



Université Lille 2
Droit et Santé

UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ - LILLE 2
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2013

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

TRANSLOCATION BACTERIENNE POST-MORTEM : UNE APPROCHE
BACTERIOLOGIQUE ET MEDICO-LEGALE (ETUDE PRELIMINAIRE)

Présentée et soutenue publiquement le 12 juin 2013

Par Vadim MESLI

Jury

Président : Monsieur le Professeur GOSSET

Assesseurs : Monsieur le Professeur FRIMAT
Monsieur le Professeur HEDOUIN
Madame le Professeur SOBASZEK
Monsieur le Docteur DESSEIN

Directrice de Thèse : Madame le Docteur NEUT

Table des matières

Abréviations	13
Introduction	14
1. Phénomènes cadavériques.....	15
1.1 Décomposition du cadavre.....	15
1.2 Décroissance thermique	17
1.3 Modifications du métabolisme	19
2. Microbiote intestinal humain.....	21
2.1 Microbiote de l'estomac	23
2.2 Microbiote du duodénum et du jéjunum	23
2.3 Microbiote de l'iléon.....	24
2.4 Microbiote du côlon	24
3. Translocation bactérienne intestinale	25
3.1 Mécanismes physiopathologiques	25
3.2 Facteurs responsables de translocation bactérienne	27
3.3 Translocation bactérienne chez l'Homme.....	29
4. Objectifs de l'étude	30
5. Matériel et méthodes.....	32
5.1 Population	32
5.2 Critères d'inclusion	32
5.3 Critères d'exclusion	33
5.4 Réalisation des prélèvements.....	33
5.5 Analyse bactériologique.....	35
a. Mise en culture sur gélose	36
b. Mise en culture en tube et en flacon.....	37
c. Identification bactérienne.....	38
6. Résultats	41
6.1 Résumé des cas inclus.....	41
6.2 Identification bactérienne.....	47
6.3 Observations au microscope	50
7. Discussion.....	55
7.1 Qualité et quantité de bactéries retrouvées.....	55
a. Mises en évidences.....	55

b.	Limites	57
7.2	Influence du refroidissement sur la sélection des bactéries	59
7.3	Influence de la réfrigération sur la température corporelle.....	61
a.	Le délai entre la mort et la mise en réfrigération	62
b.	Le délai entre la mise en réfrigération et l'atteinte d'une température de +4°C.....	63
7.4	Evaluation des critères d'inclusion et d'exclusion.....	66
a.	Critères d'inclusion	66
b.	Critères d'exclusion	67
7.5	Précautions de réalisation du prélèvement	68
7.6	Améliorations du protocole bactériologique.....	68
7.7	Confrontation des résultats aux données de la littérature	70
7.8	Champs d'application.....	72
a.	Les examens <i>post-mortem</i> bactériologiques aux fins de détermination de la cause du décès.....	72
b.	La prévention du risque biologique en salle d'autopsie	73
c.	Les dosages toxicologiques <i>post-mortem</i>	74
d.	Les complications infectieuses chez les patients recevant une allogreffe.....	74
e.	L'approche des maladies infectieuses en paléopathologie.....	75
	Conclusion	76
	Bibliographie.....	78
	Annexes	85

Abréviations

ATP : Adénosine TriPhosphate

BH : *Brain Heart* ou "Cœur Cervele"

CS Aéro : Columbia-Sang incubée en Aérobiose

CS Ana : Columbia-Sang incubée en Anaérobiose

DPM : Délai *Post-Mortem*

DPM-p : Délai *Post-Mortem*-prélèvement

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

GHB : acide Gamma-HydroxyButyrique

IMC : Indice de Masse Corporelle

PCR : *Polymerase Chain Reaction* ou réaction en chaîne par polymérase

TB : Translocation Bactérienne

UFC : Unités Formant Colonie

WW : Wilkins West

Introduction

Les phénomènes microbiologiques intervenant dans la putréfaction du cadavre sont peu décrits dans la littérature scientifique. Cependant, ils ont des conséquences en pratique médico-légale dans l'évaluation du moment de la mort, dans l'interprétation des examens bactériologiques *post-mortem*, en paléopathologie, dans la prévention du risque biologique en thanatologie ou même dans le domaine de la transplantation d'organes.

La décroissance thermique corporelle *post-mortem* et l'anaérobiose semblent être les facteurs déterminants de la décomposition du corps. Ces conditions, associées à la richesse et à la composition du microbiote intestinal, sont en faveur d'une prolifération bactérienne *post-mortem* endogène d'origine digestive.

Dans ce contexte, cette étude préliminaire a pour but de préciser l'implication bactérienne dans la décomposition précoce du corps, d'un point de vue quantitatif, qualitatif et cinétique.

1. Phénomènes cadavériques

La mort, dont la définition précise est complexe, est marquée par un arrêt définitif et irréversible des fonctions vitales (cardio-vasculaire, respiratoire et encéphalique). Elle implique un arrêt de la circulation sanguine et de l'apport en oxygène au niveau macroscopique pour les tissus et au niveau microscopique pour les cellules. L'organisme humain passe ainsi d'un environnement aérobie (en présence d'oxygène) à un environnement anaérobie (en absence d'oxygène) (1). Le décès est précédé d'une période d'agonie d'une durée variable en fonction des causes de la mort. Cette période est caractérisée par une hypoxie entraînant une souffrance poly-viscérale et une altération progressive des fonctions vitales de l'organisme, jusqu'au trépas (2).

L'ensemble des changements qui surviennent après le décès est regroupé sous la dénomination de modifications *post-mortem* ou phénomènes cadavériques. Ces modifications ont une chronologie relativement standardisée, bien que pouvant varier en vitesse et en intensité, en fonction notamment de caractères individuels et environnementaux (1,3).

1.1 Décomposition du cadavre

La dégradation du corps *post-mortem* est caractérisée par différents stades traditionnellement décrits (1,3) :

- le cadavre initialement « frais », sans signe macroscopique de décomposition,
- une phase de décomposition initiale,
- une phase de décomposition avancée,
- une phase de dessiccation (déshydratation) et de squelettisation.

Lors de la décomposition du cadavre, les modifications corporelles communes qui sont classiquement observées sont (1,4) :

- le dégagement d'une odeur caractéristique,
- une modification de la couleur de la peau débutant initialement en région abdominale, communément appelée tache verte abdominale,
- la présence de gaz dans les tissus, qui peut se manifester par une circulation veineuse posthume ou encore une distension des tissus.

Deux autres phénomènes cadavériques peuvent également être observés en fonction des conditions environnementales : la momification et la transformation adipocireuse :

- la momification est une transformation du corps par dessiccation précoce et accélérée, pouvant s'observer de façon concomitante avec d'autres phases de décomposition. Elle est favorisée par un milieu sec et donne à la peau un aspect brunâtre et durci. Le corps ou certaines parties du corps peuvent alors se déshydrater sans se putréfier ou se déshydrater après une phase putréfactive.

- la transformation adipocireuse du cadavre correspond à un mécanisme de transformation des graisses en présence d'eau, appelé saponification. Elle est d'autant plus importante quand l'environnement est chaud et humide, quand les graisses sont en grande quantité ou lorsque l'environnement est anaérobie. Certains métabolites de bactéries aérobies et anaérobies jouent un rôle important dans ce phénomène, tels que certains acides gras (10-hydroxystéarique et 10-hydroxy palmitique) (5).

Dans le cadre d'études sur l'odeur du cadavre, l'analyse des composés organiques volatils autour du corps (dans le sol et dans l'air) a permis de mettre en évidence plusieurs métabolites spécifiques des bactéries anaérobies. Il a été retrouvé du méthane et des acides gras volatils tels l'acide butyrique, l'acide iso-butyrique, l'acide propionique, l'acide valérique ou l'acide isovalérique. Des produits de la dégradation anaérobie des acides aminés sont également retrouvés, comme les acides phénylacétique et phénylpropionique (6–9). Ces deux acides ont également été mis en évidence lors d'analyses des fluides de décomposition de cadavres de porcs, alors qu'ils étaient déposés sur une matrice dépourvue de terre (10).

1.2 Décroissance thermique

La température corporelle du vivant, aux alentours de +37,2 degrés Celsius (°C) en dehors de cas particuliers, va chuter progressivement après la mort pour s'équilibrer avec la température ambiante. Cette déperdition thermique est décrite à environ 1°C par heure, avec un plateau thermique initial, puis une phase de décroissance thermique rapide et un plateau thermique terminal. Le revêtement cutané se refroidit assez rapidement, mais la température centrale dépend des échanges thermiques entre la peau et les tissus plus profonds (muscles, organes...). La vitesse de décroissance thermique est variable en fonction de multiples caractères individuels et environnementaux (11,12). Ces principaux critères de variation sont le poids (et l'épaisseur de la couche de graisse), le port de vêtements, les températures initiales corporelle et ambiante, la posture du corps et les conditions extérieures (exposition au vent, humidité...) (1).

Ainsi, certains facteurs thermiques sont reconnus comme accélérant la vitesse de décomposition du cadavre (13,14) :

des facteurs exogènes :

- une température ambiante élevée, qu'il s'agisse d'un corps retrouvé dans un domicile chauffé ou ayant plusieurs couches de vêtements, dans un véhicule, en extérieur lors de fortes températures (période d'été), ou lorsque le corps a été soumis aux flammes d'un incendie...
- une absence de réfrigération du corps.

des facteurs endogènes :

- une température corporelle initiale élevée, par exemple lors d'une hyperthermie, de la consommation de certaines drogues (cocaïne, amphétamines, neuroleptiques...), d'une infection...
- l'obésité, du fait de l'isolation thermique procurée par les couches adipeuses,
- le diabète et l'hyperglycémie. Cela pourrait être expliqué par un développement bactérien facilité par une fermentation du glucose (13).

A l'inverse, les situations entraînant une température plus basse (immersion, réfrigération, congélation...) sont reconnues comme retardant la décomposition du cadavre (3).

Le délai *post-mortem* (DPM) représente le temps écoulé entre le moment de la mort et le moment où le corps est examiné. En pratique médico-légale, pour des DPM courts, la décroissance thermique est un élément clé de l'estimation du moment

de la mort, couplée notamment à l'observation des caractères *post-mortem* macroscopiques du corps. Des modèles mathématiques sont utilisés afin d'estimer un intervalle de temps comprenant l'heure du décès. Ces modèles utilisent des facteurs de correction prenant en compte les critères de variabilité suscités (15–17).

1.3 Modifications du métabolisme

Le métabolisme représente l'ensemble des réactions biochimiques des cellules d'un organisme. La production énergétique de l'organisme humain repose principalement sur la consommation d'oxygène et de glucose (glycolyse). Il s'agit d'un métabolisme aérobie, qui produit de l'adénosine triphosphate (ATP). Le principal acteur de ce métabolisme est la mitochondrie (organite cellulaire), qui réalise la synthèse d'ATP par un ensemble de réactions chimiques appelées phosphorylation oxydative. Après la mort, l'oxygène n'arrivant plus aux cellules, le métabolisme passe en anaérobiose et la phosphorylation oxydative est interrompue. Des produits intermédiaires comme l'acide lactique s'accumulent, provoquant une acidification intra-cellulaire. Cette acidification libère des enzymes destructrices des protéines (protéolytiques), aboutissant à une destruction (lyse) de la cellule (1,18). Cependant, les bactéries anaérobies parviennent à produire de l'énergie à partir de ces substrats en l'absence d'oxygène. Ces bactéries forment alors des métabolites spécifiques tels que le méthane, l'acide propionique ou l'acide butyrique, sous forme soluble ou gazeuse (19,20).

Les enzymes humaines, qui ont un maximum d'activité aux alentours de +37°C, deviennent de moins en moins efficaces au fur et à mesure que la

température diminue. En revanche, les enzymes bactériennes sont capables de fonctionner sur une gamme de températures plus large (18).

Ainsi, après la mort, le métabolisme cellulaire aérobie laisse place à des conditions d'anaérobiose et de température défavorables au métabolisme par les enzymes humaines mais favorables à une multiplication bactérienne. Ceci est confirmé macroscopiquement par la présence de gaz dans les tissus, ainsi que par la détection de substances spécifiques d'un métabolisme bactérien anaérobie autour du cadavre (8,9).

2. Microbiote intestinal humain

Le microbiote intestinal humain, anciennement appelé flore intestinale, est défini par l'ensemble des micro-organismes (bactéries principalement) contenus dans le tube digestif. Le microbiote est constitué de 10^{12} à 10^{14} bactéries, soit plus de dix fois le nombre de cellules de l'organisme humain. Sur le plan qualitatif, les progrès récents de la biologie moléculaire et de la génomique ont permis de mieux apprécier sa composition et sa physiopathologie (21–24).

Le tube digestif du nouveau né est stérile à la naissance. Il est cependant rapidement colonisé par les micro-organismes rencontrés dès le début de la vie. Le premier contact avec le microbiote de la mère débute dès l'accouchement, puis lors du contact cutané, de l'allaitement, etc. Il est considéré que le microbiote humain n'arrive pas à maturation avant environ l'âge de 2 ans (25,26).

Les bactéries présentes à l'état normal dans le tube digestif sont appelées commensales, à l'opposé des bactéries dites pathogènes. Un véritable écosystème est constitué entre ces micro-organismes et l'hôte humain. L'hôte ingère des aliments permettant aux bactéries de se reproduire et les bactéries produisent des substances influant sur le métabolisme (27). Le microbiote, dorénavant considéré comme un organe à part entière en regard de ses capacités métaboliques, a des effets bénéfiques sur l'organisme humain (on parle alors de symbiose ou eubiose). A l'inverse, les déséquilibres du microbiote (ou dysbiose) vont provoquer des effets néfastes (28).

Les études des selles par des marqueurs moléculaires spécifiques d'espèces ou de souches bactériennes mettent en évidence des différences à la fois significatives et suffisamment marquées pour pouvoir distinguer un individu d'un autre. L'utilisation de marqueurs moléculaires de phyla (deuxième niveau de classification des espèces vivantes) ou de genres retrouve au contraire des similitudes entre les individus, avec cependant des variations en fonction de l'âge, des pays, de certains régimes ou maladies (22,24,29).

Les bactéries prédominantes du microbiote intestinal, *Bacteroides* et *Bifidobacterium*, digèrent les résidus alimentaires en anaérobiose (on parle de fermentation saccharolytique). Cependant, il persiste une présence constante de bactéries protéolytiques, telles les entérobactéries, *Enterococcus*, *Clostridium* ou encore *Fusobacterium* (30). Si certaines d'entre elles sont des pathogènes potentiels, une symbiose est malgré tout possible, dans des conditions physiologiques, grâce à un équilibre entre l'hôte et les micro-organismes (31).

Tout au long du tube digestif, la quantité et la diversité d'espèces bactériennes augmentent pour arriver à un maximum de biodiversité au niveau du côlon, avec plus de 100 espèces de bactéries chez chaque individu. Cette évolution est schématisée sur la figure 1.

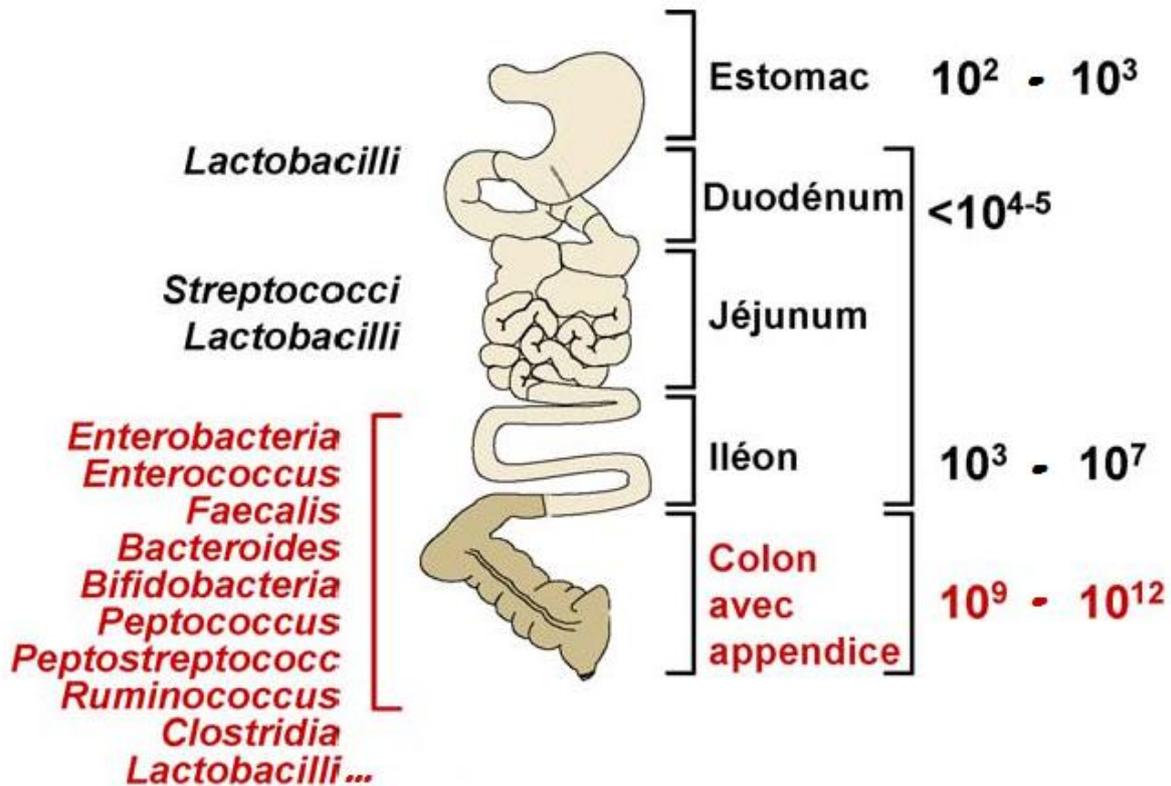


Figure 1 : Schématisation des espèces et quantification du microbiote intestinal en fonction de la localisation digestive (21)

2.1 Microbiote de l'estomac

Le contenu de l'estomac humain est très acide, son pH étant aux alentours de 2. Ces conditions physico-chimiques expliquent qu'il ne contienne que peu de bactéries endogènes, telles que *Helicobacter*, des streptocoques ou des lactobacilles. Ces bactéries ne jouent un rôle chez l'humain qu'en cas de situation pathologique, comme l'hypochlorhydrie par exemple (27).

2.2 Microbiote du duodénum et du jéjunum

Cette partie du tube digestif est marquée par la présence d'acides biliaires. Le nombre de bactéries est compris entre 10^2 et 10^5 Unités Formant Colonie (UFC)/g.

Les espèces prédominantes sont aéro-anaérobies facultatives, on y retrouve particulièrement les streptocoques et les lactobacilles (32).

2.3 Microbiote de l'iléon

Les espèces sont plus nombreuses qu'en amont, entre 10^3 et 10^7 UFC/g, avec des anaérobies qui sont ici prédominants. Des *Bacteroides*, des entérobactéries et des streptocoques coexistent et sont classiquement identifiés dans cette portion du tube digestif (27,33).

2.4 Microbiote du côlon

Après le passage de la valvule iléo-caecale, les espèces anaérobies se développent fortement, devenant prédominantes. Le transit est lent, laissant le temps aux bactéries d'interagir avec leur environnement et de se développer. Le nombre de bactéries atteint ici un maximum, jusqu'à 10^{12} UFC/g. Des différences sont également observées au sein même du côlon, entre les localisations caecale ou colique. On observe entre ces deux parties, une multiplication par 100 du nombre d'anaérobies strictes. L'écosystème se rapproche alors de celui décrit dans les selles. (27,34)

3. Translocation bactérienne intestinale

Le passage de bactéries à travers la muqueuse intestinale a été mis en évidence dès 1950 grâce à un modèle expérimental de péritonite chimique animale (35). Suite à de multiples études cherchant à préciser ce phénomène, la définition de la translocation bactérienne (TB) intestinale a été revue plusieurs fois au cours des deux dernières décennies. Il est actuellement admis que la TB est définie par le passage de bactéries viables ou de fragments bactériens à travers le tube digestif, à destination des ganglions mésentériques (où les bactéries sont le plus souvent éliminées) puis dans la circulation systémique (36,37). La TB pourrait alors provoquer une inflammation systémique voire un sepsis chez l'humain vivant (38). Cependant, la TB intestinale n'est pas systématiquement associée à des situations pathologiques. Elle a en effet été également observée chez des individus sains, sans aucune conséquence négative décelable (39,40).

Des bactéries aussi bien aérobies qu'anaérobies sont capables de TB. Certaines bactéries ont un pouvoir de translocation élevé, notamment les entérobactéries, les *Enterococcus* ou les *Clostridium* (41).

3.1 Mécanismes physiopathologiques

Les bactéries se situent dans la lumière intestinale et doivent traverser plusieurs "obstacles" jusqu'à la *lamina propria* (tissu conjonctif sous l'épithélium). Ces principaux obstacles sont :

- les bactéries commensales, présentes en grande quantité, qui constituent à elles seules une barrière quantitative d'accès à l'épithélium intestinal (28).

- le mucus, substance visqueuse produite par des cellules épithéliales spécialisées, recouvre la surface de l'épithélium du tractus digestif. Il constitue une barrière physique et inhibe également l'adhérence des micro-organismes à l'épithélium. Son épaisseur est variable et diminue de l'antré de l'estomac jusqu'au jéjunum, pour augmenter et atteindre une épaisseur maximale dans le côlon (42).

- la traversée des entérocytes, qui peut se faire par deux voies : un passage paracellulaire (au travers des jonctions serrées) ou un passage transcellulaire (à travers la cellule). La voie transcellulaire a été plus classiquement observée chez le vivant, à travers des entérocytes intacts (43).

Après avoir traversé la *lamina propria*, les bactéries peuvent accéder à la circulation systémique par deux moyens : par le système veineux jusqu'à la veine porte, ou par les voies de drainage lymphatique. La voie lymphatique paraît privilégiée, au regard de la fréquence plus importante de cultures positives dans les ganglions mésentériques que dans le sang portal dans la littérature (36,44,45).

Parallèlement, le système immunitaire digestif est également impliqué. Il est principalement constitué de plaques de Peyer, composées de follicules lymphoïdes de type B. Ces plaques sont situées entre la muqueuse et la sous-muqueuse et sont surmontées par un dôme riche en lymphocytes B, T et en macrophages. Ce dôme contient également des cellules M, capables d'endocyter des agents bactériens. Après avoir dépassé le pôle basal des cellules épithéliales, les bactéries se retrouvent au contact des autres cellules constituant le tissu lymphoïde associé au

tube digestif (*gut associated lymphoid tissue* ou GALT). Toutes ces interactions permettent le développement d'une immunité locale pouvant être transférée à l'ensemble de l'organisme de l'hôte (36,46).

3.2 Facteurs responsables de translocation bactérienne

Une TB est possible lorsque la barrière que constitue le tube digestif est altérée. On peut distinguer trois grands types d'atteintes, dont le caractère théorique a été confirmé expérimentalement (36,37) :

- une altération de la muqueuse intestinale

La nutrition entérale et parentérale, provoquant une atrophie muqueuse, est associée à des TB (47). Les ischémies digestives, telles qu'elles peuvent être rencontrées dans les brûlures cutanées étendues, facilitent les TB (48). La diminution de la perfusion sanguine intestinale provoquée par hyperpression intra-abdominale chez le rat induit également des TB (49).

Le mucus s'oppose à l'adhérence des bactéries à l'épithélium. Une facilitation de la TB s'observe ainsi lors d'altérations de la composition ou de la sécrétion du mucus comme dans les maladies inflammatoires du tube digestif (50).

- une modification du microbiote intestinal

De multiples modèles expérimentaux de pullulation microbienne ont été associés à des TB (36). Une antibiothérapie, en détruisant des bactéries commensales, peut augmenter la population de bactéries dont les pouvoirs pathogène et de translocation

sont plus importants (comme les entérobactéries, les entérocoques et les *Clostridium*) et faciliter une TB (51).

- une atteinte des défenses immunitaires

L'altération de la voie lymphocytaire T joue un rôle dans la TB. Une déplétion macrophagique ou lymphocytaire CD4+ ou CD8+ est en effet corrélée à l'apparition de TB (52).

Une diminution de la production d'immunoglobulines A (anticorps sécrétés par les muqueuses, diminuant l'adhérence des bactéries) facilite également la survenue de TB (47,53).

Les principaux facteurs et mécanismes impliqués dans la TB sont schématisés dans les figures 2 et 3.

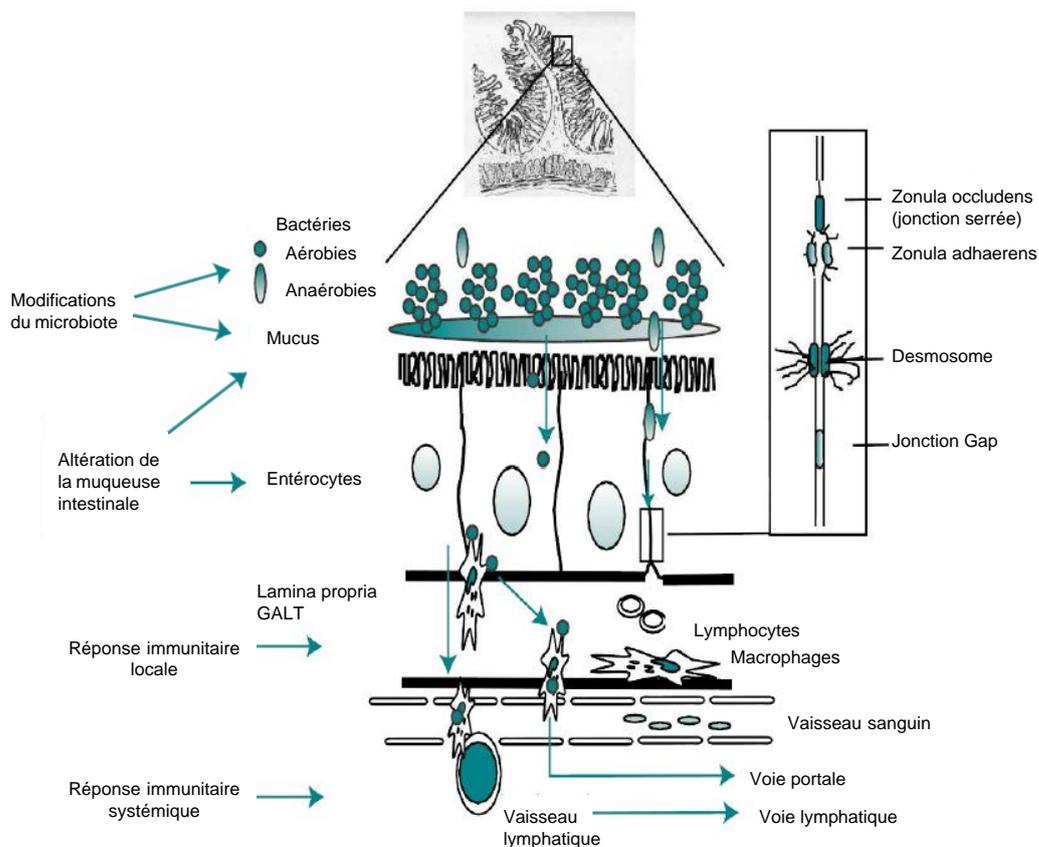


Figure 2 : Mécanismes et facteurs impliqués dans la TB (adaptée de(54))

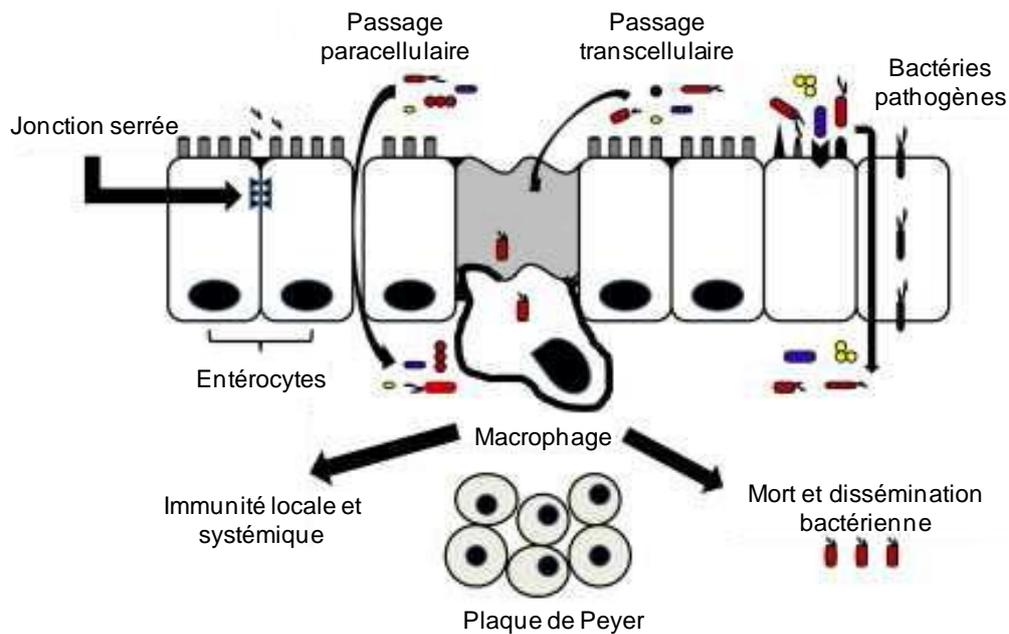


Figure 3 : Voies de passage des bactéries à travers les entérocytes (adaptée de (55))

3.3 Translocation bactérienne chez l'Homme

De nombreuses recherches ont été effectuées dès lors que des situations cliniques présentaient un ou plusieurs des facteurs favorisant la TB. Ainsi, la TB a été mise en évidence dans plusieurs états pathologiques chez l'Homme : choc hémorragique (56), maladies inflammatoires chroniques de l'intestin telles que la maladie de Crohn (41), infection chronique par le Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 ou 2 (57,58), le virus de l'hépatite B ou de l'hépatite C (59), réaction du greffon contre l'hôte (60), occlusion intestinale (61), diabète (62) ou encore cancer colorectal (63).

4. Objectifs de l'étude

Comme cela a été précédemment décrit, les phénomènes cadavériques sont caractérisés par des conditions d'anaérobiose et de baisse de la température corporelle. Des substances spécifiques du métabolisme anaérobie et du métabolisme de protéolyse ont été détectées autour du cadavre de mammifères ou de l'Homme, indépendamment de l'environnement (9). De façon standardisée, les signes de décomposition macroscopique débutent en région abdominale, avec une présence de gaz dans les tissus. Ces processus sont accélérés en fonction de la température et de l'hygrométrie. De plus, le microbiote intestinal représente la source la plus riche et variée de bactéries se développant en anaérobiose chez l'humain, avec des bactéries protéolytiques constamment présentes. Tous ces éléments convergent vers une origine bactérienne, endogène et intestinale de la décomposition du corps. La période d'agonie puis l'arrêt définitif de l'organisme après la mort impliquent des altérations cellulaires et immunitaires au niveau digestif qui sont des facteurs favorisants avérés de TB. Cette TB est vraisemblablement le mécanisme de passage des bactéries à travers le tube digestif.

Les données de la littérature avancent que les bactéries anaérobies de provenance digestive sont la cause de la décomposition précoce du cadavre (1,3,4). Il n'a cependant pas été retrouvé d'étude d'identification et de quantification bactérienne chez le cadavre humain permettant de prouver cette hypothèse.

Or, les phénomènes cadavériques macroscopiques et la décroissance thermique du corps sont les éléments les plus utilisés en pratique courante médico-légale, afin d'évaluer le moment de la mort. (1,3,4).

Dans ce contexte, il apparaît intéressant d'identifier les bactéries précocement présentes dans le sang après la mort, de les quantifier et d'en apprécier la cinétique. La mise en évidence précoce de bactéries d'origine digestive conforterait notre hypothèse d'un envahissement du sang par ces bactéries dû à un mécanisme de TB débutant dès la phase d'agonie. Ces éléments pourraient apporter des informations supplémentaires dans l'évaluation du moment de la mort en pratique médico-légale quotidienne.

5. Matériel et méthodes

5.1 Population

Entre le 15 septembre 2012 et le 15 mars 2013, tous les corps placés à l'Institut Médico-Légal du CHRU de Lille, pour lesquels une autopsie médico-légale avait été demandée par la Justice, ont été examinés. Nos analyses étaient issues de prélèvements demandés par l'autorité judiciaire.

5.2 Critères d'inclusion

Du 15 septembre 2012 au 31 janvier 2013, les critères d'inclusion étaient les suivants :

- un sujet âgé de plus de deux ans au moment de la mort,
- un DPM connu et inférieur à 24 heures,
- une heure de décès connue, avec une marge d'erreur d'une heure au maximum.

Afin d'étendre le recrutement, les critères d'inclusion étaient ensuite élargis.

Du 1er février 2013 au 15 mars 2013, les critères d'inclusion étaient alors les suivants :

- un sujet âgé de plus de deux ans au moment de la mort,
- un DPM connu et inférieur à 72 heures,

- une heure de décès connue, avec une marge d'erreur de deux heures au maximum.

5.3 Critères d'exclusion

Pour toute la période de l'étude, les critères d'exclusion étaient les suivants :

- une perforation de la paroi digestive connue ou suspectée,
- un décès d'origine infectieuse ou dans un contexte fébrile connu,
- une antibiothérapie connue et documentée,
- un décès dans un contexte d'incendie,
- la présence de plaies profondes souillées par de la terre.

5.4 Réalisation des prélèvements

Pour tout corps correspondant à nos critères, un prélèvement sanguin de 8 mL dans 2 tubes secs (sans anti-coagulant) de 4 mL chacun, était effectué par ponction dans la veine sous-clavière.

L'antisepsie cutanée était réalisée systématiquement en quatre temps et devait être strictement respectée :

- une détersion au savon doux,
- un rinçage à l'eau stérile,
- un séchage,
- une antisepsie avec du Dakin®.

Des compresses et des gants stériles étaient utilisés pour réaliser ces opérations. Une hygiène des mains préalable était assurée par friction avec une solution hydro-alcoolique. L'aiguille et la seringue pour la ponction veineuse étaient neuves et stériles. Les tubes étaient remplis intégralement sans que ne puisse persister de bulle d'air. Préalablement à ce remplissage des tubes, ceux-ci bénéficiaient d'une désinfection par un passage d'alcool à 70° afin d'assurer la stérilité des manœuvres et manipulations.

Chaque corps inclus a été décrit avec les dates et heures de décès et de prélèvement, le sexe, l'âge de décès, le poids, la taille, les circonstances de découverte, la cause de la mort et la présence d'éventuels antécédents médico-chirurgicaux.

Nous avons constitué un recueil de données pour chacun de ces corps, qui était composé de :

- la date et l'heure du prélèvement,
- la date et l'heure du décès, avec le degré de précision,
- la notion d'une réfrigération avant le prélèvement, et si oui, ses horaires et le détail de la température,
- la température corporelle en °C par voie rectale lors du prélèvement, s'il n'y avait pas eu de réfrigération préalable,
- le sexe,
- l'âge du sujet au moment du décès,
- les circonstances de découverte du corps,
- les antécédents médico-chirurgicaux connus,

- la cause de la mort après autopsie.

A l'Institut Médico-Légal, chaque corps est associé à un numéro. Les informations recueillies ont été saisies manuellement dans un document papier (annexe n°1) qui était identifié uniquement par le numéro de l'Institut Médico-Légal, afin de garantir une anonymisation des données. Les sources d'informations étaient les éléments communiqués par les enquêteurs, l'éventuelle levée de corps et les données de l'autopsie. Le temps écoulé entre l'heure du décès et celle du prélèvement définissait la valeur du délai *post-mortem*-prélèvement (DPM-p) pour chaque cas.

Les échantillons sanguins étaient transportés à température ambiante au laboratoire de bactériologie dans les 8 heures qui suivaient le prélèvement, avec un délai maximum de 24 heures.

5.5 Analyse bactériologique

Les échantillons étaient mis en culture pendant 5 jours. Quatre milieux étaient utilisés (composition des milieux de culture en annexe n°2) :

- 0,1 mL de sang était étalé sur une gélose Columbia au sang incubée en aérobiose (CS Aéro) à +37°C,
- 0,1 mL de sang était étalé sur une gélose Columbia au sang incubée en anaérobiose (CS Ana) à +37°C,
- 1 mL de sang était introduit dans un tube 10 mL de bouillon "Cœur Cervele" ou *Brain Heart* (BH) incubé en anaérobiose à +37°C,

- 5 mL de sang étaient introduits dans un flacon de 100 mL de bouillon BH incubé en anaérobiose à +37°C.

a. Mise en culture sur gélose

Après étalement de 0,1 mL de sang sur la gélose, la boîte était incubée à +37°C pendant 5 jours : à l'air pour la gélose CS Aéro, en anaérobiose pour la gélose CS Ana. L'anaérobiose était obtenue en jarre par l'addition d'un sachet Anaerogen (OXOID) ou dans une enceinte anaérobie (Forma Scientific). L'observation de la gélose et le comptage des colonies étaient effectués tous les jours pour la gélose CS Aéro. La gélose CS Ana était observée et les colonies décomptées au bout du cinquième jour, afin de respecter l'anaérobiose. Dès qu'une nouvelle colonie s'était développée, afin de pouvoir l'isoler, elle était repiquée (c'est-à-dire prélevée et réensemencée) dans un milieu d'enrichissement, le milieu Wilkins-West (WW) profond (annexe n°2). Un numéro d'identification était attribué à chaque colonie isolée. L'ensemencement devait être fait sur toute la hauteur du milieu, alors que celui-ci était chaud et liquide, avant qu'il ne se fige. Trois comportements pouvaient être observés sur ce type de tube, permettant de distinguer les bactéries :

- aéro-anaérobies facultatives, qui cultivent (c'est-à-dire qu'elles se développent et sont visibles) sur toute la hauteur de la colonne,
- anaérobies strictes, qui ne cultivent pas dans le centimètre le plus haut situé sur la colonne (car au contact de l'oxygène),
- aérobies strictes, qui ne cultivent qu'en surface, au contact de l'oxygène.

Afin de pouvoir identifier la colonie isolée, une partie du milieu WW profond (où le développement bactérien était présent) était réensemencée dans un autre

milieu d'enrichissement, le milieu WW liquide (annexe n°2). Ce milieu était recouvert d'une couche de paraffine pour les bactéries anaérobies. La couche de paraffine permettait de respecter l'anaérobiose et de visualiser la production bactérienne éventuelle de gaz (dans ce cas, la couche de paraffine montait dans le tube sous l'effet du gaz). Le seuil de détection était ici de 1 bactérie dans 0.1 mL, soit de 10 bactéries/mL de sang.

b. Mise en culture en tube et en flacon

1mL de sang était introduit dans un tube contenant 9mL de bouillon BH, incubé en anaérobiose à +37°C. Le milieu était préalablement bouilli, afin de chasser le plus d'oxygène possible. Puis il était paraffiné après introduction du sang pour pouvoir préserver l'anaérobiose et détecter la présence de gaz. Ce milieu d'enrichissement permettait de détecter une bactérie pour 1mL de sang.

5mL de sang étaient introduits dans un flacon contenant 95mL de bouillon BH, incubés en anaérobiose à +37°C. Le flacon étant d'une contenance de 100mL, l'anaérobiose était respectée dès la fermeture du flacon. Ce milieu d'enrichissement permettait de détecter une bactérie pour 5mL de sang.

En cas de développement bactérien dans ces milieux, le liquide devenait trouble. Dans ce cas, au bout de 48 à 72 heures, un isolement bactérien était effectué. Une goutte du milieu était alors étalée en stries, sur deux géloses : une gélose CS Ana à +37°C et une gélose CS Ana à la Néomycine à +37°C. L'ajout de Néomycine facilitait l'obtention de bactéries anaérobies en inhibant la culture des bactéries aérobies.

c. Identification bactérienne

Bactéries aéro-anaérobies facultatives et aérobies strictes

Une coloration de Gram était effectuée (annexe n°3), suivie d'une observation au microscope optique au grossissement x1000. Il s'agissait d'une double lecture des lames, dont une en aveugle par un bactériologiste de notre laboratoire. Quatre formes de bactéries pouvaient être observées : cocci à Gram positif ou négatif, bacilles à Gram positif ou négatif.

- Cocci à Gram négatif (rares chez l'humain) : l'identification bactérienne était assurée par l'utilisation de galeries API.

- Bacilles à Gram négatif : l'identification bactérienne était faite dans un premier temps dans le milieu de Kligler (annexe n°4) puis par des galeries API 20 E (pour les Enterobactéries) et API 20 NE (pour les Non Entérobactéries) (annexe n°5).

- Bacilles ou cocci à Gram positif : dans ce cas, un bouillon Cœur Cerveille était ensemencé pour faire un test à la catalase (annexe n°4). Cette première phase d'identification permettait de connaître le genre de la bactérie. Afin de pouvoir préciser l'espèce, des galeries d'identification étaient utilisées : API Staph (pour les *Staphylococcus*), API Strep (pour les *Streptococcus*).

Bactéries anaérobies strictes

Les colonies ayant poussé sur les géloses en anaérobiose étaient repiquées et ensemencées dans un milieu WW liquide en anaérobiose, une coloration de Gram

était effectuée et les lames étaient observées au microscope optique avec un grossissement x1000. L'identification bactérienne était par la suite assurée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (64) (annexe n°6).

L'expression des résultats quantitatifs des bactéries identifiées était donnée en UFC/mL. Une UFC représente une bactérie viable, capable de former une colonie dans un milieu favorable.

Le protocole expérimental bactériologique est synthétisé dans le schéma 1.

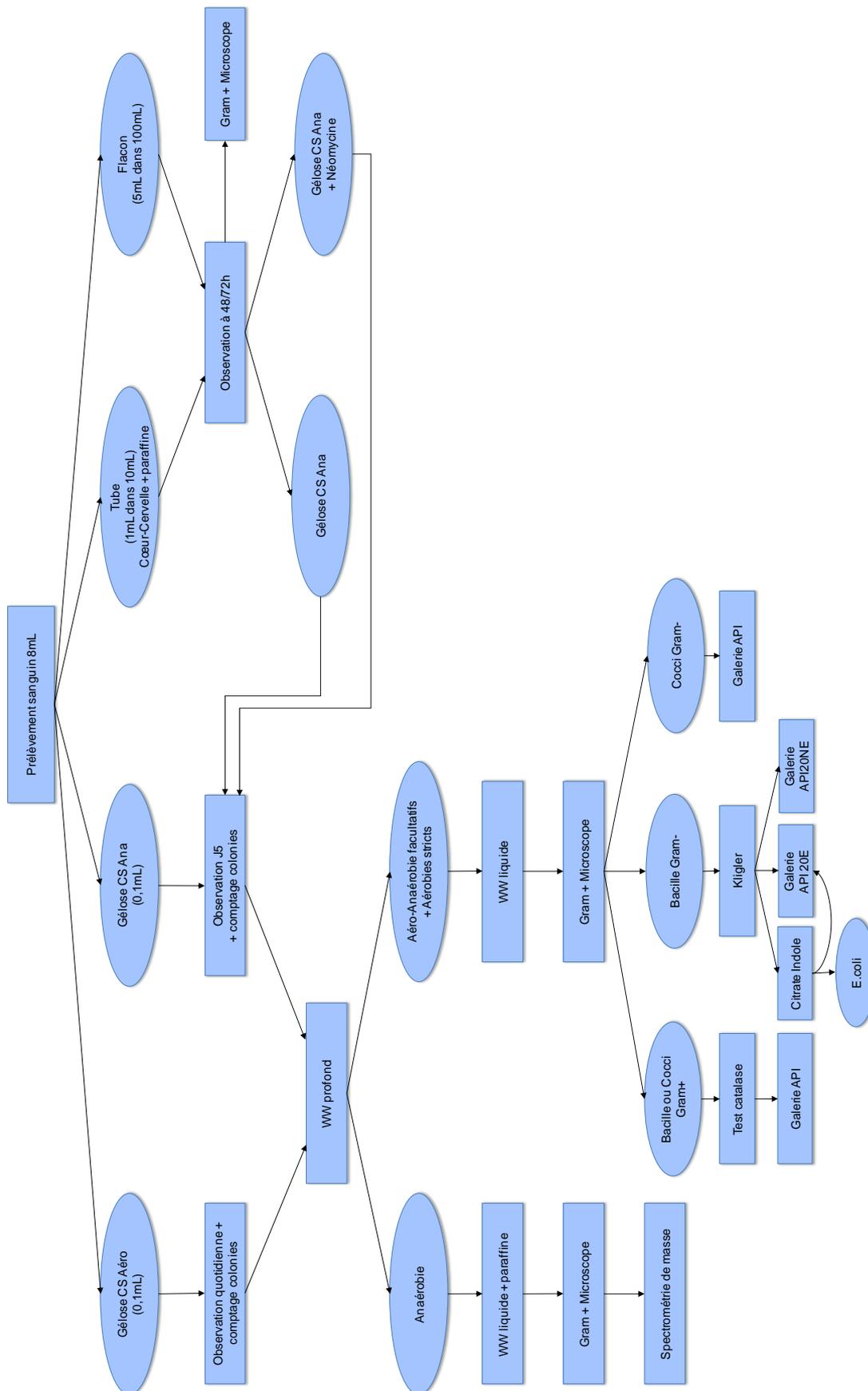


Schéma 1 : Protocole expérimental d'isolement et d'identification bactérienne

6. Résultats

Les prélèvements ont été réalisés sur 8 cadavres : 2 entre le 15 septembre 2013 et le 31 janvier 2013, 6 entre le 1er février 2013 et le 15 mars 2013.

Une prolifération bactérienne a été mise en évidence pour 6 prélèvements. 24 souches ont été identifiées, appartenant à 21 espèces différentes. Tous les germes retrouvés étaient anaérobies stricts (n=11) ou aéro-anaérobies facultatifs (n=13). Aucun germe retrouvé n'était aérobie strict. Un prélèvement (n°1) a entraîné une culture positive par un germe de contamination cutanée (*Propionibacterium acnes*). Deux prélèvements (n°2 et n°6) n'ont révélé aucune espèce bactérienne (contamination inférieure au seuil de détection de 0,2 UFC/mL). Deux prélèvements (n°3 et n°4) ont atteint notre seuil maximal de quantification, soit 5000 UFC/mL. Les DPM-p étaient compris entre 8 heures et 69 heures.

6.1 Résumé des cas inclus

Corps n°1

- DPM-p : 8 heures (+/- 1 heure)
- Séjour en chambre froide avant prélèvement : non
- Température corporelle : +32,1°C
- Sexe : Féminin
- Poids : 46 kg
- Taille : 157 cm
- Age de décès : 69 ans

- Circonstances de découverte : décès en établissement psychiatrique, vomissements fécaloïdes
- Cause de la mort après autopsie : syndrome asphyxique par œdème pulmonaire et inhalation de liquide fécaloïde provenant d'une occlusion intestinale
- Pas d'antécédent médico-chirurgical connu
- Taux de contamination bactérienne = 1500 UFC/mL
- Bactérie identifiée : *Propionibacterium acnes* (1500 UFC/mL)

Corps n°2

- DPM-p : 24 heures (+/- 1 heure)
- Séjour en chambre froide avant prélèvement : oui, 18 heures avant le prélèvement
- Sexe : Masculin
- Poids : 81 kg
- Taille : 184 cm
- Age de décès : 36 ans
- Circonstances de découverte : retrouvé au sol, un lien étant sectionné entre la rambarde d'un escalier et le cou du sujet
- Cause de la mort après autopsie : traumatisme crânien avec hématome extradural compressif dans le cadre d'une pendaison suicidaire
- Antécédent médico-chirurgical connu : éthyliste chronique
- Taux de contamination bactérienne < 0,2 UFC/mL
- Aucune bactérie identifiée

Corps n°3

- DPM-p : 28 heures et 30 minutes (+/- 1 heure)
- Séjour en chambre froide avant prélèvement : oui, pendant 24 heures avant prélèvement, à +4°C
- Sexe : Masculin
- Poids : 75 kg
- Taille : 167 cm
- Age de décès : 44 ans
- Circonstances de découverte : pendaison en centre de détention
- Cause de la mort après autopsie : asphyxie mécanique dans le cadre d'une pendaison suicidaire
- Pas d'antécédent médico-chirurgical connu
- Taux de contamination bactérienne = 5000 UFC/mL
- Bactéries identifiées : *Staphylococcus* sp. (10 UFC/mL), *Escherichia coli* (10 UFC/mL), *Bifidobacterium longum* (10 UFC/mL), *Streptococcus anginosus* (1 UFC/mL), *Bacteroides vulgatus* (0,2 UFC/mL)

Corps n°4

- DPM-p : 27 heures (+/- 1 heure)
- Séjour en chambre froide avant prélèvement : Oui, pendant 23 heures avant prélèvement, à +4°C
- Sexe : Féminin
- Poids : 101 kg

- Taille : 152 cm
- Age de décès : 59 ans
- Circonstances de découverte : corps surnageant dans une rivière
- Cause de la mort après autopsie : asphyxie par noyade
- Pas d'antécédent médico-chirurgical connu.
- Taux de contamination bactérienne = 5000 UFC/mL
- Bactéries identifiées : *Streptococcus oralis* (10 UFC/mL), *Enterobacter agglomerans* (10 UFC/mL), *Escherichia coli* (10 UFC/mL), *Klebsiella pneumoniae* (10 UFC/mL), *Clostridium perfringens* (10 UFC/mL), *Clostridium sordellii* (1 UFC/mL), *Enterococcus* sp. (0,2 UFC/mL), *Veillonella dispar* (0,2 UFC/mL), *Bacteroides thetaiotaomicron* (1 UFC/mL), *Bacteroides fragilis* (0,2 UFC/mL), *Bacteroides ovatus* (0,2 UFC/mL)

Corps n°5

- DPM-p : 48 heures et 30 minutes
- Séjour en chambre froide avant prélèvement : oui, pendant 43 heures et 30 minutes à +4°C avant le prélèvement
- Sexe : Féminin
- Poids : 71 kg
- Taille : 156 cm
- Age de décès : 48 ans
- Circonstances de découverte : décès en réanimation après un mois d'hospitalisation. Une antibiothérapie a été administrée pendant un mois, comportant une semaine d'AUGMENTIN® (Amoxicilline, Acide clavulanique), une semaine de TAZOCILLINE® (Piperacilline, Tazobactam) et d'AMIKLIN®

(Amikacine) et deux semaines de TIENAM® (Imipémène, Cilastatine) et d'AMIKLIN®.

- Cause de la mort après autopsie : défaillance respiratoire suite à un œdème pulmonaire et une infection bronchique, associés à une fibrose pulmonaire.
- Pas d'antécédent médico-chirurgical connu.
- Taux de contamination bactérienne = 1 UFC / mL
- Bactérie identifiée : *Clostridium haemolyticum* (1 UFC/mL)

Corps n°6

- DPM-p : 17 heures et 30 minutes (+/- 1 heure)
- Séjour en chambre froide avant prélèvement : oui, à +4°C pendant 14 heures avant le prélèvement
- Sexe : Masculin
- Poids : 79 kg
- Taille : 193 cm
- Age de décès : 34 ans
- Circonstances de découverte : décès au domicile après un épisode de détresse respiratoire
- Cause de la mort après autopsie : hémopéricarde et hémothorax consécutifs à une dissection aortique
- Pas d'antécédent médico-chirurgical connu.
- Taux de contamination bactérienne < 0,2 UFC/mL
- Aucune bactérie identifiée

Corps n°7

- DPM-p : 63 heures et 30 minutes (+/- 2 heures)
- Séjour en chambre froide avant prélèvement : oui, 42 heures à +4°C avant prélèvement
- Sexe : Masculin
- Poids : 80 kg
- Taille : 181 cm
- Age de décès : 57 ans
- Circonstances de découverte : corps surnageant dans une rivière
- Cause de la mort après autopsie: asphyxie par noyade
- Antécédent médico-chirurgical connu : éthyliste chronique
- Taux de contamination bactérienne =2000 UFC/mL
- Bactéries identifiées : *Enterobacter agglomerans* (10 UFC/mL), *Streptococcus* sp. (10 UFC/mL), *Enterococcus faecium* (0,2 UFC/mL), *Clostridium perfringens* (0,2 UFC/mL), *Lactobacillus curvatus* (0,2 UFC/mL).

Corps n°8

- DPM-p : 69 heures (+/- 2 heures)
- Séjour en chambre froide avant prélèvement : oui, 56 heures avant le prélèvement
- Sexe : Féminin
- Poids : 69 kg
- Taille : 156 cm

- Age de décès : 87 ans
- Circonstances de découverte : corps retrouvé à domicile, dans une flaque de sang
- Cause de la mort après autopsie : hémorragie digestive par ulcère gastrique
- Antécédents médico-chirurgicaux connus : syndrome dépressif traité, hypertension artérielle, dyslipidémie, diabète de type 2
- Taux de contamination bactérienne = 30 UFC/mL
- Bactérie identifiée : *Proteus mirabilis* (30 UFC/mL)

6.2 Identification bactérienne

Les espèces bactériennes identifiées ainsi que leurs habitats normaux sont reportés dans le tableau 1 pour chaque corps, avec son DPM-p.

La quantité de bactéries en UFC/mL en fonction du DPM-p est représentée par un histogramme sur la figure 4. Le nombre d'espèces différentes en fonction du DPM-p est représenté par un histogramme sur la figure 5.

Corps (DPM-p)	Genres et espèces bactériennes identifiés (UFC/mL)	Habitat normal
n°1 (8h)	<i>Propionibacterium acnes</i> (1500)	Microbiote cutané
n°2 (24h)	<0,2 UFC/mL	
n°3 (28,5h)	<i>Staphylococcus</i> sp. (10)	Microbiote cutané
	<i>Escherichia coli</i> (10)	Microbiote intestinal
	<i>Bifidobacterium longum</i> (10)	Microbiote intestinal
	<i>Streptococcus anginosus</i> (1)	Microbiote buccal
	<i>Bacteroides vulgatus</i> (0,2)	Microbiote intestinal
n°4 (27h)	<i>Streptococcus oralis</i> (10)	Microbiote buccal
	<i>Enterobacter agglomerans</i> (10)	Microbiote intestinal
	<i>Escherichia coli</i> (10)	Microbiote intestinal
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (10)	Microbiote intestinal
	<i>Clostridium perfringens</i> (10)	Microbiote intestinal
	<i>Clostridium sordellii</i> (1)	Microbiote intestinal
	<i>Enterococcus</i> sp. (0,2)	Microbiote intestinal
	<i>Veillonella dispar</i> (0,2)	Microbiote intestinal
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (1)	Microbiote intestinal
	<i>Bacteroides fragilis</i> (0,2)	Microbiote intestinal
	<i>Bacteroides ovatus</i> (0,2)	Microbiote intestinal
n°5 (48,5h)	<i>Clostridium haemolyticum</i> (1)	Microbiote intestinal
n°6 (17,5h)	<0,2 UFC/mL	
n°7 (63,5h)	<i>Enterobacter agglomerans</i> (10)	Microbiote intestinal
	<i>Streptococcus</i> sp. (10)	Microbiote buccal
	<i>Enterococcus faecium</i> (0,2)	Microbiote intestinal
	<i>Clostridium perfringens</i> (0,2)	Microbiote intestinal
	<i>Lactobacillus curvatus</i> (0,2)	Microbiote intestinal
n°8 (69h)	<i>Proteus mirabilis</i> (30)	Microbiote intestinal

Tableau 1 : Espèces, DPM-p et habitat normal des bactéries identifiées

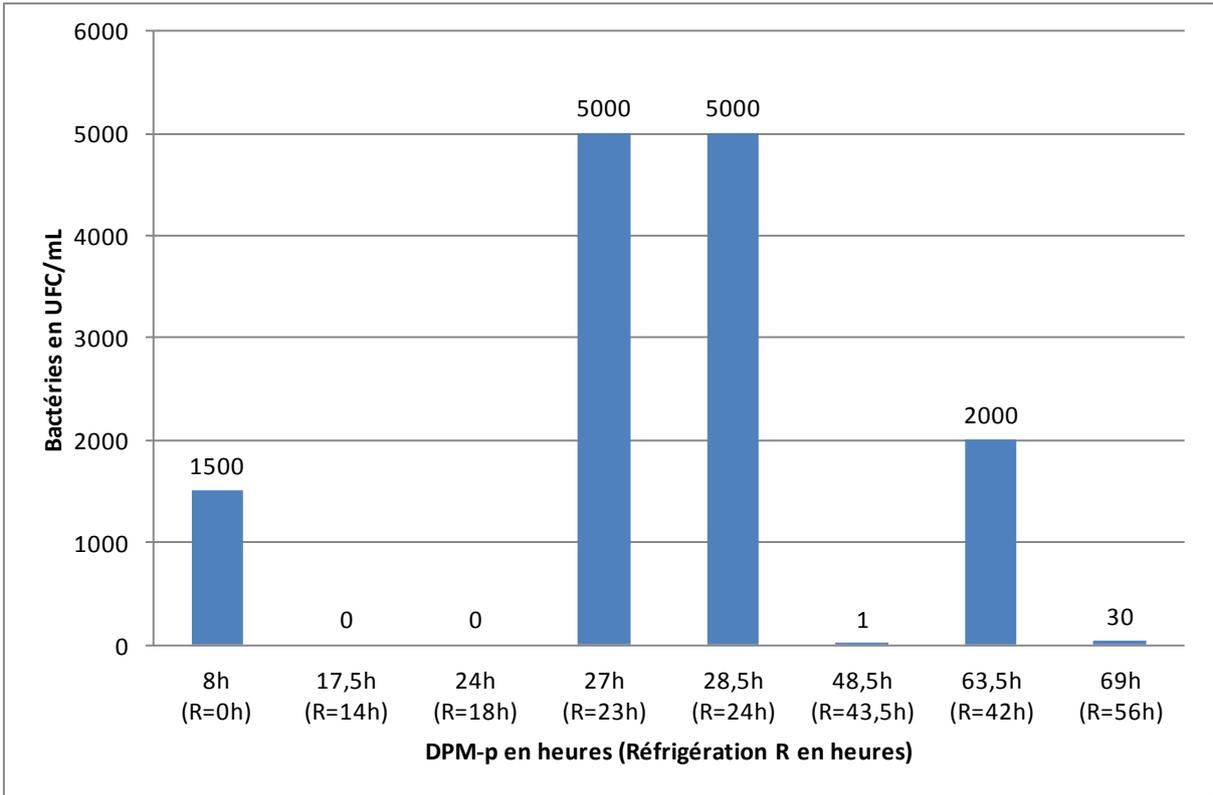


Figure 4 : Quantité de bactéries en fonction du DPM-p avec notification du temps de réfrigération

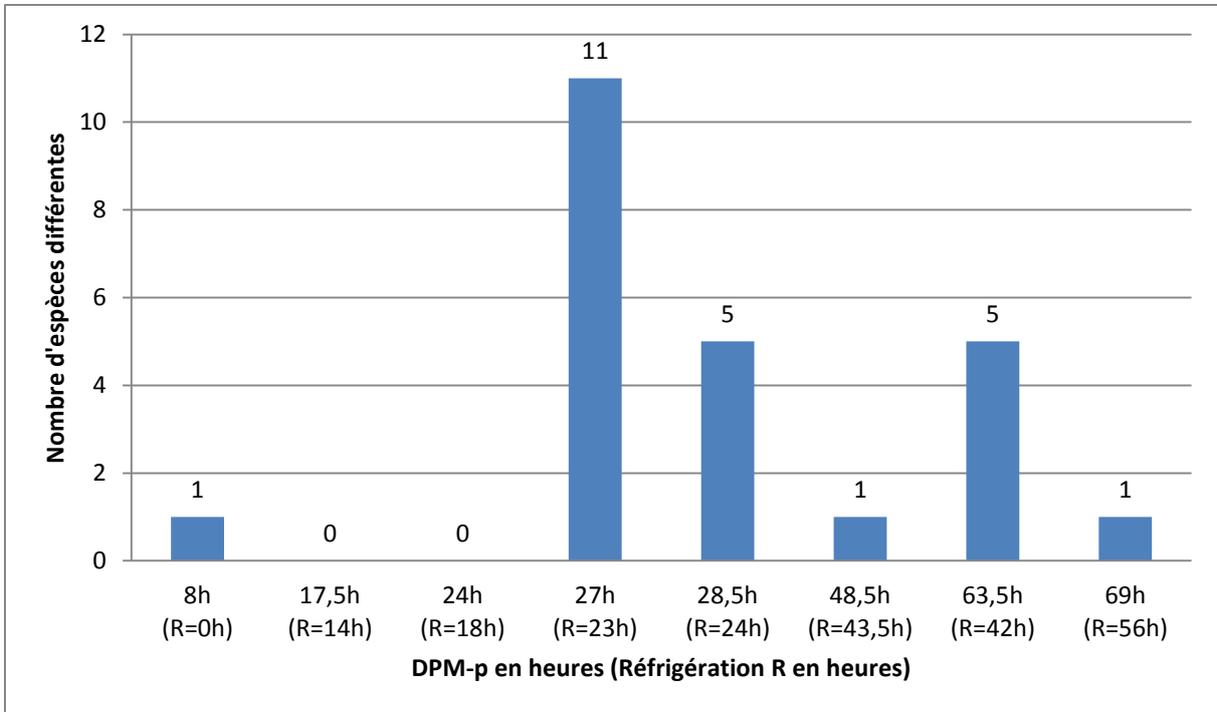


Figure 5 : Nombre d'espèces bactériennes en fonction du DPM-p avec notification du temps de réfrigération

6.3 Observations au microscope

Les photos 1 à 5 sont tirées des observations directes au microscope optique, grossissement x 1000, des lames issues de nos prélèvements après coloration de Gram. Ces photos permettent d'apprécier visuellement les aspects qualitatifs et quantitatifs des prélèvements, ainsi que les spécificités morphologiques de certains germes. Chaque photo est identifiée et synthétiquement décrite.

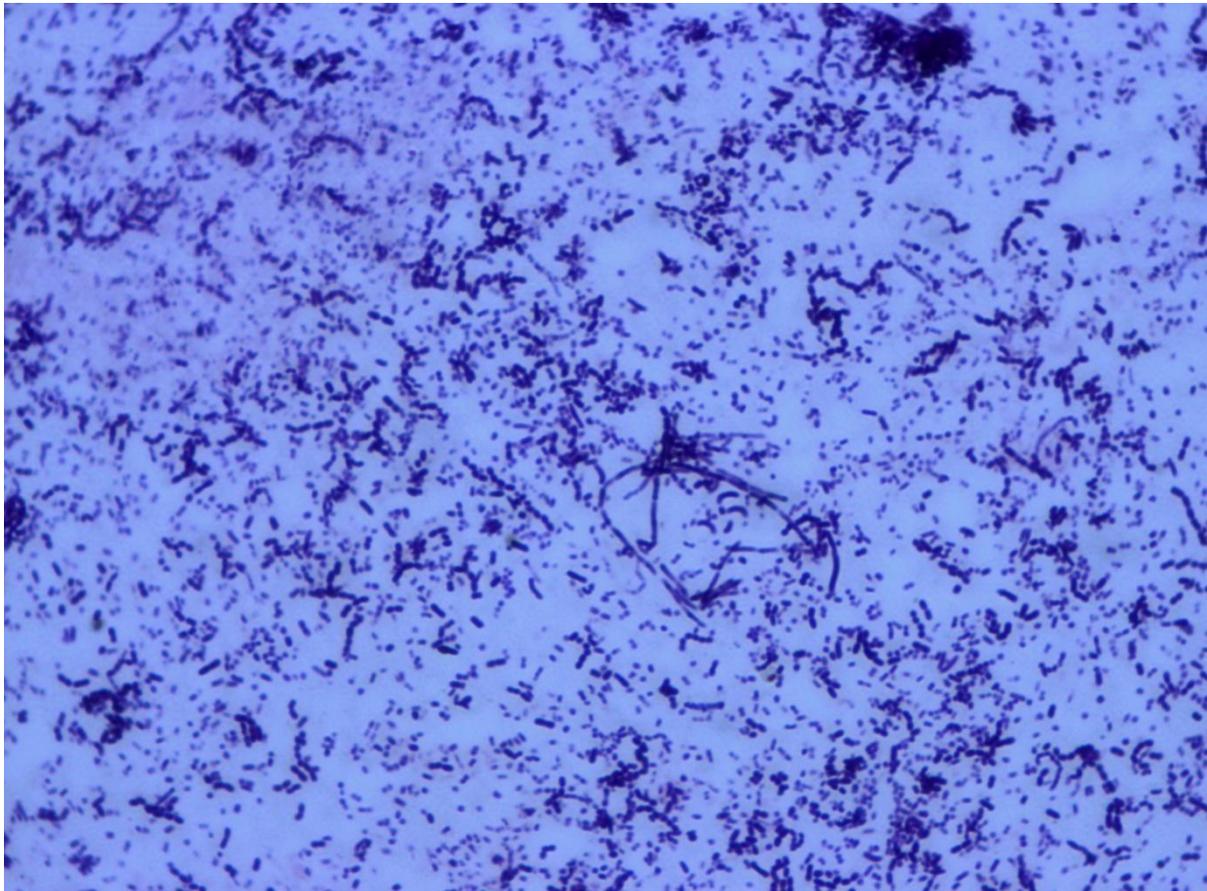


Photo 1 : Corps n°3, après culture en flacon, avant isolement.

Bactéries variées, denses, polymorphes, comprenant des cocci et des bacilles, à Gram positif et négatif, avec une prédominance de bacilles à Gram positif.

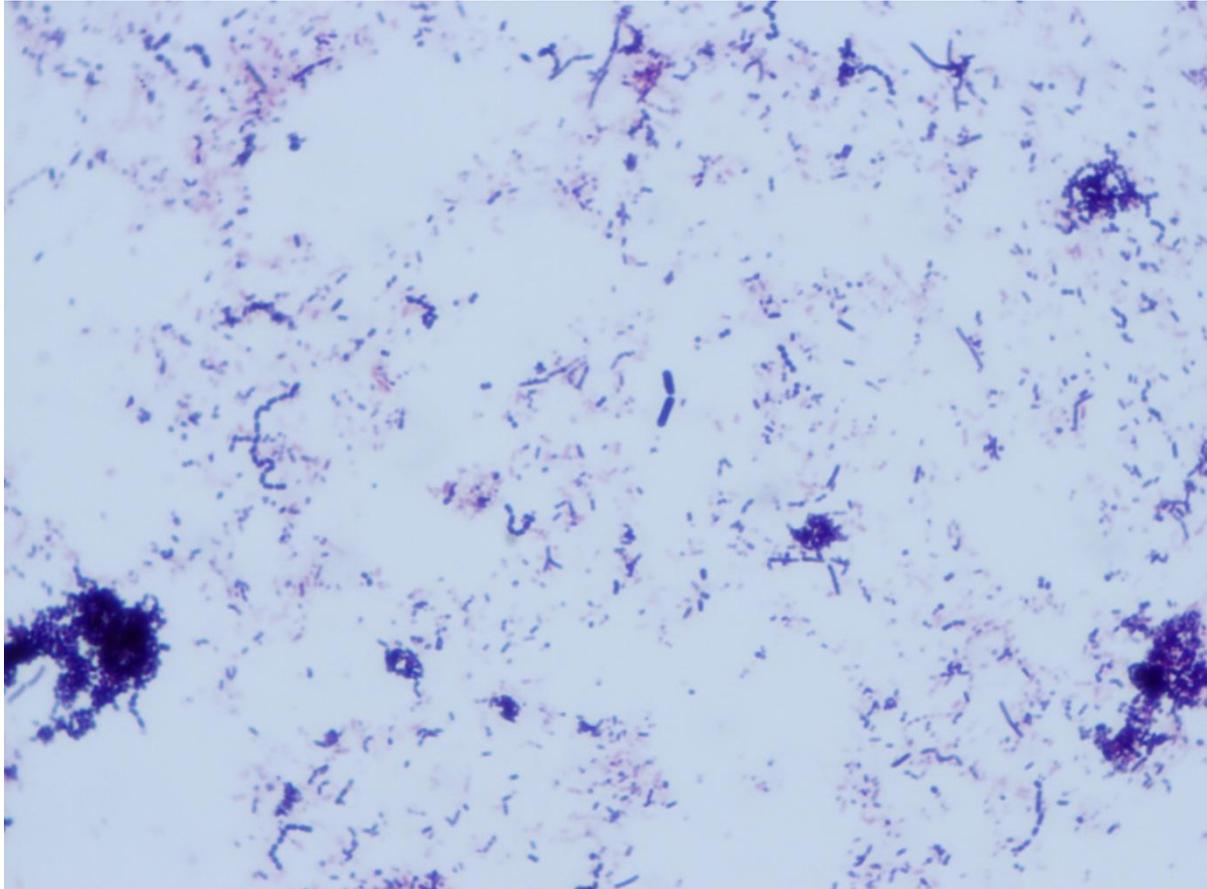


Photo 2 : Corps n°3, après culture en tube, avant isolement.

Bactéries variées, polymorphes. Présence de bacilles en chaînette. Bacille Gram positif trapu d'allure évocatrice d'un *Clostridium perfringens*.

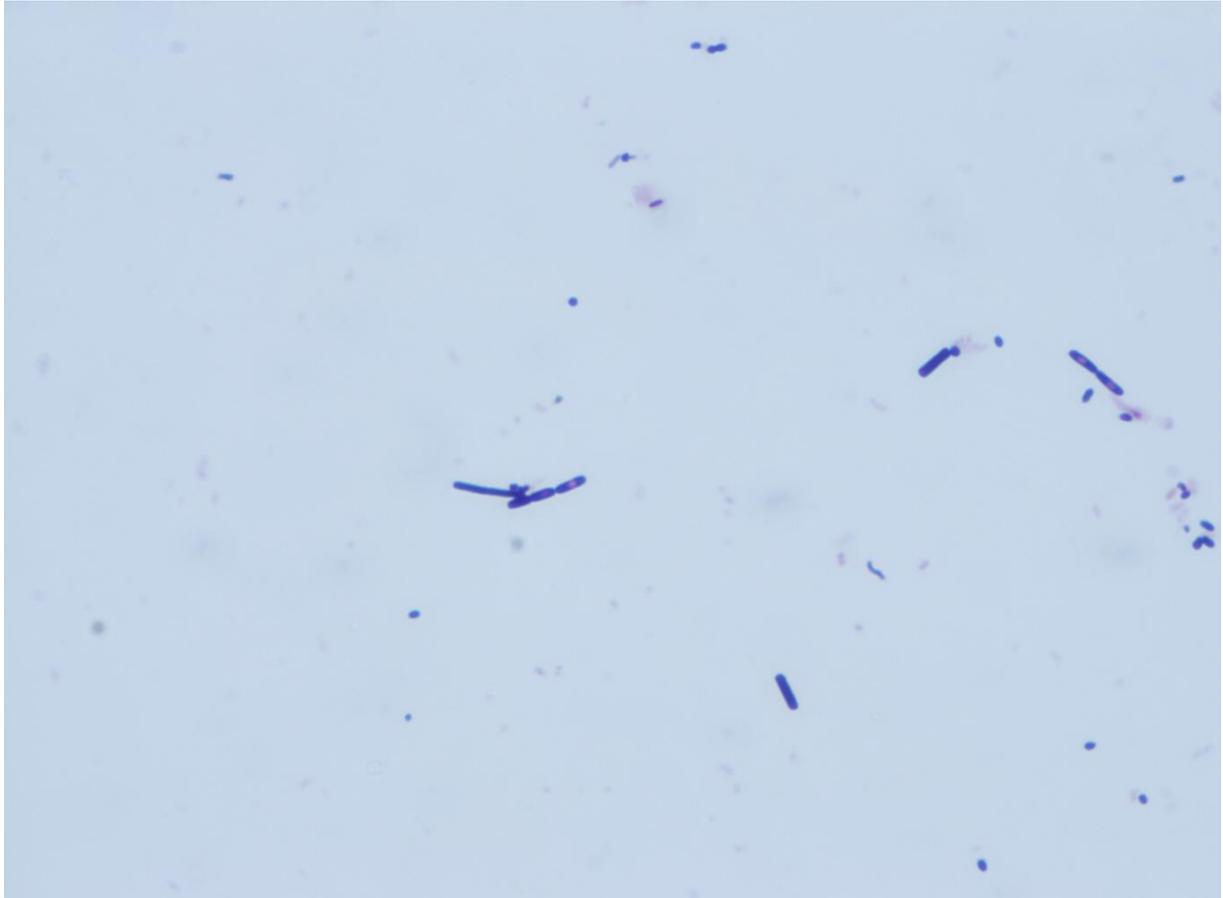


Photo 3 : Corps n°4, après culture en flacon, avant isolement.

Bacilles sporulés à Gram positif. La forme ronde décolorée présente au centre de certains des bacilles (au milieu et à droite dans le champ) est une spore, très évocatrice du genre *Clostridium*.

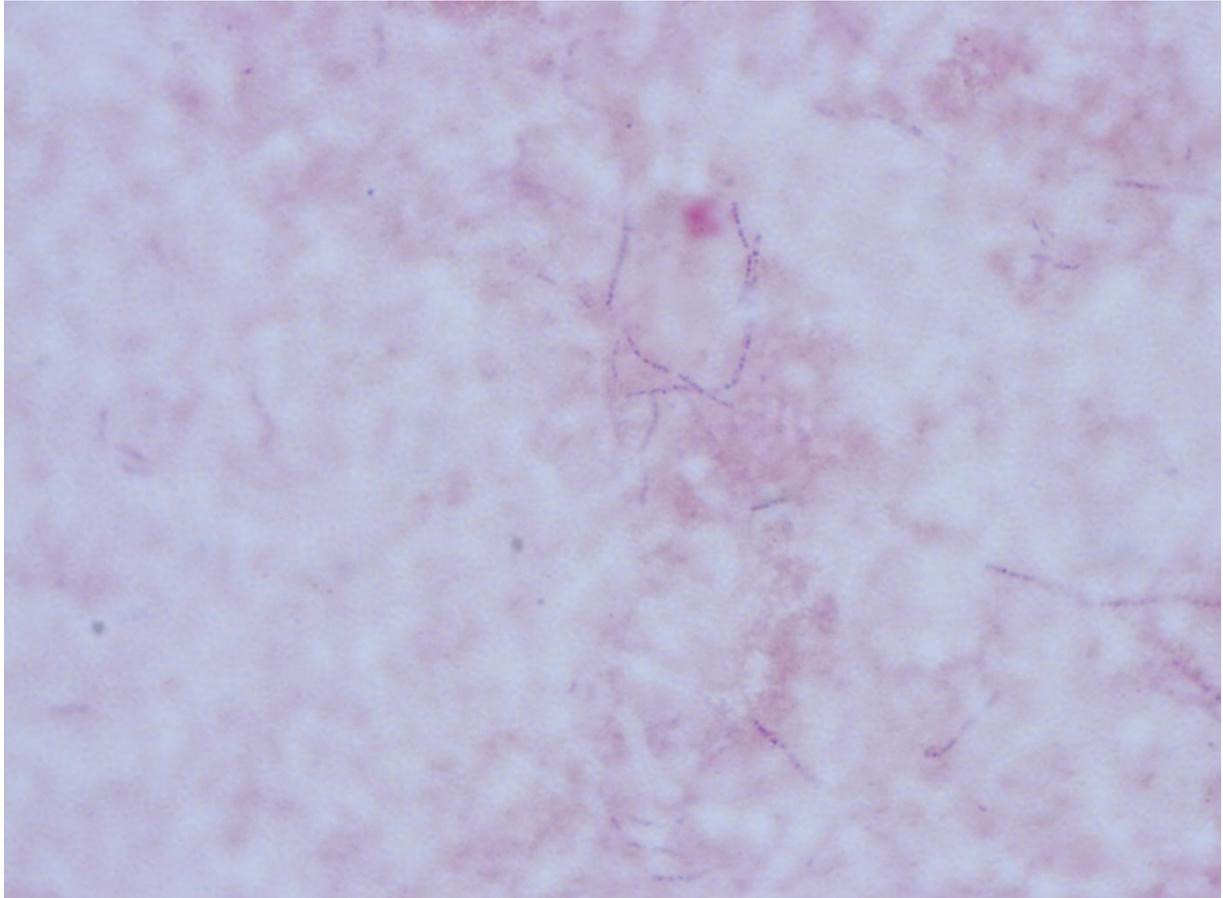


Photo 4 : Corps n°5, après culture en flacon, avant isolement.

Bacilles à Gram positif ou à Gram variable. Une seule forme est ici observée, avec des bacilles longs et fins, parfois en chaînettes.

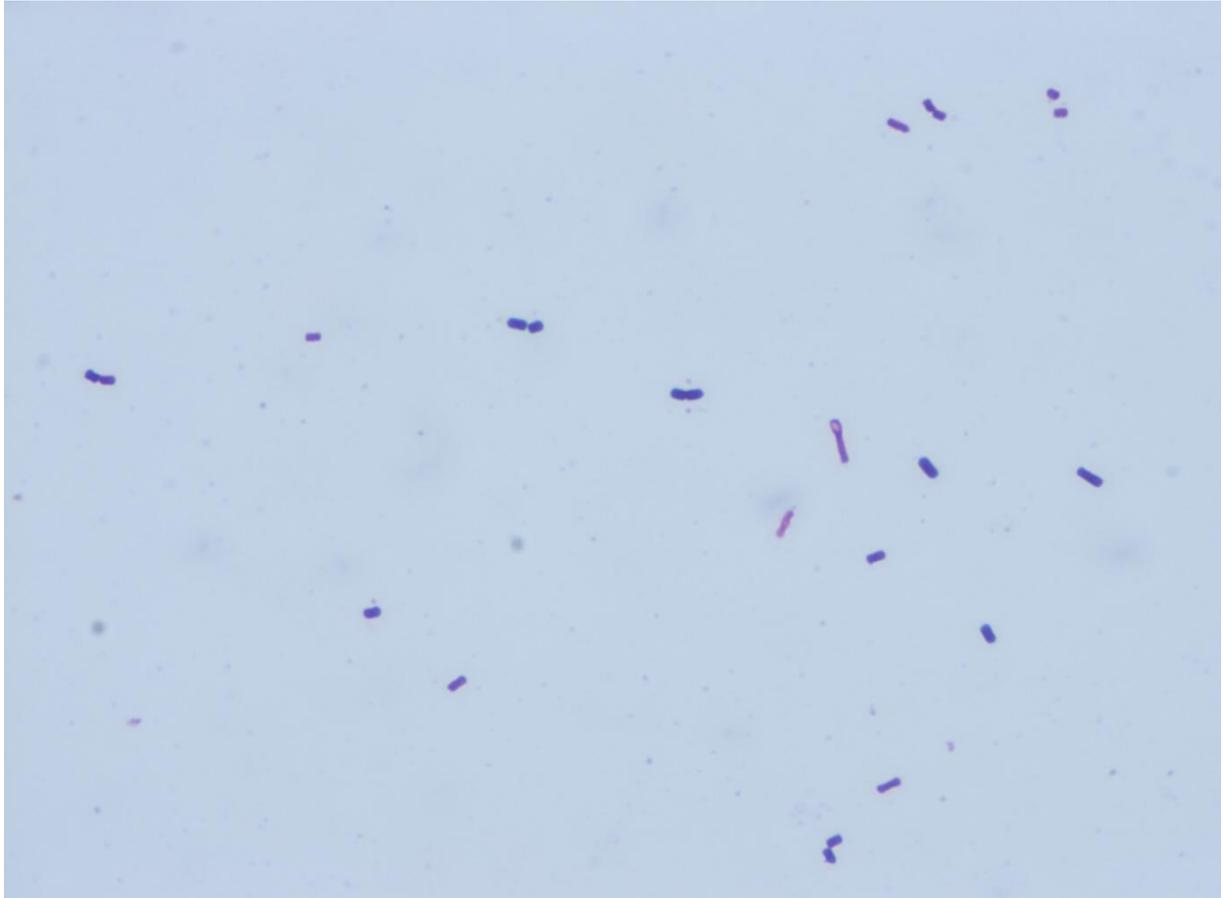


Photo 5 : Corps n°7, après isolement.

Bacilles à Gram positif trapus, évocateurs de *Clostridium*. Deux bacilles sur ce champ présentent une décoloration, dont un présentant une spore en formation.

7. Discussion

Une prolifération bactérienne sanguine *post-mortem* précoce d'origine digestive, concordante avec notre hypothèse initiale de TB lors de l'agonie, a été détectée. Nous avons discuté les résultats, limites et champs d'application de cette étude préliminaire, dans l'optique de définir les modalités d'une étude future.

7.1 Qualité et quantité de bactéries retrouvées

a. Mises en évidences

Six prélèvements sur huit ont révélé une prolifération bactérienne, avec vingt-quatre espèces différentes identifiées. Dix-neuf espèces isolées ont pour habitat normal le tube digestif. Trois espèces proviennent communément de la cavité buccale (*Streptococcus*), une espèce (*Staphylococcus*) est prédominante au niveau cutané.

Néanmoins, comme l'illustre le tableau 2 issu d'une étude du microbiote intestinal et buccal, les *Staphylococcus* et *Streptococcus* peuvent aussi provenir du tube digestif, où ces deux genres peuvent être sous-dominants.

Propionibacterium acnes du corps n°1 est reconnu pour être un contaminant cutané fréquemment retrouvé dans les prélèvements bactériologiques et à ce titre, ne représente pas un résultat significatif dans notre étude (65).

Nous avons mis en évidence des entérobactéries, des entérocoques, puis des *Bacteroides* et *Clostridium* en quantités importantes. Ces espèces proviennent quasi-exclusivement de la partie distale du tube digestif et sont en quantités très abondantes dans le côlon (66).

Nous avons donc détecté une contamination bactérienne sanguine *post-mortem*, de provenance digestive, sur des prélèvements qui étaient faits à distance du cadre colique (sous-claviers).

Microorganisms	Number of microorganisms (cfu/ml or cfu/g)				
	Oropharynx	Stomach	----Small Intestine ----		Colon
			Jejunum	Ileum	
Total Count	$10^8 - 10^{10}$	$0 - 10^4$	$0 - 10^5$	$10^4 - 10^8$	$10^{10} - 10^{12}$
Aerobic microorganisms					
<i>Streptococcus</i>	$10^6 - 10^8$	$0 - 10^3$	$0 - 10^4$	$10^2 - 10^4$	$10^3 - 10^5$
<i>Enterococcus</i>	rare	rare	$0 - 10^2$	$10^2 - 10^4$	$10^5 - 10^{10}$
<i>Staphylococcus</i>	$0 - 10^2$	$0 - 10^2$	$0 - 10^3$	$10^2 - 10^5$	$10^4 - 10^6$
<i>Enterobacteria</i>	rare	$0 - 10^2$	$0 - 10^3$	$10^2 - 10^7$	$10^4 - 10^{10}$
<i>Yeasts</i>	$0 - 10^3$	$0 - 10^2$	$0 - 10^2$	$10^2 - 10^4$	$10^2 - 10^5$
Anaerobic microorganisms					
<i>Peptostreptococcus</i>	$10^4 - 10^6$	$0 - 10^3$	$0 - 10^3$	$10^2 - 10^6$	$10^{10} - 10^{12}$
<i>Bifidobacterium</i>	$0 - 10^2$	$0 - 10^2$	$0 - 10^4$	$10^3 - 10^9$	$10^8 - 10^{11}$
<i>Lactobacillus</i>	$0 - 10^3$	$0 - 10^3$	$0 - 10^4$	$10^2 - 10^5$	$10^6 - 10^8$
<i>Clostridium</i>	rare	rare	rare	$10^2 - 10^4$	$10^6 - 10^9$
<i>Eubacterium</i>	$10^2 - 10^3$	rare	rare	rare	$10^9 - 10^{12}$
<i>Veillonella</i>	$10^3 - 10^8$	$0 - 10^2$	$0 - 10^3$	$10^2 - 10^4$	$10^3 - 10^6$
<i>Fusobacterium</i>	$10^4 - 10^8$	$0 - 10^2$	$0 - 10^3$	$10^3 - 10^4$	$10^6 - 10^8$
<i>Bacteroides fragilis</i>	rare	rare	$0 - 10^3$	$10^3 - 10^7$	$10^{10} - 10^{12}$
<i>Prevotella</i>	$10^6 - 10^8$	$0 - 10^2$	$10^2 - 10^4$	$10^3 - 10^4$	$10^4 - 10^5$

Tableau 2 : Composition du microbiote de l'oro-pharynx et du tube digestif (30)

Une étude antérieure de notre laboratoire avait analysé la prolifération bactérienne tissulaire *post-mortem* dans plusieurs organes à distance du côlon. Suite à l'observation d'un envahissement bactérien tissulaire précoce de provenance colique, l'hypothèse était qu'une TB *ante-mortem* surviendrait pendant la phase agonique. L'analyse histologique de la paroi colique avait révélé une relation proportionnelle entre le DPM et le degré d'envahissement de la paroi. Ces observations avaient été en faveur de l'hypothèse d'une TB survenant dans un second temps, en *post-mortem* (67).

Dans notre étude actuelle, les trois taux de contamination bactérienne les plus importants observés (corps n°3, n°4 et n°7) ont pour facteur commun une mort au décours d'un syndrome asphyxique, avec deux cas de noyade et un cas de pendaison. Cette asphyxie implique que le décès ne survienne pas instantanément, avec une période d'agonie prolongée. Les différents organes, dont le tube digestif, subissent donc une hypoxie prolongée, avant de présenter des lésions tissulaires irréversibles après la mort. L'hypoxie tissulaire provoque une altération de la muqueuse intestinale et une atteinte des défenses immunitaires, qui sont des facteurs favorisants avérés de TB. Ce mécanisme rapporté dans la littérature serait également favorisé lors des manœuvres de réanimations qui maintiennent artificiellement une circulation sanguine (68).

Les corps n°3 et n°4 avaient un DPM-p de 27h et 28h, dont respectivement 24 et 23h de réfrigération. Il s'agissait des deux cas les plus profus de notre étude, la contamination bactérienne était précoce et variée. Ces observations impliquent que la prolifération bactérienne ait débuté plus tôt et que plusieurs espèces bactériennes aient traversé le tube digestif.

Par conséquent, nos constatations renforcent notre hypothèse initiale de l'existence d'une TB débutant pendant la phase d'agonie.

b. Limites

Nous avons observé une tendance à l'augmentation de la contamination bactérienne avec l'augmentation du DPM-p lors des confrontations qualitative et quantitative. Certains facteurs confondants doivent être discutés dans ce contexte :

- corps n°1 : la culture ne permettait d'identifier qu'une seule espèce, *Propionibacterium acnes*, contaminant cutané. Au regard de notre problématique, l'isolement unique de ce cas est l'équivalent d'une absence d'isolement. Cependant, la cause du décès retenue après autopsie était celle d'un syndrome asphyxique par inhalation de liquide fécaloïde provenant d'une occlusion intestinale. La présence dans ce cas d'une agonie prolongée et d'une occlusion intestinale impliquent notamment une altération de la muqueuse digestive et donc une TB. Néanmoins, cela n'a pas été observé pour ce cas. Pour expliquer cette absence de prolifération bactérienne, il est important de noter que les renseignements cliniques et thérapeutiques *ante-mortem* n'étaient pas exhaustifs. De plus, nous sommes dans ce cas en présence du DPM-p le plus court de notre étude.

- corps n°5 : nous retrouvons dans ce prélèvement un *Clostridium*, bactérie de provenance digestive, ce qui conforte l'hypothèse d'une TB. La présence dans ce cas d'une antibiothérapie à large spectre pendant un mois signifie qu'une altération majeure du microbiote intestinal s'était constituée, avec une destruction de nombreux micro-organismes. Cependant, les espèces du genre *Clostridium* peuvent produire des spores. Les spores sont des cellules spécialisées que certaines espèces de bactéries peuvent former, leur octroyant une résistance accrue aux environnements défavorables, y compris une résistance aux antibiotiques (69). Ceci explique la présence isolée d'une bactérie dans ce cas.

- corps n°8 : la seule espèce isolée dans ce cas (*Proteus mirabilis*) est une bactérie commensale du tube digestif, ce qui est compatible avec une hypothèse de TB. La cause de la mort retenue pour ce cas était une hémorragie digestive consécutive à un ulcère gastrique. La perte de sang massive intériorisée (et les facteurs inflammatoires qui y sont associés) dans le tube digestif implique une

modification majeure difficilement évaluable du microbiote intestinal et des mécanismes de barrières physiques et immunologiques du tube digestif. Ces éléments pourraient expliquer l'absence d'une multiplicité d'espèces dans le prélèvement.

7.2 Influence du refroidissement sur la sélection des bactéries

Le refroidissement corporel sélectionne certaines bactéries par rapport à d'autres. En effet, la prolifération bactérienne d'une espèce donnée dépend de la température et chaque espèce aura une sensibilité différente à la température.

Avant la mort, en dehors de circonstances particulières détaillées précédemment, le réservoir de la flore intestinale est important et les bactéries prédominantes sont les *Bacteroides* et les *Bifidobacterium*. Ces genres étaient observés pour les prélèvements des corps n°3, n°4 et n°7, alors qu'ils n'étaient pas mis en évidence dans l'étude précédente de notre laboratoire (67). Les DPM-p plus courts de notre étude actuelle permettent l'isolement de telles espèces. A plus long terme, donc à plus basse température, leur développement serait en effet freiné et ces espèces pourraient ne plus être détectables.

La baisse de la température sélectionne ensuite les bactéries capables de se développer à plus basse température. La figure 6 représente les courbes de prolifération d'*Escherichia coli* ensemencée en bouillon à de multiples températures (70). La figure 7 représente les courbes de prolifération de *Clostridium perfringens* en fonction de la température pour différentes viandes (volaille, bœuf, porc) (71). La prolifération bactérienne continue donc pour ces espèces, même à des températures comprises entre +20°C et +15°C.

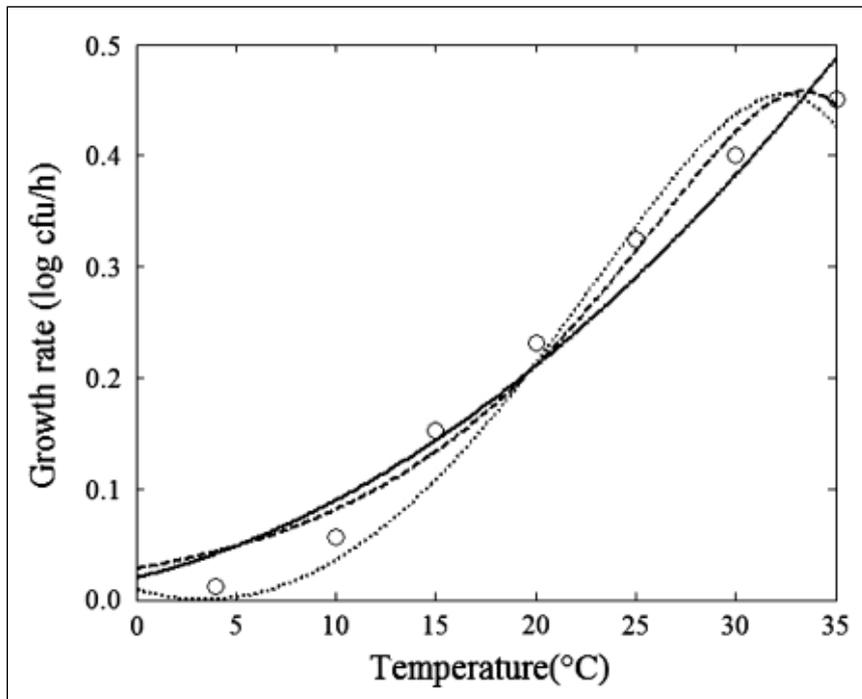


Figure 6 : Taux de prolifération bactérien d'*E. coli* en fonction de la température (70)

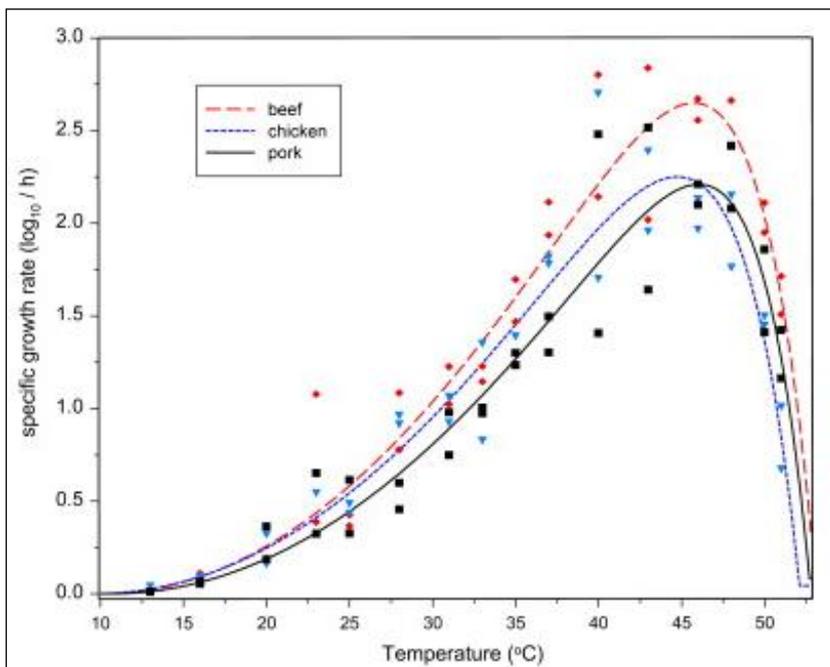


Figure 7 : Taux de prolifération bactérien de *C. perfringens* en fonction de la température (71)

A +4°C, le processus de multiplication bactérienne est pratiquement stoppé, comme l'illustre la figure 8 issue d'une étude non publiée de notre laboratoire. Un

bouillon avec 10^6 UFC/mL d'*Escherichia coli* avait étéensemencé dans 2 tubes, l'un à $+4^\circ\text{C}$ et l'autre à $+37^\circ\text{C}$, puis les colonies avaient été prélevées et décomptées toutes les heures. La croissance bactérienne démarrait rapidement à $+37^\circ\text{C}$ (augmentation de 2.5 log UFC/mL en 4h à 37°C). A $+4^\circ\text{C}$, il n'y avait aucune prolifération bactérienne.

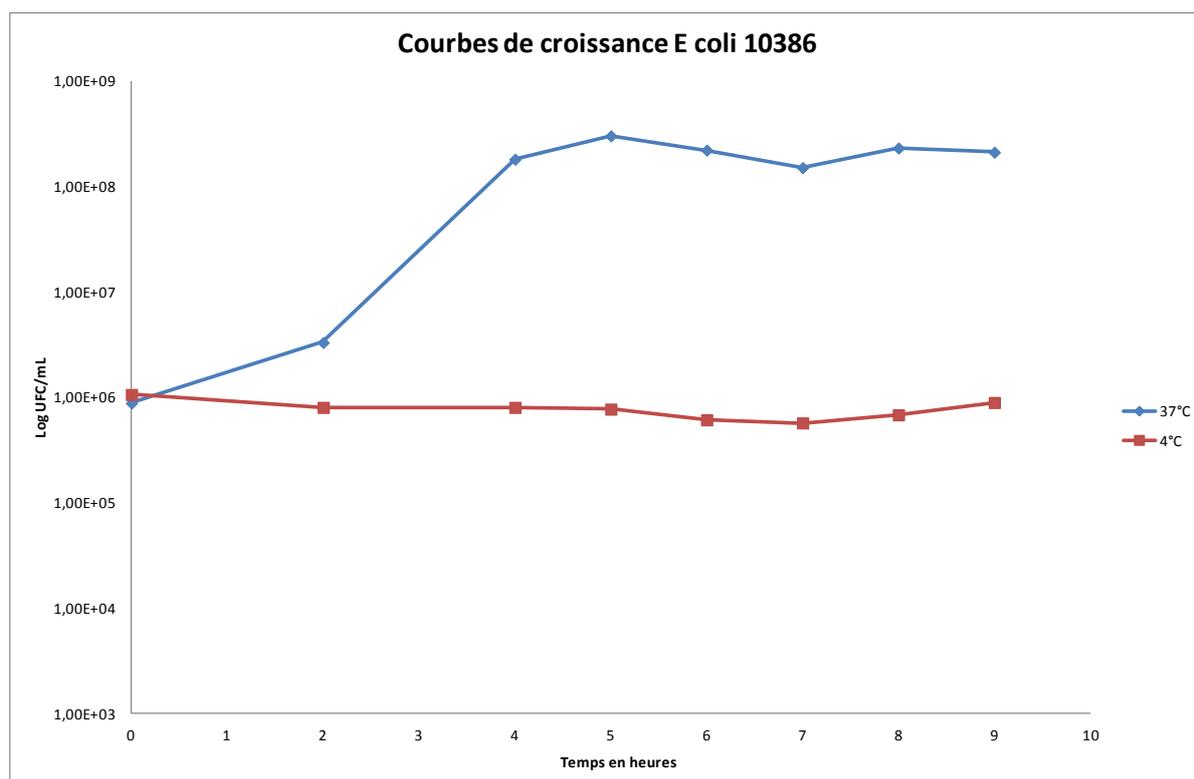


Figure 8 : Taux de prolifération bactérien d'*E. coli* en fonction du temps, à $+4^\circ\text{C}$ et $+37^\circ\text{C}$

7.3 Influence de la réfrigération sur la température corporelle

La pratique actuelle de conservation des cadavres utilise une réfrigération qui permet d'accélérer le refroidissement corporel. Les corps de notre étude étaient stockés à $+4^\circ\text{C}$, néanmoins leurs températures internes n'atteignaient pas cette valeur instantanément.

Comme nous l'avons explicité précédemment, une sélection bactérienne a lieu en fonction de cette variation thermique. Afin d'interpréter nos résultats en termes de cinétique, la question se posait de "corriger" le DPM-p en fonction de la durée de réfrigération, par exemple en la soustrayant du DPM-p. Pour estimer le temps nécessaire pour que les corps atteignent une température centrale de +4°C, deux périodes devaient être dissociées : le délai entre la mort et la réfrigération, puis celui entre la réfrigération et l'atteinte d'une température de +4°C.

a. Le délai entre la mort et la mise en réfrigération

Avant d'arriver à l'Institut Médico-Légal et d'être mis en réfrigération, le corps est sous la responsabilité de plusieurs acteurs successifs à partir de sa découverte : services de police ou gendarmerie, pompes funèbres... Nous avons voulu apprécier la décroissance thermique de chaque corps pendant cette période.

Cette décroissance a été estimée en utilisant la modélisation bi-exponentielle, proposée par Henssge (11) :

$$T_{\text{corps}} = T_{\text{amb}} + (37.2 - T_{\text{amb}}) * (1.25 * \exp(-k*t) - 0.25 * \exp(-5*k*t))$$

$$k = 1.2815/M^{0.625} - 0.0284$$

Avec : T_{corps} = température du corps en °C

T_{amb} = température ambiante en °C

t = DPM en heures (ici = délai entre la mort et la mise en réfrigération)

M = masse du corps en kg

Cette modélisation mathématique est initialement conçue pour évaluer le DPM en fonction de la température corporelle, de la température ambiante et du poids du corps. Nous avons utilisé cette modélisation pour déterminer la température du corps avant mise en réfrigération, puisque nous connaissions les autres paramètres. La température ambiante initiale était estimée en fonction des circonstances de découverte du corps et des données climatiques locales.

Par exemple, pour le corps n°2, le cadavre était retrouvé dans un bâtiment fermé. Dans ces circonstances, il est communément admis que la température ambiante est comprise entre +18°C et +21°C. Nous l'avons ici estimée à +19°C compte tenu de la réglementation en vigueur dans ce type d'habitation (72). La température corporelle avant mise en réfrigération était alors estimée à +34,5°C selon la modélisation.

b. Le délai entre la mise en réfrigération et l'atteinte d'une température de +4°C

Une modélisation graphique de la décroissance thermique pendant la réfrigération par la modélisation de Henssge selon le même principe était effectuée. La température corporelle initiale habituellement fixée à +37,2°C était modifiée selon l'estimation précédemment effectuée. Par exemple, pour le corps n°2, la modélisation était définie par la formule suivante :

$$T_{\text{corps}} = T_{\text{amb}} + (34.5 - T_{\text{amb}}) * (1.25 * \exp(-k * t) - 0.25 * \exp(-5 * k * t))$$

$$k = 1.2815 / M^{0.625} - 0.0284$$

Avec : T_{corps} = température du corps en °C

T_{amb} = température de réfrigération en °C (ici = +4°C)

t = temps de réfrigération en heures (ici = 18 heures)

M = poids du corps en kg (ici = 81kg)

La courbe d'estimation de la décroissance de la température corporelle pour le corps n°2 est représentée sur la figure 9 . Nous constatons que le temps nécessaire à atteindre +4°C était plus long que la durée de réfrigération. Ceci était également observé pour les autres prélèvements, sauf pour les corps n°7 et n°8 où la fin de la réfrigération était voisine d'une estimation de température corporelle de +4°C.

Ces estimations sont compatibles avec la décroissance corporelle thermique humaine observée dans des conditions de température contrôlée pour des indices de masses corporelles comparables (12). Une illustration comparative de ces décroissances thermiques est présentée sur la figure 10.

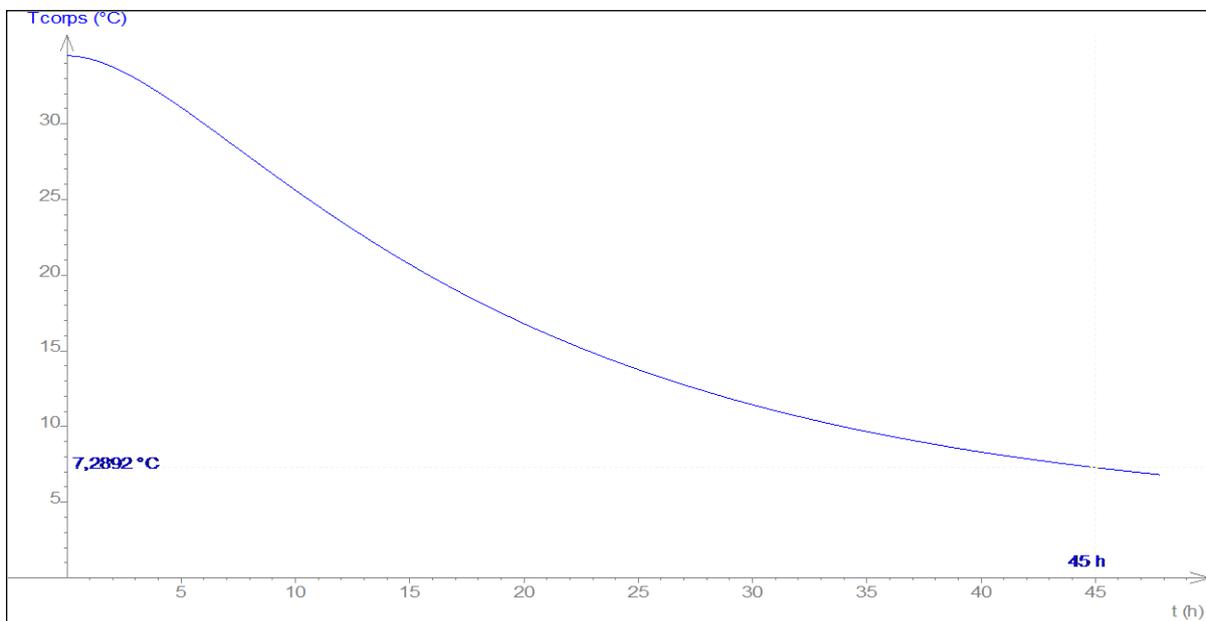


Figure 9 : Modélisation de la décroissance thermique du corps n°2 pendant sa réfrigération

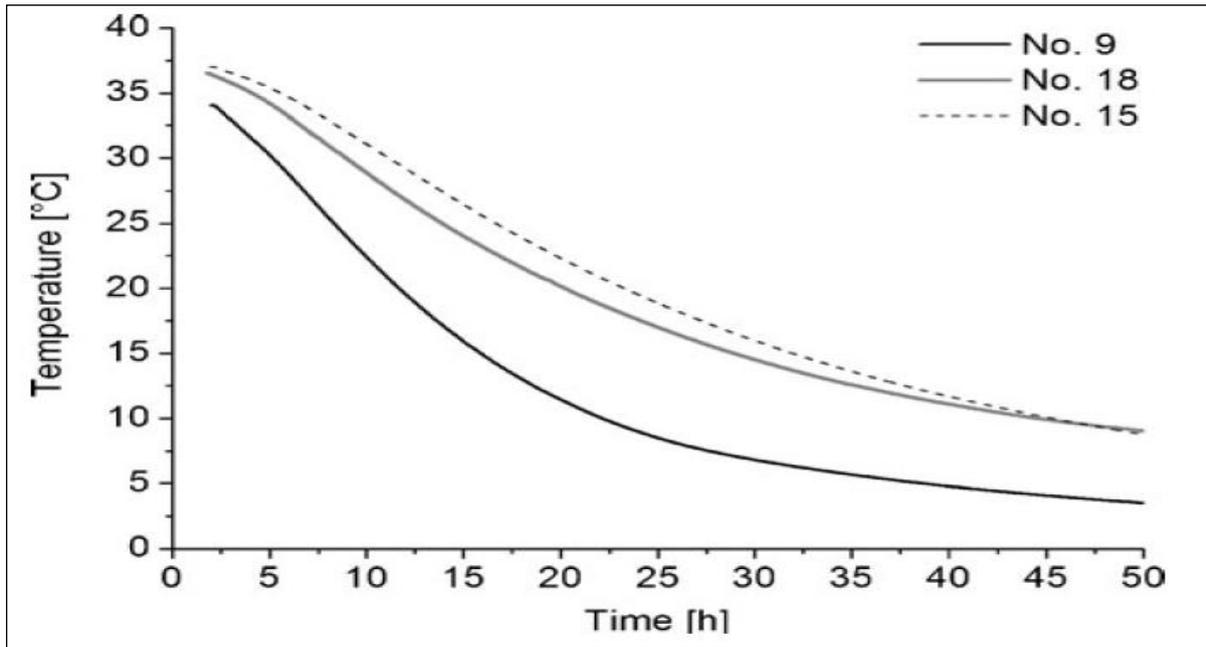


Figure 10 : Evolution de la température corporelle en fonction du temps pour 3 cas (No.9 : corps à +2°C, IMC = 19,5 ; No. 15 : corps à +3,5°C, IMC = 34,1 ; No. 18 : corps à +5°C, IMC = 26,5) (12)

Il est donc impossible actuellement d'avoir une correction précise et scientifiquement appuyée du DPM-p, par rapport à la prolifération bactérienne. Puisque notre étude concerne des DPM courts, le fait de ne pas soustraire la durée de réfrigération permettait d'être plus représentatif de l'évolution de la prolifération bactérienne. Le choix a donc été fait initialement de ne pas corriger le DPM-p en fonction de la durée de réfrigération.

Afin de mieux interpréter ces données, notre protocole pourrait bénéficier d'une prise de température rectale effectuée systématiquement lors du prélèvement, même après réfrigération.

7.4 Evaluation des critères d'inclusion et d'exclusion

a. Critères d'inclusion

Le choix de n'intégrer que les corps pour lesquels une autopsie était demandée par la justice permettait de connaître avec certitude les causes de la mort. Cette démarche évite un biais d'interprétation qui pourrait exister pour un corps non autopsié qui présenterait des facteurs inconnus influant sur la TB.

Un âge au décès supérieur à deux ans : dans le cas d'un décès avant l'âge de deux ans, les causes de la mort sont des pathologies assez spécifiques à cette tranche d'âge. De plus, le microbiote intestinal est en cours de maturation, avec une forte variabilité inter-individuelle dépendant de l'environnement des sujets (73). Ces éléments auraient pu constituer des biais et parasiter l'interprétation des phénomènes que nous cherchions à mettre en évidence. Pour ces raisons, seuls les sujets âgés de plus de deux ans ont donc été inclus pour ce travail. L'étude des sujets âgés de moins de deux ans au décès nécessiterait une approche à part entière.

Devant le nombre limité de cas inclus lors des trois premiers mois de notre recueil de données, une réévaluation des critères d'inclusion a été faite. Ceci a conduit à un élargissement du DPM, passant de 24 à 72 heures et à une modification de la marge de précision, passant de une à deux heures. Après une observation des cas inclus et exclus sur les trois premiers mois, il est apparu que la connaissance de l'heure du décès avec précision était le facteur restrictif majeur de réalisation des prélèvements. Cela expliquait principalement le faible nombre de cas prélevés. C'est à ce titre que la marge d'erreur a été élargie. Cependant, pour conserver une évaluation de la cinétique bactérienne, cette marge de manœuvre ne pouvait pas

aller, selon nous et arbitrairement, au delà de deux heures. Surtout, cet élargissement du DPM a permis de mettre évidence une prolifération bactérienne importante (notamment dans les corps n°3, n°4 et n°7), en adéquation avec une TB précoce.

b. Critères d'exclusion

Afin d'éviter une contamination exogène, source de faux positifs, les cas de perforation de la paroi digestive connue ou suspectée ainsi que la présence de plaies profondes souillées par de la terre, ont été exclus.

Les décès d'origine infectieuse ou dans un contexte fébrile connu étaient exclus. Les raisons de ce choix étaient d'une part la présence probable de bactéries dans la circulation sanguine en *ante-mortem* et d'autre part l'altération du microbiote et des défenses immunitaires *ante-mortem* induites dans ces situations.

Dans le cas d'un décès dans un incendie, la température ambiante potentiellement élevée pourrait favoriser la prolifération bactérienne. A l'inverse, une température trop élevée serait fatale pour les bactéries. Ces facteurs auraient rendu les résultats ininterprétables et cela a motivé l'exclusion de ces cas.

En suivant strictement nos critères, le corps n°5 devrait être exclu en raison de la présence d'une antibiothérapie avant la mort, mais dans le cadre de ce travail préliminaire, nous avons trouvé intéressant de discuter la présence d'un *Clostridium* dans ce prélèvement (cf. supra).

7.5 Précautions de réalisation du prélèvement

Une antiseptie avec utilisation de matériel stérile était réalisée en quatre temps afin d'éviter une contamination des prélèvements. Ce type de procédé était choisi en raison des recommandations récurrentes pour la réalisation d'hémocultures (74,75). Les bouchons des tubes étaient également désinfectés pour les mêmes motifs. Le Dakin® était utilisé comme antiseptique à ces fins car c'est un dérivé halogéné chloré à large spectre d'action (y compris sur les spores), permettant d'être efficace sur les germes en salle d'autopsie.

Les prélèvements sanguins étaient réalisés dans la veine sous-clavière, en raison de la distance de ce vaisseau avec le cadre colique. Cette voie de prélèvement a été préférée à d'autres (fémorale, cardiaque, etc.) car une précédente étude de notre laboratoire montrait des taux précoces de contamination bactérienne post-mortem des tissus à proximité du tube digestif (67). Un prélèvement distant du tube digestif permettait ainsi d'éviter une contamination de proche en proche.

La réfrigération du prélèvement et l'examen bactériologique étaient effectués le plus précocement possible, de façon à favoriser la survie des bactéries et la sensibilité des explorations réalisées.

7.6 Améliorations du protocole bactériologique

Sur des DPM courts, les données bibliographiques sont inexistantes pour l'évaluation quantitative de la contamination bactérienne *post-mortem*. Une étude antérieure de notre laboratoire faisait supposer une contamination bactérienne sanguine à des taux d'environ 1000 à 2000 UFC/mL (67). C'est pourquoi le choix

initial d'une dilution à 10^{-1} avait été ainsi fait, avec l'ensemencement de 0,1 mL de sang sur les géloses Columbia au sang. Les résultats ont néanmoins atteint les taux maximum de quantification pour deux cas, les géloses ne pouvant dénombrer plus de 500 bactéries. Le repiquage de bactéries est difficile dans ces cas, avec un risque de sous évaluer le nombre d'espèces (qui se confondraient dans la masse). Pour ces raisons, le protocole expérimental devrait être amélioré sur ce point, en ajoutant des dilutions supplémentaires à 10^{-2} et 10^{-3} , afin d'être plus performant sur le dénombrement et l'isolement d'espèces.

Par ailleurs, le taux de contamination de chaque bactérie identifiée est faible car il ne repose que sur le repiquage d'une colonie sur une boîte de gélose ne pouvant en dénombrer plus de 500. L'amélioration proposée ci-dessus permettrait également de corriger ce biais.

Huit corps ont été inclus au total. De nombreuses souches ont été isolées malgré le faible nombre de cas, ce qui conforte notre hypothèse et justifie la continuité des explorations. Il est intéressant de noter que nos prélèvements ont eu lieu autour et pendant la période hivernale. Il peut être supposé que les taux de contamination bactérienne soient encore plus importants en été, lorsque les températures ambiantes sont plus élevées. Un nombre de prélèvements plus important aurait cependant permis une meilleure interprétation des résultats afin de valider nos hypothèses.

Actuellement, plusieurs études utilisant des techniques de biologie moléculaire recherchent l'ADN ou l'ARN bactérien afin d'identifier les bactéries. Dans ce type

d'étude, n'importe quel tissu peut être utilisé, sans devoir réaliser de culture bactériologique. Dans ces cas, un biais est présent de par la possibilité de mettre en évidence des fragments bactériens. Ces fragments pourraient provenir de bactéries détruites et ne seraient donc pas pertinents dans une évaluation du DPM. Nous avons cherché à identifier des bactéries vivantes, capables de proliférer. Ceci permet également de garder les souches en collection, afin de pouvoir ultérieurement approfondir les explorations sur une ou plusieurs espèces particulières. Par exemple, leur évolution en fonction de la température pourrait être étudiée (Cf. supra avec *E. coli*), de façon à mieux apprécier la sélection bactérienne par la température.

Nous avons choisi des méthodes phénotypiques et biochimiques utilisées couramment en routine (76), complétées par une spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse est considérée comme le « gold standard » actuel pour l'identification bactérienne de nombreuses espèces. Mais l'identification avec ce processus repose sur des bases de données comparatives (cf. annexe n° 6). Or les bactéries « cibles » de notre étude ne sont pas fréquemment recherchées et sont susceptibles de manquer dans les bases de données. Cela pourrait constituer un biais dans les résultats obtenus. C'est pourquoi l'identification des bactéries anaérobies a été validée par spectrométrie de masse après orientation phénotypique préalable.

7.7 Confrontation des résultats aux données de la littérature

Certains auteurs ont tenté de corréliser le DPM à certains métabolites de décomposition du cerveau chez le mouton. Pour cela, ils ont utilisé la spectrométrie

par résonance magnétique afin de quantifier des métabolites volatils issus de la décomposition de têtes de moutons (77). Les têtes de moutons étaient placées à +4°C, +11°C, +19°C et +26°C. La concentration des métabolites était croissante en fonction du temps et ils observaient une proportionnalité entre le DPM vrai et le DPM estimé pour 8 métabolites, notamment en *post-mortem* précoce (figure 11). Ces métabolites comprenaient plusieurs produits du métabolisme anaérobie et de la protéolyse. Il s'agissait d'acétate, d'alanine, d'acide aspartique, de butyrate, d'acide gamma-aminobutyrique, de myo-inositol + glycine, d'acide succinique et de valine.

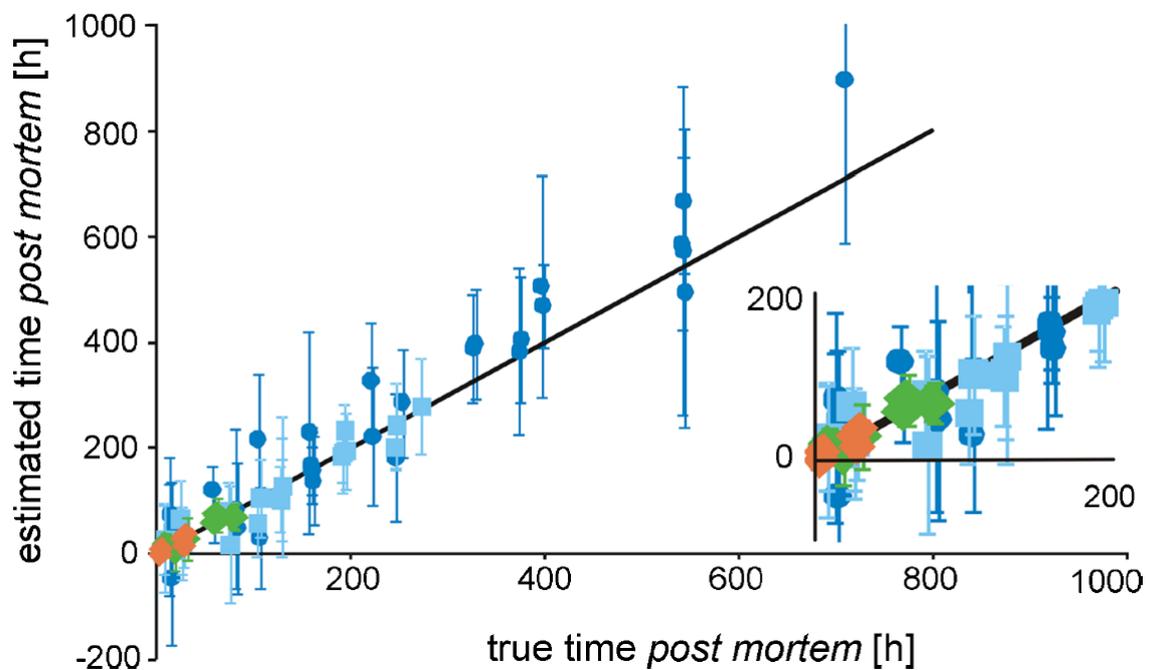


Figure 11 : DPM estimé selon certains métabolites de décomposition cérébrale de moutons, en fonction du DPM réel (77)

Les têtes étaient cependant séparées du corps (récupération après décapitation à l'abattoir). Le reste du corps étant absent, notamment le tube digestif, la décomposition n'était donc pas représentative des conditions réelles de décomposition. Les mêmes auteurs ont par la suite comparé la décomposition de la

tête isolée d'un mouton avec celle de la tête d'un mouton dont le corps était intact .Ils constataient que seuls certains métabolites étaient communs aux deux cas : triméthylamine, acétate, propionate et butyrate. Ceci leur permettait de conclure à l'influence prépondérante du microbiote intestinal sur la décomposition cérébrale (78).

Il pourrait être néanmoins intéressant d'améliorer notre protocole selon ces observations. Nous pourrions ainsi ajouter à nos analyses une détection de métabolites spécifiques d'une protéolyse en anaérobiose, par chromatographie en phase gazeuse, comme par exemple le butyrate.

7.8 Champs d'application

a. Les examens *post-mortem* bactériologiques aux fins de détermination de la cause du décès

Leur positivité est souvent difficile à interpréter pour en tirer des conclusions judiciairement exploitables. En effet, les germes identifiés peuvent provenir d'une TB ou être issus d'une contamination lors du prélèvement, induisant un faux positif. De façon générale, une culture pure (une seule espèce isolée) a plus de valeur qu'un prélèvement pluri-microbien. Comme chez le vivant, ces examens sont à interpréter en fonction du site de prélèvement, de l'histoire clinique, de la nature de la bactérie isolée et d'une inflammation visible à l'examen microscopique (2,68,79). Nos résultats soulignent l'importance du respect des règles d'asepsie ainsi que d'un prélèvement le plus précoce possible afin de limiter l'impact de la contamination bactérienne, qu'elle soit endogène ou exogène. Les techniques modernes de biologie moléculaire comme la réaction en chaîne par polymérase (PCR) peuvent

avoir un intérêt complémentaire en cas de suspicion d'un agent pathogène particulier. Ceci est bien illustré par une publication récente où une identification de *Neisseria meningitidis* était réalisée par PCR à 10 jours de DPM, alors que le corps présentait des signes de décomposition avancée. Grâce au contexte clinique *ante-mortem* évocateur, cette identification permettait de retenir le diagnostic de méningite à méningocoques (80).

b. La prévention du risque biologique en salle d'autopsie

Notre étude a identifié plusieurs bactéries de façon précoce dans le sang de cadavres, alors qu'aucune pathologie infectieuse n'était présente avant la mort. Ceci renforce l'importance du respect des principes sanitaires, qui devraient être équivalents à ceux d'un bloc opératoire en termes de structure, d'équipements et de maintenance (81). Les différents agents pathogènes peuvent être transmis par voie respiratoire, digestive ou cutanée, avec un risque maximal en cas de piqûre. Les équipements de protection individuelle doivent donc être scrupuleusement portés, notamment une tenue professionnelle de base associée à une surblouse, un tablier plastique à usage unique, un article coiffant (charlotte, bonnet,...), un masque chirurgical, des lunettes de protection, des gants, des gants anti-coupure, des chaussures fermées dédiées et des sur-chaussures. Des bactéries comme *Clostridium perfringens*, à haut pouvoir pathogène (responsable de gangrènes gazeuses) et très résistantes (grâce à la production de spores) ont été mises en évidence. De tels agents pathogènes soulignent l'importance de mesures de prévention ciblées : particulièrement pour le suivi des procédures d'accident d'exposition au sang, avec notamment l'utilisation de bains de Dakin®, antiseptique

efficace sur les spores, mais aussi l'utilisation de désinfectants efficaces sur les spores, pour les sols, les surfaces et le matériel, comme l'eau de javel (81–83).

c. Les dosages toxicologiques *post-mortem*

Des dosages d'éthanol sont recherchés dans les cas où une alcoolisation est suspectée dans certaines circonstances de décès (par exemple, un accident de voiture). Les bactéries anaérobies sont capables de former de l'éthanol par fermentation alcoolique. Ce phénomène est connu et notre hypothèse de TB précoce doit être un argument supplémentaire à émettre des réserves quant à l'interprétation de taux d'éthanol *post-mortem*. La recherche récente est axée sur des métabolites de l'éthanol, tels que l'ethyl glucuronide, le phosphatidylethanol et des acides gras ethyl esters, qui permettent d'être plus sensible et spécifique (84).

L'acide gamma-hydroxybutyrique (GHB) est à considérer en pratique médico-légale car il peut être utilisé comme traceur dans le cadre de la consommation de drogues ou de soumission chimique. Bien que présent dans le corps dans d'infimes concentrations (nano-molaires), il est également produit naturellement lors de la décomposition du corps et par certaines bactéries (85,86). L'utilisation de tubes Ethylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA) est de ce fait recommandée, afin de restreindre la prolifération bactérienne. Ces éléments doivent être pris en compte dans l'interprétation de dosages *post-mortem* de GHB (87).

d. Les complications infectieuses chez les patients recevant une allogreffe

Le risque infectieux est présent pour les patients recevant une allogreffe d'organes d'un donneur en état de mort encéphalique ou de tissus musculo-

squelettiques prélevés en *post-mortem*. En effet, plusieurs cas de complications infectieuses sont rapportés dans la littérature, alors que les donneurs étaient sains sur le plan infectieux (88). Différents auteurs décrivent notamment des taux d'infection à *Clostridium sordellii* de 8,1% sur 795 donneurs de tissus musculo-squelettiques (89), de colites à *Clostridium difficile* (90) pour 12,4% de cas sur 1331 donneurs d'organes solides, ou encore de rares infections à *Clostridium perfringens* après transplantation hépatique (91). Les recommandations de greffer le plus précocement possible (principalement dans le but de réduire le temps d'ischémie froide), dans des règles d'asepsie strictes, sont renforcées par nos constatations. Des précisions ultérieures sur la prolifération bactérienne *post-mortem* permettraient donc une meilleure prévention de ces risques.

e. L'approche des maladies infectieuses en paléopathologie

L'émergence des techniques de biologie moléculaire, avec le séquençage des génomes de bactéries, a permis une approche de certaines maladies chez les populations du passé. Ainsi, le génome de *Yersinia pestis*, espèce responsable de la peste noire, a été reconstitué à partir de restes de victimes dont la cause du décès était attribuée à la peste de façon certaine (92). Il est également possible de citer la gangrène gazeuse, pathologie redoutée lors de la Première Guerre Mondiale, dont *Clostridium perfringens* est l'agent responsable (93). Des spores de *Clostridium* ont même été retrouvés sur des documents issus d'une sépulture religieuse datant des XV et XVI^{èmes} siècles (94). Les données qualitatives et quantitatives des bactéries du cadavre semblent cruciales à prendre en compte dans l'interprétation de tels cas.

Conclusion

Nous avons réalisé un travail original cherchant à quantifier, qualifier et apprécier la cinétique bactérienne dans les phénomènes cadavériques chez l'Homme. A notre connaissance, il n'existe pas d'étude antérieure dans la littérature ayant ces objectifs pour des DPM courts.

Cette étude a permis d'observer une contamination bactérienne sanguine *post-mortem* précoce et de provenance digestive. Les résultats qualitatifs (présence majoritaire de bactéries du tube digestif), quantitatifs (large variété de bactéries) et cinétiques (taux de contamination bactériens élevés précocement) sont en faveur de notre hypothèse d'une TB intestinale débutant dès la période d'agonie, en *ante-mortem*. Les mécanismes favorisants seraient les mêmes que ceux décrits chez le vivant. Les espèces bactériennes observées sont également en faveur d'une sélection bactérienne par la décroissance thermique et par les conditions d'anaérobiose.

Nos résultats sont encourageants et concordent avec notre hypothèse initiale. Cependant, ce travail est préliminaire et ne permet pas de tirer de conclusion définitive. Les travaux antérieurs dans ce domaine sont peu nombreux et un recueil de cas plus important est nécessaire. Les éléments présentés doivent donc être développés.

Une meilleure connaissance de la prolifération bactérienne du cadavre permettrait une appréciation plus pertinente de la valeur des examens bactériologiques ou toxicologiques *post-mortem*, des approches infectieuses en

paléopathologie, du risque infectieux après transplantation d'organes prélevés sur donneur en état de mort encéphalique ou encore du risque biologique pour le personnel travaillant en salle d'autopsie.

En perspective, la détermination de la ou des bactéries ayant la meilleure reproductibilité dans l'évaluation du DPM rendrait possible la recherche de quelques métabolites ciblés. Ces métabolites pourraient être intégrés dans un faisceau d'arguments de l'évaluation du DPM précoce en pratique médico-légale.

Bibliographie

1. Beauthier JP, Hédouin V, Mangin P. *Traité de Médecine Légale*. 2e édition. De Boeck; 2011.
2. Morris JA, Harrison LM, Partridge SM. Postmortem bacteriology: a re-evaluation. *J. Clin. Pathol.* 2006 Jan;59(1):1–9.
3. Campana JP, Fornès P. *Principes de médecine légale*. 2e édition. Arnette; 2010.
4. Durigon M. *Pratique médico-légale*. 2e édition. Masson; 2007.
5. Takatori T. The mechanism of human adipocere formation. *Leg. Med. Tokyo Jpn.* 2001 Dec;3(4):193–204.
6. Vass AA, Smith RR, Thompson CV, Burnett MN, Wolf DA, Synstelién JA, et al. Decompositional odor analysis database. *J. Forensic Sci.* 2004 Jul;49(4):760–9.
7. Vass AA, Smith RR, Thompson CV, Burnett MN, Dulgerian N, Eckenrode BA. Odor analysis of decomposing buried human remains. *J. Forensic Sci.* 2008 Mar;53(2):384–91.
8. Vass AA. Odor mortis. *Forensic Sci. Int.* 2012 Oct 10;222(1–3):234–41.
9. Swann LM, Forbes SL, Lewis SW. Analytical separations of mammalian decomposition products for forensic science: A review. *Anal. Chim. Acta.* 2010 Dec;682(1–2):9–22.
10. Swann L, Chidlow GE, Forbes S, Lewis SW. Preliminary studies into the characterization of chemical markers of decomposition for geoforensics. *J. Forensic Sci.* 2010 Mar 1;55(2):308–14.
11. Henssge C. Death time estimation in case work. I. The rectal temperature time of death nomogram. *Forensic Sci. Int.* 1988 Sep;38(3–4):209–36.
12. Muggenthaler H, Sinicina I, Hubig M, Mall G. Database of post-mortem rectal cooling cases under strictly controlled conditions: a useful tool in death time estimation. *Int. J. Legal Med.* 2012 Jan;126(1):79–87.
13. Zhou C, Byard RW. Factors and processes causing accelerated decomposition in human cadavers – An overview. *J. Forensic Leg. Med.* 2011 Jan;18(1):6–9.
14. Vass AA. Beyond the grave - understanding human decomposition. *Microbiol Today* 2001;28:190-2.
15. Knight B. The evolution of methods for estimating the time of death from body temperature. *Forensic Sci. Int.* 1988 Jan;36(1–2):47–55.
16. Henssge C, Madea B, Gallenkemper E. Death time estimation in case work. II. Integration of different methods. *Forensic Sci. Int.* 1988 Oct;39(1):77–87.
17. Vass AA. The elusive universal post-mortem interval formula. *Forensic Sci. Int.* 2011 Jan 30;204(1–3):34–40.
18. Voet D, Voet JG. *Biochimie*. 2e édition. De Boeck; 2005.
19. Duerden BI, Drasar BS, editors. *Anaerobes and Human Disease*. Hodder Arnold; 1990.

20. Matarazzo F, Ribeiro AC, Faveri M, Taddei C, Martinez MB, Mayer MPA. The domain Archaea in human mucosal surfaces. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012 Sep;18(9):834–40.
21. Goulet O. La flore intestinale : un monde vivant à préserver. *J. Pédiatrie Puériculture.* 2009 mai;22(3):102–6.
22. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011 May 12;473(7346):174–80.
23. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature.* 2012 Sep 13;489(7415):220–30.
24. Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* 2012 Jun 14;486(7402):222–7.
25. Grönlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1999 Jan;28(1):19–25.
26. Rougé C, Goldenberg O, Ferraris L, Berger B, Rochat F, Legrand A, et al. Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods. *Anaerobe.* 2010 Aug;16(4):362–70.
27. Ducluzeau R. Ecosystème microbien du tube digestif. *EMC - Gastro-entérologie* 1998:1-0 [Article 9-000-B-20].
28. Marteau P. Microbiote intestinal. *EMC - Gastro-entérologie* 2013:1-8 [Article 9-000-B-20].
29. Doré J, Corthier G. Le microbiote intestinal humain. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 2010 Sep;34(4, Supplement 1):7–16.
30. Orrhage K, Nord CE. Bifidobacteria and lactobacilli in human health. *Drugs Exp. Clin. Res.* 2000;26(3):95–111.
31. Steinberg SM. Bacterial translocation: what it is and what it is not. *Am. J. Surg.* 2003 Sep;186(3):301–5.
32. Girard-Pipau FR, Rambaud JC, Perol Y. Ecologie microbienne du jéjunum supérieur normal et pathologique de l'homme. *Médecine Mal. Infect.* 1981 avril;11(4):238–48.
33. Ghnassia JC. Etude quantitative de la Flore bactérienne intestinale. *Médecine Mal. Infect.* 1979;9(9):507–10.
34. Marteau P. Composition of the caecal flora in healthy humans and comparison with the fecal flora. *Gut* 1996 ; 39 : A135.
35. Schweinburg FB, Seligman AM, Fine J. Transmural migration of intestinal bacteria; a study based on the use of radioactive *Escherichia coli*. *N. Engl. J. Med.* 1950 May 11;242(19):747–51.

36. Plantefève G, Bleichner G. Translocation bactérienne : mythe ou réalité ? *Réanimation*. 2001 Sep;10(6):550–61.
37. Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleva R, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J. Gastroenterol. Hepatol*. 2007 Apr;22(4):464–71.
38. Roy J, Gatt M. Causes of surgical sepsis including bacterial translocation. *Surg. Oxf*. 2012 Dec;30(12):645–50.
39. Sedman PC, Macfie J, Sagar P, Mitchell CJ, May J, Mancey-Jones B, et al. The prevalence of gut translocation in humans. *Gastroenterology*. 1994 Sep;107(3):643–9.
40. O’Boyle C, MacFie J, Mitchell C, Johnstone D, Sagar P, Sedman P. Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut*. 1998 Jan;42(1):29–35.
41. Laffineur G, Lescut D, Vincent P, Quandalle P, Wurtz A, Colombel J-F. Translocation bactérienne dans la maladie de Crohn. *Gastroentérologie Clin. Biol*. 1992;16(10):777–81.
42. McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P, Florin TH. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol*. 2011 Apr;9(4):265–78.
43. Wells CL, Erlandsen SL. Bacterial Translocation: Intestinal Epithelial Permeability. In: Rombeau PJJ, Takala PJ, editors. *Gut Dysfunct. Crit. Illn*. Springer Berlin Heidelberg; 1996. p. 131–49.
44. Moore FA, Moore EE, Poggetti R, McAnena OJ, Peterson VM, Abernathy CM, et al. Gut bacterial translocation via the portal vein: a clinical perspective with major torso trauma. *J. Trauma*. 1991 May;31(5):629–638.
45. Deitch EA. Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings? *Surgery*. 2002 Mar;131(3):241–4.
46. Neutra MR. Current concepts in mucosal immunity. V Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system. *Am. J. Physiol*. 1998 May;274(5 Pt 1):G785–791.
47. Spaeth G, Gottwald T, Specian RD, Mainous MR, Berg RD, Deitch EA. Secretory immunoglobulin A, intestinal mucin, and mucosal permeability in nutritionally induced bacterial translocation in rats. *Ann. Surg*. 1994 Dec;220(6):798–808.
48. Baron P, Traber LD, Traber DL, Nguyen T, Hollyoak M, Hegggers JP, et al. Gut failure and translocation following burn and sepsis. *J. Surg. Res*. 1994 Jul;57(1):197–204.
49. Eleftheriadis E, Kotzampassi K, Papanotas K, Heliadis N, Sarris K. Gut ischemia, oxidative stress, and bacterial translocation in elevated abdominal pressure in rats. *World J. Surg*. 1996 Jan;20(1):11–6.
50. Katayama M, Xu D, Specian RD, Deitch EA. Role of bacterial adherence and the mucus barrier on bacterial translocation: effects of protein malnutrition and endotoxin in rats. *Ann. Surg*. 1997 Mar;225(3):317–26.

51. Deitch EA, Maejima K, Berg R. Effect of oral antibiotics and bacterial overgrowth on the translocation of the GI tract microflora in burned rats. *J. Trauma*. 1985 May;25(5):385–92.
52. Gautreaux MD, Deitch EA, Berg RD. T lymphocytes in host defense against bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Infect. Immun*. 1994 Jul;62(7):2874–84.
53. Albanese CT, Smith SD, Watkins S, Kurkchubasche A, Simmons RL, Rowe MI. Effect of secretory IgA on transepithelial passage of bacteria across the intact ileum in vitro. *J. Am. Coll. Surg*. 1994 Dec;179(6):679–88.
54. Wiest R, Rath HC. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol*. 2003 juin;17(3):397–425.
55. Sherman MP. New concepts of microbial translocation in the neonatal intestine: mechanisms and prevention. *Clin. Perinatol*. 2010 Sep;37(3):565–79.
56. Nadler EP, Ford HR. Regulation of bacterial translocation by nitric oxide. *Pediatr. Surg. Int*. 2000;16(3):165–8.
57. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med*. 2006 Dec;12(12):1365–71.
58. Nowroozalizadeh S, Månsson F, da Silva Z, Repits J, Dabo B, Pereira C, et al. Microbial translocation correlates with the severity of both HIV-1 and HIV-2 infections. *J. Infect. Dis*. 2010 Apr 15;201(8):1150–4.
59. Sandler NG, Koh C, Roque A, Eccleston JL, Siegel RB, Demino M, et al. Host response to translocated microbial products predicts outcomes of patients with HBV or HCV infection. *Gastroenterology*. 2011 Oct;141(4):1220–1230, 1230.e1–3.
60. Langrehr JM, Machens C, Zill E, Leder K, Nüssler A, Hoffman R, et al. Bacterial translocation during graft-versus-host disease after small bowel transplantation is reduced following inhibition of inducible nitric oxide synthesis. *Transplantation*. 2000 Jun 15;69(11):2415–21.
61. Deitch EA, Bridges WM, Ma JW, Ma L, Berg RD, Specian RD. Obstructed intestine as a reservoir for systemic infection. *Am. J. Surg*. 1990 Apr;159(4):394–401.
62. Amar J, Chabo C, Waget A, Klopp P, Vachoux C, Bermúdez-Humarán LG, et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *Embo Mol. Med*. 2011 Sep;3(9):559–72.
63. Lescut D, Colombel JF, Vincent P, Cortot A, Fournier L, Quandalle P, et al. Bacterial translocation in colorectal cancers. *Gastroentérologie Clin. Biol*. 1990;14(11):811–4.
64. Courcol R. Quelles utilisations de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en microbiologie médicale ? *Rev. Francoph. Lab*. 2009 Nov;2009(416):61–4.

65. Weinstein MP. Blood culture contamination: persisting problems and partial progress. *J. Clin. Microbiol.* 2003 Jun;41(6):2275–8.
66. Hédouin V. La translocation bactérienne pre-mortem. [Thèse de Doctorat en Médecine]. Lille 2 : Faculté de médecine; 1993.
67. Morris JA, Harrison LM, Partridge SM. Practical and theoretical aspects of postmortem bacteriology. *Curr. Diagn. Pathol.* 2007 Fev;13(1):65–74.
68. Leclerc H, Gaillard JL, Simonet M. *Microbiologie générale*. 4e édition. Doin; 1998.
69. Oh D-H, Ding T, Jin Y-G. A New Secondary Model Developed for the Growth Rate of *Escherichia coli* O157:H7 in Broth. *Indian J. Microbiol.* 2012 Mar;52(1):99–101.
70. Juneja VK, Marks H, Huang L, Thippareddi H. Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked uncured meat and poultry. *Food Microbiol.* 2011 Jun;28(4):791–5.
71. Code de la construction et de l'habitation. (page consultée le 15/02/2013) - Article R*131-20. [en ligne]. <http://www.legifrance.gouv.fr/>
72. Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, et al. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2010 Jul;51(1):77–84.
73. CCLIN Sud-Est. (page consultée le 11/08/2012). Bonne pratique des hémocultures. Affiches 2008, [en ligne]. <http://cclin-sudest.chu-lyon.fr/>
74. Réseau Régional d'Hygiène de Basse-Normandie. (page consultée le 11/08/2012). Les hémocultures, [en ligne]. <http://www.rrhbn.org/>
75. Denis F, Bingen E, Martin C, Ploy M-C, Quentin R. *Bactériologie médicale*. Elsevier Masson; 2011.
76. Ith M, Scheurer E, Kreis R, Thali M, Dirnhofer R, Boesch C. Estimation of the postmortem interval by means of ¹H MRS of decomposing brain tissue: influence of ambient temperature. *Nmr Biomed.* 2011 Aug;24(7):791–8.
77. Musshoff F, Klotzbach H, Block W, Traeber F, Schild H, Madea B. Comparison of post-mortem metabolic changes in sheep brain tissue in isolated heads and whole animals using 1H-MR spectroscopy--preliminary results. *Int. J. Legal Med.* 2011 Sep;125(5):741–4.
78. Tsokos M, Püschel K. Postmortem bacteriology in forensic pathology: diagnostic value and interpretation. *Leg. Med.* 2001 Mar;3(1):15–22.
79. Maujean G, Guinet T, Fanton L, Malicier D. The Interest of Postmortem Bacteriology in Putrefied Bodies. *J. Forensic Sci.* 2013 Mar 28;
80. Werbrouck A, Manaouil C, Gignon M, Turbant-Castel E, Chatelain D, Jarde O. Le risque infectieux en salle d'autopsie. *J. Médecine Légale Droit Médical.* 2007;50(8):426–39.

81. Malik P, Singh G. Health Considerations for Forensic Professionals: A Review. *Forensic Sci. Policy Manag. Int. J.* 2011;2(1):1–4.
82. Société Française d'Hygiène Hospitalière. (page consultée le 15/02/2013). Avis relatif à l'utilisation de l'eau de Javel dans les établissements de soins - Juin 2006, [en ligne]. <http://www.sfhh.net/>
83. Kugelberg FC, Jones AW. Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: A review of the literature. *Forensic Sci. Int.* 2007 Jan 5;165(1):10–29.
84. Elliott SP. Further evidence for the presence of GHB in postmortem biological fluid: implications for the interpretation of findings. *J. Anal. Toxicol.* 2004 Feb;28(1):20–6.
85. Alan G, Sarah JP. Microbes as forensic indicators. *Trop. Biomed.* 2012 Sep;29(3):311–30.
86. Beránková K, Mutňanská K, Balíková M. Gamma-hydroxybutyric acid stability and formation in blood and urine. *Forensic Sci. Int.* 2006 Sep 12;161(2–3):158–62.
87. Eastlund T. Bacterial infection transmitted by human tissue allograft transplantation. *Cell Tissue Bank.* 2006;7(3):147–66.
88. Malinin TI, Buck BE, Temple HT, Martinez OV, Fox WP. Incidence of clostridial contamination in donors' musculoskeletal tissue. *J. Bone Joint Surg. Br.* 2003 Sep;85(7):1051–4.
89. Boutros M, Al-Shaibi M, Chan G, Cantarovich M, Rahme E, Paraskevas S, et al. *Clostridium difficile* colitis: increasing incidence, risk factors, and outcomes in solid organ transplant recipients. *Transplantation.* 2012 May 27;93(10):1051–7.
90. Doblecki-Lewis S, Palaios E, Bejarano PA, Tzakis AG, Selvaggi G, Morris MI. Hepatic gas gangrene following orthotopic liver transplantation: three cases treated with re-transplantation and a review of the literature. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* 2008 Jul;10(4):280–5.
91. Bos KI, Schuenemann VJ, Golding GB, Burbano HA, Waglechner N, Coombes BK, et al. A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. *Nature.* 2011 Oct 27;478(7370):506–10.
92. Debue-Barazer C. La gangrène gazeuse pendant la première guerre mondiale (Front Occidental). *Ann. Démographie Hist.* 2002;(1):51–70.
93. Jurado V, Porca E, Pastrana MP, Cuezva S, Fernandez-Cortes A, Saiz-Jimenez C. Microbiological study of bulls of indulgence of the 15th-16th centuries. *Sci. Total Environ.* 2010 Aug 1;408(17):3711–5.

Annexes

ETUDE - TRANSLOCATION BACTERIENNE POST-MORTEM PRELEVEMENT SANGUIN – FICHE SUJET A REMPLIR

- Date et heure du prélèvement : / / à h
- Date et heure du décès : / / à h
- Température corporelle (voie rectale) lors du prélèvement : °C
- Sexe du sujet : Féminin Masculin
- Age du sujet lors du décès : ans
- Levée de corps effectuée ? : Oui Non
- Réfrigération avant prélèvement ? : Oui Non
Si oui : Horaire de début - horaire de fin : h → h
Température de la réfrigération :

- Circonstances de découverte du corps :

.....
.....

- Antécédents médico-chirurgicaux

.....

- Présence de critère(s) d'exclusion : Oui Non
Si oui, lequel / lesquels :

<input type="checkbox"/> Incendie	<input type="checkbox"/> Plaie abdominale
<input type="checkbox"/> Contexte fébrile/infectieux	<input type="checkbox"/> Antibiothérapie connue
<input type="checkbox"/> Plaie souillée	<input type="checkbox"/> Autre, préciser :

- Cause de la mort après autopsie :

.....
.....

ANNEXE N°2

Composition des milieux utilisés

Brain Heart cystéiné BH (cœur cervelle)	
Base cervelle cœur	37g
Extrait de levure	5g
Chlorhydrate de cystéine	0,5g
pH 7,4	

Gélose Columbia cystéiné	
Base Columbia	42,5g
Glucose	5g
Chlorhydrate de cystéine	0,3g
Agar	5g
pH 6,8	
<i>Pour la gélose CS ajouter 5% de sang de cheval</i>	

Wilkins-West profond (ww profond)	
Peptone pancréatique de caséine	10g
Peptone de gélatine	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	3g
Chlorhydrate d'arginine	5g
Pyruvate de sodium	5g
Sodium bicarbonate	1g
Chlorhydrate de cystéine	0,5g
Agar	4,5g
Tween 80	5 mL
Hémimine	10 mL
Vitamine K3	10 mL
pH 7,0	

Wilkins-West liquide (WW liquide)	
Peptone pancréatique de caséine	10g
Peptone de gélatine	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	3g
Chlorhydrate d'arginine	5g
Pyruvate de sodium	5g
Sodium bicarbonate	1g
Chlorhydrate de cystéine	0,5g
Tween 80	5 mL
Hémimine	10 mL
Vitamine K3	10 mL
Indicateur d'Andrade	10 mL
pH 7,0	

ANNEXE N°3

Coloration de Gram

Il s'agit de la coloration de référence en bactériologie. Sur un frottis fixé à la chaleur, les étapes suivantes sont effectuées (figure 12) :

- la lame est recouverte de violet de gentiane pendant une minute
- le violet de gentiane est rejeté
- la lame est recouverte de lugol pendant une minute
- le lugol est rejeté
- la lame est décolorée à l'alcool
- la décoloration est stoppée par un lavage à l'eau
- la lame est recouverte de fuchsine diluée
- un nouveau lavage à l'eau est effectué
- la lame est séchée entre 2 feuilles de papier filtre
- la lame est examinée au microscope à l'immersion

Les bactéries à Gram positif apparaissent colorées en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.

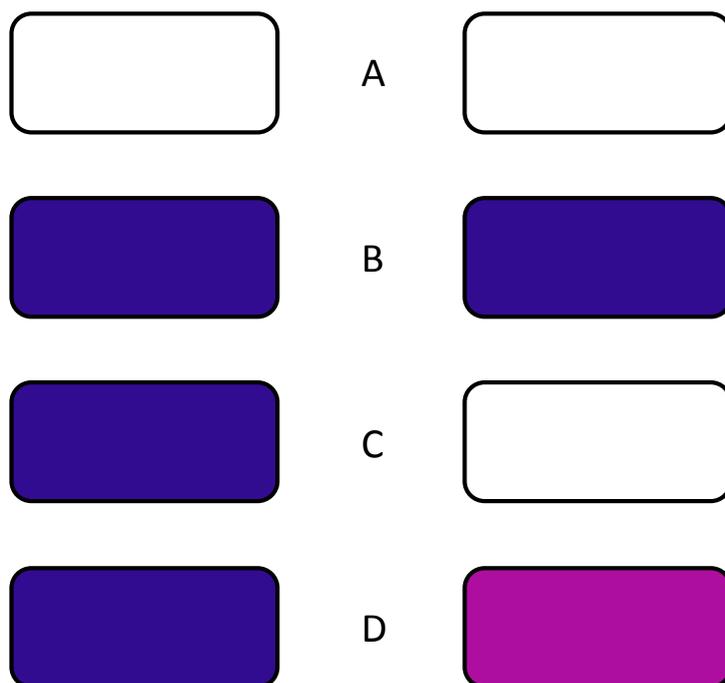


Figure 12 : Principes de la coloration de Gram, à gauche une bactérie à Gram positif et à droite une bactérie à Gram négatif :

- A : bactéries fixées non colorées
- B : bactéries colorées par le violet de gentiane
- C : seules les bactéries à Gram positif restent colorées en violet après l'étape de décoloration
- D : les bactéries décolorées à l'étape précédente sont recolorées en rose par la fuchsine

Référence bibliographique :

Denis F, Bingen E, Martin C, Ploy M-C, Quentin R. Bactériologie médicale. Elsevier Masson; 2011.

ANNEXE N°4

Milieu de Kligler

Le milieu de Kligler est un milieu de culture contenant notamment du lactose et du glucose. Sa couleur est initialement rouge de par son indicateur de pH. La fermentation du glucose ou du lactose se traduit par une acidification qui fait virer au jaune l'indicateur de couleur. Le milieu se dépose dans un tube, une colonie isolée est ensemencée en tenant le tube incliné de manière à obtenir un culot et une pente. Dans le cadre de notre protocole, si la bactérie utilise le glucose, le milieu situé dans le culot devient jaune, il s'agit alors d'une entérobactérie et l'identification bactérienne se fera grâce à une galerie API 20 E. Si la bactérie utilise également le lactose, le milieu devient entièrement jaune, la probabilité d'être en présence d'*Escherichia coli* étant élevée, un test Citrate/Indole est effectué, puis une galerie API 20 E est utilisée s'il ne s'agit pas d'*E. coli*. Si le glucose n'est pas fermenté, le milieu reste rouge, il ne s'agit donc pas d'une entérobactérie et la galerie API 20 NE est alors utilisée.

Test à la catalase

Ce test consiste à mettre en contact la colonie étudiée avec de l'eau oxygénée. La présence de bulles (effervescence due à un dégagement de dioxygène révélant la présence d'une catalase) est considérée comme un test positif (catalase +), son absence comme un test négatif (catalase -).

Un bacille à Gram positif catalase - : bactérie du genre *Lactobacillus*.

Un bacille à Gram positif catalase + : bactérie du genre *Corynebacterium*.

Un coque à Gram positif catalase + : bactérie du genre *Staphylococcus*.

Un coque à Gram positif catalase - : bactérie du genre *Enterococcus* ou *Streptococcus*.

ANNEXE N°5

Galeries API®

Une galerie API® est un ensemble de micro-tests qui permettent de déterminer plusieurs caractères biochimiques d'une souche à identifier. Chaque test contient un substrat différent où la réaction du micro-organisme sera analysée. Les tests sont regroupés par 3, chacun étant associé à une valeur de 1, 2 ou 4. Une valeur est attribuée pour chacun des groupes, correspondant à la somme des valeurs de chaque test (figure 13). La lecture se fait grâce à un code numérique pouvant être traduit avec un dictionnaire.

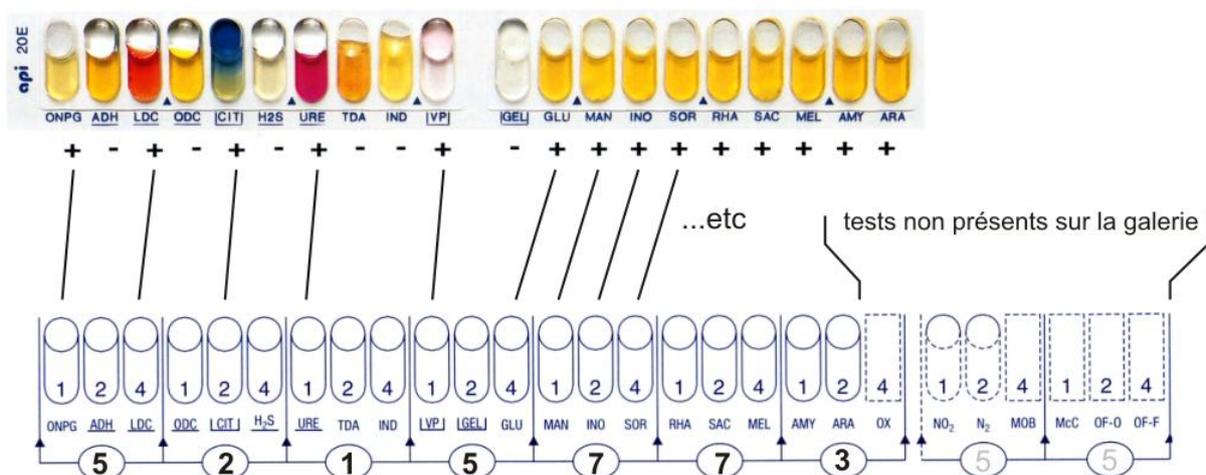


Figure 13: Exemple d'identification de *Klebsiella pneumoniae* par galerie API 20E. Le code numérique est ici 5215773

Référence iconographique :

Département de biologie - Université de Sherbrooke. Biomédias.
<http://pages.usherbrooke.ca/biomedias/>

ANNEXE N°6

Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

La spectrométrie de masse est une technique physique qui permet d'étudier le déplacement de molécules chargées en ions dans des champs électromagnétiques. Ce procédé peut permettre d'identifier des micro-organismes grâce à l'analyse de leur contenu en protéines.

Séquence d'identification (figure 14) : une colonie issue d'une gélose est tout d'abord ionisée grâce à une matrice, généralement un dérivé de l'acide cinnamique, avec laquelle elle est co-cristallisée sur une surface métallique. La source d'énergie est ici un faisceau laser pulsé émettant dans le domaine des ultraviolets. Les ions ainsi générés sont séparés en fonction de leur temps de vol, c'est-à-dire le temps qu'ils mettent à traverser le tube de vol. Ce temps dépend du rapport masse/charge des ions générés (les ions de rapport masse/charge le plus petit arriveront en premier).

Pour chaque groupe d'ions de même rapport masse/charge, un signal (pic) est enregistré, l'ensemble des pics constitue ainsi un spectre de masse. Les spectres générés sont ensuite comparés à des spectres de référence présents dans une base de données (initialement issue de collections internationales). La concordance d'un spectre obtenu à partir d'une bactérie étudiée avec ceux des souches de référence se traduit par un score traduisant le degré de confiance accordable à l'identification (tableau 3, figure 15).

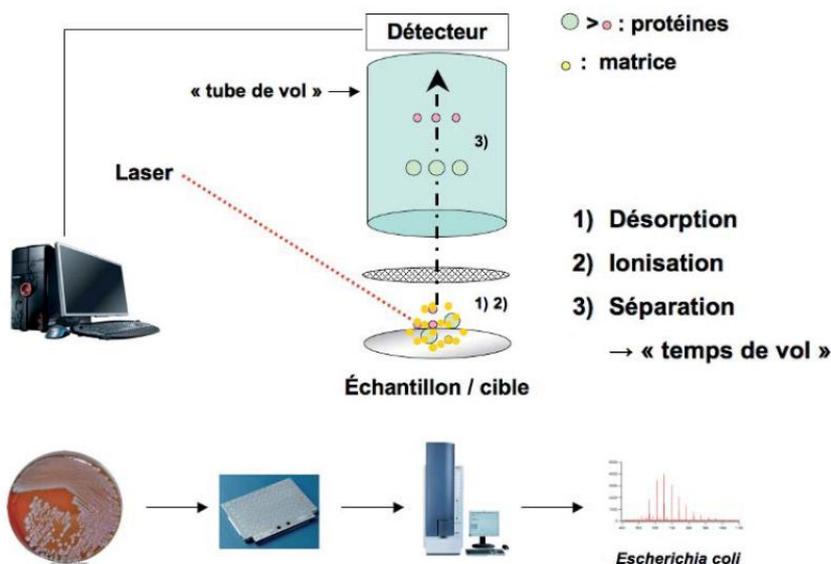


Figure 14 : Principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

Score	Description	Symbole
2.300 – 3.000	Forte probabilité d'identification à l'espèce	+++
2.000 – 2.299	Identification du genre sécurisée, identification à l'espèce probable	++
1.700 – 1.999	Identification au genre probable	+
0.000 – 1.699	Degré de confiance insuffisant pour l'identification	-

Tableau 3 : Score de concordance des spectres obtenus à partir d'une bactérie d'intérêt avec ceux de la base de données Biotyper

Analyte5



Nom de l'échantillon: D5
Description de l'échantillon:
ID de l'échantillon: VM4-17
Date/Heure de création de l'échantillon: 2013-05-06T14:15:14.218Z
Bibliothèque de MSP utilisée: Bruker + Biotox (sans Shigella, sans Salmonella typhi)
Arbre de taxonomie utilisé:

Classement (Qualité)	Profil de référence	Score	Identifiant NCBI
1 (+++)	Clostridium perfringens RV_BA_03_D LBK	2.432	1502
2 (+++)	Clostridium perfringens HU51221 PNU	2.356	1502
3 (+++)	Clostridium perfringens DSM 628 VML	2.318	1502
4 (+++)	Clostridium perfringens HU65618 PNU	2.307	1502
5 (++)	Clostridium perfringens DSM 11778_3d VML	2.292	1502
6 (++)	Clostridium perfringens DSM 756T VML	2.291	1502
7 (++)	Clostridium perfringens DSM 798 VML	2.217	1502
8 (++)	Clostridium perfringens DSM 11784 VML	2.139	1502
9 (+)	Clostridium perfringens DSM 11781 VML	1.879	1502
10 (-)	Campylobacter jejuni ATCC 29428 THL	1.272	197

Figure 15 : Exemple de résultat d'une identification - Les scores élevés et les espèces identiques proposées permettent d'identifier *C. perfringens* avec certitude

Références bibliographiques :

N. Blondiaux, O. Gaillot and R. J. Courcol. Identification bactérienne de routine par spectrométrie de masse MALDI-TOF au CHU de Lille : impact médical et économique, EuroReference 2011, No. 5, ER05-11M01

Courcol R. Quelles utilisations de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en microbiologie médicale ? Rev. Francoph. Lab. 2009 Nov;2009(416):61–4

