D1-1	0
		D1-2	0
		D1-3	0
		D1-4	0
T2		D2-1	0
		D2-2	0
		D2-3	0
		D2-4	0
T3		D3-1	0
		D3-2	0
		D3-3	0
		D3-4	1
T4		D4-1	0
		D4-2	0
		D4-3	0
		D4-4	0
T5		D5-1	0
		D5-2	0
		D5-3	0
		D5-4	0
Tinconnu		Dnoyé 1	1
		Dnoyé 2	0
		Dnoyé 3	0
		Dnoyé 4	0

**Tableau 6:** Comptage des diatomées recensées dans la pulpe dentaire à T0, T1, T2, T3, T4, T5 et dans un échantillon de dents de noyés (source : Jennifer Bertin)

Ce tableau permet de mettre en évidence une absence de diatomées dans la plupart des lames analysées. Seulement 2 diatomées pour 24 dents immergées ont été recensées ce qui est très intéressant et encourageant dans notre hypothèse de départ.

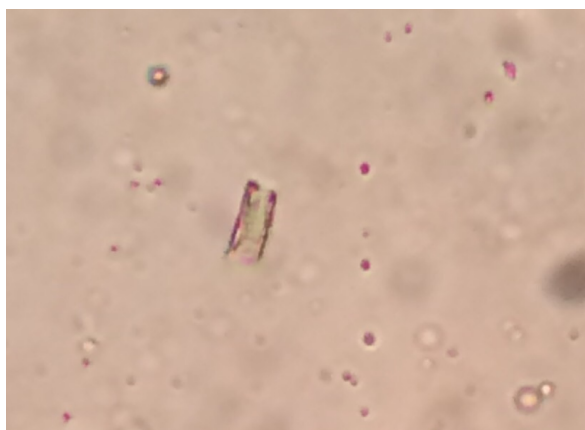
Cependant, notre taille d'échantillon étant relativement peu importante notamment en ce qui concerne les dents de noyés, les données analysées ci-dessus ne nous ont pas permis de conclure de manière significative à l'absence de diffusion passive dans les dents.

Temps	Localisation	Type de diatomées	Observations microscope
T0	Pulpe	Fragments eunotia pectinalis	
T3		Cymbella Tumida	

**Tableau 7:** *Catalogue des diatomées recensées au niveau de la pulpe à T0 et T3 (source : Jennifer Bertin)*

Les deux diatomées retrouvées au niveau de la pulpe dentaire à T0 et T3 sont semblables aux espèces de diatomées présentes au sein de l'aquarium. Le fragment d'Eunotia pectinalis à T0, donc dents non immergées, peut amener à penser à une potentielle contamination externe.

Sur nos quatre lames réalisées à partir de deux dents de noyés, nous avons détecté un fragment d'une diatomée en face connective non identifiable.



**Figure 26:** *Fragment de diatomée en face connective répertorié sur la lame Dnoyé 1 (source : Jennifer Bertin)*

## IV. Discussion

Les résultats obtenus sur les échantillons de moelle osseuse de porc nous orientent vers la présence d'une diffusion passive après un certain temps d'immersion, et ce malgré la présence de quelques incohérences de résultats, notamment à T0.

A l'inverse, pour les échantillons de dents immergées dans l'aquarium et celles extraites sur des cadavres de noyés lors d'une autopsie, les résultats sont encourageants mais restent non significatifs compte tenu du petit nombre de dents testées dans notre étude.

### 1. Faux positifs

Pour nos expérimentations, nous avons respecté un protocole de décontamination des instruments très strict par trempage pendant minimum 15 jours dans un mélange de soude et d'eau distillée.

Malgré cela, quelques espèces de diatomées ont été retrouvées dans nos échantillons de moelle osseuse à T0, échantillons qui n'ont pas subi d'immersion.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats.

#### a. Protocole de digestion

Les échantillons de T0 sont également ceux que nous avons utilisé pour tester notre nouveau protocole de digestion par ajout de NaOH durant l'une des étapes de digestion afin de neutraliser l'acidité provoqué par HCl. Comme expliqué précédemment, cet ajout de NaOH a entraîné la formation de cristaux de sel NaCl. Ces cristaux nous empêchant d'analyser les lames au microscope de manière claire et précise, nous avons tenté de les éliminer avec de nouvelles étapes de dilution avec HCl et décantation de 24 heures. Deux étapes de dilution-décantation ont été nécessaires.

La multiplication du nombre d'étape de digestion, malgré la décontamination de nos instruments à chaque nouvelle dilution-décantation, a très probablement multiplié aussi le risque de contamination et pourrait expliquer la présence de diatomées à T0.

Nous avons en effet choisi d'utiliser la méthode de la digestion acide, méthode la plus simple et abordable à mettre en application mais également celle entraînant le plus de risque de contaminations du fait des nombreuses manipulations des échantillons.

Pour pallier ce problème, de nouvelles techniques de digestion ont vu le jour ces dernières années.

Parmi ces nouveaux procédés, la digestion enzymatique avec la protéinase K donne des résultats prometteurs comme l'ont démontré les équipes de Takeichi et Al. (36) ainsi que celles de Ming et Al. (37). Leurs conclusions sont que la protéinase K est la méthode de digestion la plus appropriée car permettant de récupérer le plus grand nombre de diatomées et applicable à la fois en eau douce et en salée contrairement au Soluène 350 qui ne peut être utilisé sur les diatomées salines.

De plus, l'étude de Takeishi soulève une donnée intéressante : les tissus pulmonaires digérés par la protéinase K avaient préalablement été fixés au formol limitant fortement le risque de contamination et permettant de pouvoir conserver les tissus plus longtemps tout en obtenant un résultat supérieur aux tissus non fixés.

Cependant, cette technique bien que très efficace est aussi la plus coûteuse.

Une étude récente de Marezza et Al. (38) a permis de mettre en évidence un procédé tout aussi efficace et beaucoup moins coûteux. L'utilisation de peroxyde d'hydrogène chauffé se révèle être une technique beaucoup plus efficace en termes de réduction des sédiments organiques et d'extraction mais également au niveau de la préservation des diatomées que la technique de digestion acides telle qu'utilisée dans notre étude. Il serait donc intéressant à l'avenir de tester ce protocole.

## **b. Alimentation et vie ante-mortem**

Autre hypothèse sur la possibilité des faux positifs à T0, proviendrait de l'alimentation donnée aux porcs. En effet, comme déjà évoqué, les diatomées peuvent être retrouvées de manière naturelle chez les êtres humains consommant régulièrement du poisson ou vivant proche de la mer et des océans, causant des biais possibles lors des autopsies de personnes noyées.

En regardant de plus près l'alimentation donnée aux porcs ainsi que sa composition (39), on remarque notamment la présence de farine de poisson ainsi qu'un grand nombre de céréales. La farine de poisson étant une source possible de diatomées.

Une contamination ante mortem par les diatomées à travers l'alimentation a donc pu être possible au même titre que les êtres humains et donc une possible source de biais dans notre analyse, tout temps d'immersion confondu. La présence d'une espèce de *Cymatopleura elliptica* différente des autres uniquement à T0 corrobore cette hypothèse et proviendrait très probablement d'une contamination ante mortem.

## **2. Faux négatifs**

De nombreuses lames au cours des différents temps d'immersion se sont retrouvées indemnes de toutes diatomées dans les échantillons de moelle osseuse et de pulpe dentaire.

Pour la pulpe dentaire, cela nous conforte dans l'idée qu'il y aurait bien une absence de diffusion passive par les apex.

Pour la moelle osseuse, les échantillons indemnes de diatomées sont essentiellement les prélèvements de T1 et T2. Cela paraît logique car on a vu que la putréfaction de la moelle osseuse et donc la diffusion passive surviendrait au bout de quelques semaines (3 semaines au vu de nos résultats).

Cependant, on peut se demander si d'autres biais ne surviennent pas au cours de l'élaboration des lames et de l'observation microscopique.

Lors du prélèvement des échantillons pour la confection des lames, nous utilisons une micropipette de 12µl ce qui représente environ 2 gouttes. Lorsque nous prélevons au fond de notre tube à essai, seulement 2 gouttes sont prélevées. On ne peut donc pas pipeter tous les dépôts présents au fond de nos tubes.

De plus, lors des prélèvements dans les tubes à essai de moelle osseuse, de la graisse agglomérée était présente en surface et sur les parois. Des diatomées peuvent être présentes à l'intérieur de ces amas graisseux et donc non prélevées. Une digestion à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chauffé permettrait de libérer les diatomées de la graisse mais le surnageant n'a pas été testé dans notre étude. Ainsi, une marge d'erreur existe lors du prélèvement et peuvent entraîner un diagnostic de faux négatif.

Autre point important, lors de l'observation au microscope nous pouvons passer à côté d'une diatomée. En effet, le comptage est réalisé à l'œil humain et même avec un œil très averti, nous pouvons en oublier lors de notre observation. Le facteur humain est très important à prendre en considération.

De plus, en fonction de la clarté de la lame qui peut être altérée par des dépôts, cristaux, ou autres artefacts, cela complique la lecture des lames et augmente la difficulté d'observation pour l'œil humain.

Une notion de valeur seuil à partir de laquelle le test serait considéré comme positif est décrite dans de nombreux articles. Cependant, aucuns des auteurs n'est d'accord sur cette valeur. Nous avons donc décidé dans le cadre de notre recherche que la présence d'une diatomée entraînait un test positif.

Pour pallier ce facteur humain, la mise au point d'une méthode de comptage informatique serait une piste intéressante à explorer. Yuanyuan Zhou et Al. (40) se sont penchés sur cette question du facteur humain dans l'analyse des lames histologiques au microscope, méthode longue et laborieuse. Ils ont notamment mis au point un procédé utilisant l'intelligence artificielle afin de repérer les diatomées sur les lames. Leurs résultats sont très prometteurs pour l'avenir.

### 3. Échantillonnage

Nous avons réalisé au total 48 lames pour notre expérience sur la moelle osseuse de porc. Un grand nombre d'échantillons qui nous a permis d'analyser les résultats obtenus de manière significative et de mettre en évidence la présence d'une diffusion passive dans la moelle osseuse au même titre que celle s'effectuant au niveau des reins, cœur, foie, poumons.

En revanche, en ce qui concerne l'étude sur la pulpe dentaire, notre taille d'échantillon n'était pas suffisante pour extrapoler de manière significative les résultats obtenus.

Notre analyse reste cependant très encourageante car un nombre infime de diatomées a été recensées.

De plus, on ce qui concerne l'analyse des deux dents de noyés, ne nous possédions aucunes données sur les individus, ni sur leur mode de vie, de noyade et de découverte du corps. Il serait intéressant de réitérer cette expérience en connaissant ces modalités et peut-être de prélever un nombre de dent plus important afin d'obtenir une quantité de pulpe supérieure et potentiellement une analyse plus significative.

Ces résultats ne permettent donc pas d'affirmer ou d'infirmer avec précision l'absence de diffusion passive dans la pulpe dentaire mais reste très encourageant pour l'avenir. Cette même expérience avec une taille d'échantillon beaucoup plus importante serait intéressante à réaliser.

#### **4. Résultats et perspectives**

Nous sommes partis du principe au début de nos expérimentations, qu'il y aurait une diffusion passive dans la moelle osseuse de porc mais une absence de diffusion passive dans la pulpe dentaire des dents immergées dans l'aquarium et de noyés.

Nos résultats ont donc mise en évidence une diffusion passive très nette dans la moelle osseuse de porc.

Résultats qui semblent logiques lorsque l'on s'intéresse au phénomène de putréfaction qui survient systématiquement chez toutes personnes retrouvées immergées mais qui reste très controversé dans le monde de la médecine légale.

En effet, le prélèvement de moelle osseuse est considéré, encore à l'heure actuelle, comme l'élément essentiel du diagnostic de mort par noyade.

Plusieurs études récentes réalisées par Coelho et Al(30) et DiGiancamillo (19) ont notamment montré une diffusion passive avérée dans les tissus mous (reins, foie, poumons, estomac) mais pas dans la moelle osseuse car celle-ci n'a pas été testé. Dans leurs expériences, le test de la diatomée sur la moelle osseuse n'est pas remis en cause. Or, dans notre étude nous venons de démontrer le contraire.

Notre étude s'étant portée sur les os de porcs pour un souci éthique et logistique, il serait intéressant d'effectuer cette même expérience sur des fémurs humains. De plus, une alternative du test de la diatomée sur fémurs comme nous l'avons envisagé dans le cadre de notre analyse sur des dents humaines doit être explorée plus en profondeur car les analyses sur moelle osseuse sont aléatoires et non reproductibles de manière fiable.

C'est ce questionnement sur une alternative au test de la diatomée sur fémurs qui nous a orienté vers la pulpe dentaire. Notre hypothèse était qu'il ne pouvait y avoir de diffusion passive au niveau des dents car protégées par l'os alvéolaire et vascularisées par un réseau veineux, certes très grand mais avec un diamètre très faible en comparaison aux trous nourriciers des fémurs.

L'étude réalisée par Emile Hourqueig (15) sur mâchoires d'agneau (avec les dents) immergées dans l'aquarium ainsi que celle réalisée par Jane Gourgues (3) sur des dents extraites de cadavres de personnes mortes noyées nous ont conforté dans l'idée d'effectuer une étude un peu plus poussée sur la pulpe dentaire.

Notre étude, bien que très encourageante en termes de résultats obtenus, doit être approfondie avec un nombre d'échantillons beaucoup plus important afin de pouvoir affirmer avec certitude une absence de diffusion passive des diatomées et donner ainsi une alternative significative au test de la diatomée sur fémurs. La taille de l'échantillon de dents extraites sur un individu noyé devra être déterminée afin d'obtenir une quantité de pulpe suffisante pour des résultats significatifs.

Il serait aussi judicieux de comparer des échantillons de moelle osseuse de fémurs, pulpe dentaire et eau d'immersion où le corps a été découvert sur des victimes présumées de noyade tout en les mettant en corrélation avec éléments recueillis lors de la levée du corps, l'autopsie, identité et histoire de la victime (habitudes alimentaires, mode de vie, travail) afin de déterminer si le diagnostic est fiable ou biaisé.

Enfin, au vu des différentes informations mises en évidence, on peut émettre l'hypothèse qu'en pratique réelle, au cours des autopsies pratiquées lors d'une enquête médico-légale, de nombreux biais et contaminations surviennent.

En effet, dans les instituts médico-légal où sont pratiquées les autopsies, les instruments nécessaires au prélèvement du moelle osseuse dans les fémurs ne sont pas décontaminés de manière efficace dans des mélanges d'eau distillée et de soude, créant ainsi de faux positifs dans les résultats obtenus.

Une méthode stricte de décontamination des instruments et de manipulation doivent être mises en place à l'avenir afin de limiter au maximum les risques de biais et de contaminations externes.



## Conclusion

Le test de la diatomée reste l'élément clé dans le diagnostic positif de mort par noyade. Il est cependant, depuis quelques années, très controversé en raison des nombreux biais et contaminations externes qui peuvent survenir notamment au cours de la décomposition du corps immergés lors de séjours prolongés ainsi que pendant l'étape de prélèvement de la moelle osseuse dans les os longs.

On sait aujourd'hui que la mise en place d'un protocole stricte de décontamination des instruments dans un mélange d'eau distillée et de soude est une des étapes primordiales pour limiter le risque de contaminations lors des manipulations.

Cependant, d'autres sources de contaminations peuvent survenir et ce bien en amont de tout protocole de prélèvement. En effet, la moelle osseuse au même titre que les organes mous (reins, poumons, foie, estomac, cerveau) est concernée par la décomposition progressive du corps lors de séjours prolongés dans l'eau. Elle est perméable par les trous nourriciers de l'os et donc sujette à la diffusion passive des diatomées alors même que toute circulation sanguine est arrêtée depuis longtemps.

Afin de démontrer l'existence de cette diffusion passive et l'inexactitude du test de la diatomée en médecine légale, nous avons établi un protocole d'immersion d'os de porcs dans un aquarium enrichi en diatomées. Différents temps d'immersion ont été décidé et la moelle osseuse prélevée en fonction de ces derniers. Deux sites de prélèvement ont été décidé : un au niveau des épiphyses et l'autre au niveau de diaphyses.

Les résultats de ces expérimentations ont démontré de manière significative la présence d'une diffusion passive dans la moelle osseuse des os de porcs indépendamment du site de prélèvement épiphyses/diaphyses.

L'analyse de l'absence de la diffusion passive sur les dents immergées sans os alvéolaire dans l'aquarium sont très encourageantes et prometteuses. Cependant, la taille de l'échantillon n'étant pas suffisante, notamment pour les dents de noyés, ces résultats restent non extrapolables et significatifs. Il serait judicieux d'effectuer ces analyses sur une taille d'échantillon beaucoup plus importante.

A l'avenir il serait également intéressant de réaliser une analyse par prélèvement simultané de moelle osseuse sur fémurs humains et de dents sur une personne présumée noyée et de les comparer au milieu présumé d'immersion afin d'établir une corrélation et d'établir un diagnostic plus fiable que le test de la diatomée sur fémurs.

En médecine légale, le diagnostic positif de mort par noyade reste très complexe et de nombreux aspects sont encore à explorer et à envisager.

En effet, la méthode de préparation des échantillons par digestion acide est efficace et simple à mettre en application mais source de biais et de contaminations importantes dû au grand nombre de manipulations. De nouvelles techniques par détection de l'ADN des diatomées ou l'utilisation de la protéinase K sont des pistes très intéressantes à envisager.

De même pour la méthode d'observation au microscope et la recherche des diatomées où le facteur humain est prédominant. La détection automatique des diatomées par microscopie électronique, méthode PCR ou encore par comptage informatique grâce à l'intelligence artificielle sont des aspects très prometteurs.

## Table des illustrations

<b>Figure 1:</b> Schéma interne d'une diatomée à raphé (6).....	11
<b>Figure 2:</b> Exemple de diatomées d'eau douce ( <i>Navicula pseudolanceolata</i> ) (8).....	13
<b>Figure 3:</b> Exemple de diatomées marines avec ( <i>Achnanthes javanica</i> ) (8) .....	13
<b>Figure 4:</b> Exemple de diatomées des eaux de bonne qualité (à droite) et de mauvaise qualité (à gauche) (11) .....	14
<b>Figure 5:</b> Schéma physiopathologique des noyades en eau douce et eau salée (14) ..	18
<b>Figure 6:</b> Spume bucco-narinaire (source : Christophe Bou) .....	19
<b>Figure 7:</b> Protocole de digestion de la moelle osseuse et de la pulpe dentaire à l'aide de peroxyde d'hydrogène et d'acide chlorhydrique (source : Hourqueig (15)).....	24
<b>Figure 8:</b> Fémur de porc - Vérification de l'état de surface (source : Jennifer Bertin)	27
<b>Figure 9:</b> Immersion dans l'aquarium enrichi en diatomées des fémurs de porc attachés deux par deux (source : Jennifer Bertin).....	27
<b>Figure 10:</b> Sélection des dents de T0 à T5 (source : Jennifer Bertin).....	28
<b>Figure 11:</b> Étapes du protocole d'extraction de la moelle osseuse sur les fémurs de porc (source : Jennifer Bertin) .....	29
<b>Figure 12:</b> Matériels utilisés pour le protocole d'extraction de la pulpe dentaire : micromoteur, pièce à main et disques (diamanté et coupant) (en haut); Élévateur préalablement affûté (en bas) (source : Jennifer Bertin).....	30
<b>Figure 13:</b> Étapes du protocole d'extraction de la moelle osseuse sur les fémurs de porc (source : Jennifer Bertin) .....	31
<b>Figure 14:</b> Étape du mélange prélèvement - l'eau oxygénée chauffée bain marie et présence de l'effervescence en cours au centre du bécher (source : Jennifer Bertin).....	32
<b>Figure 15:</b> Prélèvement de quelques gouttes de l'échantillon au fond du tube à essai (source : Jennifer Bertin) .....	33
<b>Figure 16:</b> Évaporation de l'excédent d'eau (source : Jennifer Bertin) .....	34
<b>Figure 17:</b> Naphrax (fixateur) déposé sur la lame de microscope (source : Jennifer Bertin) .....	34
<b>Figure 18:</b> Répartition du fixateur à l'aide de la chaleur (source : Jennifer Bertin)....	34
<b>Figure 19:</b> Cristaux de NaCl observés au microscope en objectif x40 sur lame T0 Diaphyse après protocole initial (source : Jennifer Bertin) .....	35
<b>Figure 20:</b> Cristaux de NaCl en plus faible proportion observés au microscope en objectif x40 sur lame T0 Diaphyse après ajout de HCl et décantation pendant 24h (source : Jennifer Bertin) .....	36
<b>Figure 21:</b> Cristaux de NaCl quasiment disparus observés au microscope en objectif x40 sur lame T0 Diaphyse après une deuxième dilution avec HCl et nouvelle décantation pendant 24h (source : Jennifer Bertin).....	36
<b>Figure 22:</b> Organigramme protocole de digestion et coloration des diatomées (source : Jennifer Bertin) .....	37
<b>Figure 23:</b> Courbe prouvant la corrélation entre le nombre de diatomées recensées et le temps d'immersion dans l'aquarium (source : Jennifer Bertin).....	42
<b>Figure 24:</b> Courbe du nombre de diatomées présentes dans les épiphyses et diaphyses en fonction du temps d'immersion (source : Jennifer Bertin).....	43
<b>Figure 25:</b> Diagramme en bâtonnet de la taille des cellules de diatomées en fonction du temps d'immersion (source: Jennifer Bertin) .....	44
<b>Figure 26:</b> Fragment de diatomée en face connective répertorié sur la lame Dnoyé 1 (source : Jennifer Bertin) .....	46

## Table des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Diatomées à symétrie radiale (à gauche) et bilatérale (à droite) (4) .....	11
<b>Tableau 2:</b> Les différentes phases d'une noyade par asphyxie (14) .....	16
<b>Tableau 3:</b> Cartographie des espèces de diatomées retrouvées dans l'échantillons d'eau d'aquarium (source : Jennifer Bertin) .....	38
<b>Tableau 4:</b> Comptage des diatomées à T0, T1, T2, T3, T4 et T5 (source : Jennifer Bertin) .....	39
<b>Tableau 5:</b> Catalogue des différentes espèces de diatomées recensées aux différents temps d'immersion (source : Jennifer Bertin) .....	41
<b>Tableau 6:</b> Comptage des diatomées recensées dans la pulpe dentaire à T0, T1, T2, T3, T4, T5 et dans un échantillon de dents de noyés (source : Jennifer Bertin) .....	45
<b>Tableau 7:</b> Catalogue des diatomées recensées au niveau de la pulpe à T0 et T3 (source : Jennifer Bertin) .....	46

## Bibliographie

1. Lavoie I, Hamilton PB, Campeau S, Grenier M, Dillon PJ. Guide d'identification des diatomées des rivières de l'Est du Canada. Presses de l'Université du Québec. 2008. 241 p.
2. Round FE, Crawford RM, Mann DG. Diatoms: Biology and Morphology of the Genera. Cambridge University Press; 1990. 766 p.
3. 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. 2016.
4. Utilisation des diatomées comme bioindicateurs des milieux lotiques (eaux courantes) - PDF Téléchargement Gratuit [Internet]. Disponible sur: <https://docplayer.fr/73732007-Utilisation-des-diatomees-comme-bioindicateurs-des-milieux-lotiques-eaux-courantes.html>
5. Universalis E. DIATOMÉES . Encyclopædia Universalis. <https://www.universalis.fr/encyclopedie/diatomees/>
6. Microscopies diatomées <http://www.microscopies.com/DOSSIERS/Magazine/Articles/D-VOISIN-Diatomees/Diatomee.htm>
7. Bussard A. Capacités d'acclimatation des diatomées aux contraintes environnementales. :302.
8. www.unitheque.com. Guide des diatomées. Plus de 200 micro-algues siliceuses photographiées. Unithèque. <https://www.unitheque.com/guide-des-diatomees.-plus-200-micro-algues-siliceuses-photographies/les-guides-naturaliste/delachaux-niestle/Livre/8658>
9. Langlois C. DIATOMÉES. 2006.
10. Falaise C. Valorisation des Activités Biologiques de la Diatomée Marine *Haslea ostrearia*. 2019.
11. Naim P. Utilisation des diatomées pour évaluer la qualité d'un cours d'eau. Inst Fr L'éducation Lyon. 2017;
12. Faculté de Médecine de Strasbourg. Noyades.
13. OMS. Rapport Mondial sur la Noyade.
14. Badoux M. Mécanisme de la noyade. 24 mars 2007;
15. Hourqueig E. Diatomées en médecine et odontologie légale. Fiabilité et diffusion passive. 2015.
16. Karmakar RN. Forensic Medicine and Toxicology. Academic publishers. 668 p.
17. Hofmann E. Textbook of Legal Medicine. 1878.
18. Rana A, Manhas S. Significance of Diatoms in Diagnosis of Drowning Deaths: A Review [Internet]. Peer Reviewed Journal of Forensic & Genetic Sciences. 2018. Disponible sur: <https://lupinepublishers.com/index.php>

19. 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.* janv 2010;12(1):13-8.
20. Krstic S, Duma A, Janevska B, Levkov Z, Nikolova K, Noveska M. Diatoms in forensic expertise of drowning--a Macedonian experience. *Forensic Sci Int.* 17 juill 2002;127(3):198-203.
21. 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.
22. Singh Sankhla M, Kumari M, Nandan M, Kumar R. FORENSIC IDENTIFICATIONS OF DROWNING DEATH BY THE USE OF DIATOM ANALYSIS. *Int J Dev Res.* 30 sept 2016;6:9491-3.
23. 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.* 20 juill 2007;170(1):1-7.
24. Stephenson L, Van den Heuvel C, Byard RW. The persistent problem of drowning - A difficult diagnosis with inconclusive tests. *J Forensic Leg Med.* août 2019;66:79-85.
25. Piette MHA, De Letter EA. Drowning: still a difficult autopsy diagnosis. *Forensic Sci Int.* 10 nov 2006;163(1-2):1-9.
26. 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.* sept 2013;15(5):229-34.
27. Masson E. Place de l'anatomie pathologique dans le diagnostic médico-légal d'une noyade. *EM-Consulte.* <https://www.em-consulte.com/article/88909/place-de-l-anatomie-pathologique-dans-le-diagnosti>
28. 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.* 1 janv 1994;107(1):37-41.
29. Verma K. Role of Diatoms in the World of Forensic Science. *J Forensic Res.* 3 juin 2013;4:181-4.
30. 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.* juill 2016;41:58-64.
31. Fucci N. A New Procedure for Diatom Extraction in the Diagnosis of Drowning. *Clin Exp Pharmacol.* 2012;02(01). <https://www.omicsonline.org/a-new-procedure-for-diatom-extraction-in-the-diagnosis-of-drowning-2161-1459.1000110.php?aid=5905>
32. Pollanen MS. Diatoms and homicide. *Forensic Sci Int.* 9 janv 1998;91(1):29-34.
33. Lunetta P, Penttila A, Sajantila A. Circumstances and macropathologic findings in 1590 consecutive cases of bodies found in water. *Am J Forensic Med Pathol.* déc 2002;23(4):371-6.
34. DiGiancamillo A, Domeneghini C, Gibelli D, Cattaneo C. Diatom extraction with HCl

from animal tissues: a technical note. Leg Med Tokyo Jpn. sept 2011;13(5):268-71.

35. Lacaze Saint Jean E. DIATOMEES ET CENTRIFUGATION : EVALUATION DES RESULTATS PAR ACQUISITION SCANNER. 2019.

36. Takeichi T, Kitamura O. Detection of diatom in formalin-fixed tissue by proteinase K digestion. Forensic Sci Int. 10 sept 2009;190(1-3):19-23.

37. Ming M, Meng X, Wang E. Evaluation of four digestive methods for extracting diatoms. Forensic Sci Int. 20 juill 2007;170(1):29-34.

38. Marezza F, Marchetti C, Lanzi G, Lusetti A, Bertani A, Cecchi R. Diatom extraction: A new technique with heated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A technical note. Leg Med Tokyo Jpn. 20 févr 2021;50:101861.

39. Chambre d'agriculture de Bretagne. L'alimentation des porcs en agriculture biologique. 2012;

40. Zhou Y, Zhang J, Huang J, Deng K, Zhang J, Qin Z, et al. Digital whole-slide image analysis for automated diatom test in forensic cases of drowning using a convolutional neural network algorithm. Forensic Sci Int. sept 2019;302:109922.

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 :

## Collège des Sciences de la Santé

### UFR des Sciences Odontologiques

# Serment

En présence de mes Maîtres et de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de l'art dentaire.

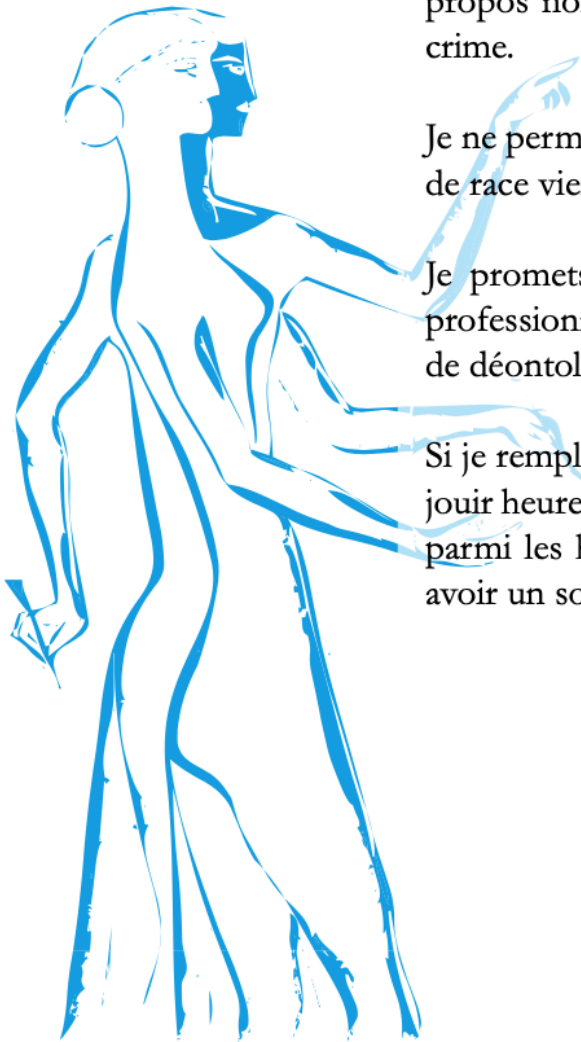
Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un honoraire au-dessus de mon travail. Ma langue taira les secrets qui me seront confiés. Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe.

Mes connaissances et mon état ne serviront ni à diffuser des propos non avérés, ni à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des conditions de croyance, de nation et de race viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je promets et je jure de conformer strictement ma conduite professionnelle aux principes et aux règles prescrites par le code de déontologie.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.





## **Titre : Diatomées et diffusion passive au niveau des os et des dents : noyade ou diagnostic faux positif**

### **Résumé :**

**Introduction :** Le diagnostic de noyade repose essentiellement sur le test de la diatomée au sein de la moelle osseuse. Or ce test est à ce jour très controversé du fait des nombreux biais et facteurs externes qui peuvent l'influencer et notamment le phénomène de diffusion passive.

**Matériels et méthodes :** Nous nous sommes intéressés à l'existence de la diffusion passive au sein de fémurs de porc immergés dans un aquarium enrichi en diatomées. En parallèle, une alternative du test de la diatomée au niveau de la pulpe dentaire a été testé selon le même protocole que pour les fémurs afin de démontrer l'absence de diffusion passive dans la pulpe dentaire. **Résultats :** En 2 mois d'immersion et 48 lames réalisées à partir des prélèvements de moelle osseuse de porc, 36 lames ont révélé la présence de diatomées. Pour le même temps d'immersion et 24 lames réalisées à partir des prélèvements de pulpe dentaire, 3 lames se sont révélées positives. **Discussion :** Les résultats au sein de la moelle osseuse de porc nous ont permis de conclure de manière significative à la présence d'une diffusion passive. Les résultats sur la pulpe dentaire sont encourageants mais ne nous ont pas permis de conclure significativement à une absence de diffusion passive dû à une taille d'échantillon trop faible.

**Mots clés :** Diffusion passive / Diatomées / Noyade / Pulpe dentaire / Moelle osseuse / Médecine légale / Odontologie légale

---

## **Title: Diatoms and passive diffusion in bones and teeth: drowning or false positive diagnosis**

### **Abstract :**

**Introduction:** The diagnosis of drowning is essentially based on the diatom test in the bone marrow. However, this test is currently very controversial because of the many biases and external factors that can influence it, in particular the phenomenon of passive diffusion. **Materials and methods:** We were interested in the existence of a passive diffusion in pork femurs immersed in an aquarium enriched in diatoms. At the same time, an alternative to the diatom test in the dental pulp was tested according to the same protocol as for the femurs in order to demonstrate the absence of passive diffusion in the dental pulp. **Results:** In 2 months of immersion and 48 slides made from samples of pork bone marrow, 36 slides revealed the presence of diatoms. For the same immersion time and 24 slides made from dental pulp samples, 3 slides were positive. **Discussion:** The results in pork bone marrow allowed us to significantly conclude the presence of passive diffusion. The results on dental pulp are encouraging but did not allow us to conclude significantly on an absence of passive diffusion due to the sample size.

**Keywords :** Passive diffusion / Diatoms / Drowning / Dental pulp / Bone marrow / Forensics / Legal Odontology