

Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Entomologie forensique et datation de
la mort.**

Présenté par :

ABDOUNE Ahlam & ACHOUR Hayat

Soutenu le : **21 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mr. BENS Aid Karim

Mr. AMIR Nadir

Mr. TOUMI Moussa

Mr. BELHADI Djilali

MAA

MCA

INCC/GN

MCB

Président

Encadreur

Co-Encadreur

Examineur

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

Aucune œuvre humaine ne peut se réaliser sans la contribution d'autrui. Il est donc important pour nous, d'adresser nos sincères remerciements à toutes les personnes qui nous ont contribué à réaliser notre mémoire.

Nous remerciant dieu qui nous aide et nous donne la patience et le courage d'accomplir ce Modeste travail.

On tient à exprimer notre profondes gratitudes à :

Mr AMIR Nadir notre encadreur, pour son aide précieuse, ses inestimables conseils pleins d'orientations pédagogiques et sa disponibilité durant toute la période de ce travail.

Mr TOUMI Moussa ainsi que l'ensemble du personnel de L'INCC/GN pour leur accueil et généreuse contribution dans l'identification des espèces.

Mr BENSALD Karim, pour l'honneur qu'il nous fait de présider le jury de soutenance.

Mr BELHADI Djillali, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Mr KERROUCHE, pour avoir accepté notre invitation, et sa contribution dans l'interprétation des résultats.

Mr BAHJA pour avoir pris de son temps pour l'examen des coupes histologiques.

Mme YAHY Hakima et l'ensemble du personnel du laboratoire d'anatomopathologie de la faculté de médecine de l'université Abderrahmane Mira Bejaia.

Mme RAHMANI Dallila, pour sa disponibilité et ses facilitations au laboratoire de microbiologie de l'université A. Mira de Bejaia.

Enfin, nous exprimons notre gratitude à toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Merci à tous et à toutes.

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Glossaire

Page

Introduction..... 01

Synthèse bibliographique

Partie I. Entomologie médico-légal 03

I.1. Généralités 03

I.2. Intérêt de l'entomologie médico-légal 03

I.3. Écosystème cadavérique et dégradation de la matière par les insectes 04

I.3.1. Entomofaune cadavérique 04

I.3.2. Décomposition d'un cadavre à l'air libre 04

I.4. Estimation de L'IPM grâce aux insectes nécrophages 05

I.4.1. Méthode pour estimer l'IPM court 05

I.4.2. Méthode pour estimer l'IPM long 06

I.5. Facteurs limitant le calcul de l'IPM 07

I.5.1. Température 07

I.5.2. Hygrométrie 07

I.5.3. Vent 07

I.5.4. Lumière 07

Partie II. Nécrobiome et activité antibactérienne 08

II.1. Nécrobiome 08

II.2. Action des larves sur les bactéries 08

Partie III. Histologie post-mortem des tissus 09

TABLE DES MATIERES

Matériels et Méthodes

Partie I. Entomologie médico-légal	10
I.1. Présentation du site de l'étude et du lieu de stage	10
I.2. Conditions climatiques.....	10
I.3. Matériel utilisé	10
I.3.1. Matériel de terrain	10
I.3.2. Matériel de laboratoire	10
I.3.3. Matériel d'identification	11
I.4. Protocole suivie sur terrain	11
I.4.1. Prélèvements, conditionnement et acheminement	12
I.4.1.1. Prélèvement des insectes adultes	12
I.4.1.2. Prélèvement des larves	12
I.5. Protocole suivie au laboratoire	12
I.5.1. Elevage	12
I.5.2. Épinglage	13
I.5.3. Identification	13
I.5.4. Étiquetage	13
I.6. Détermination de l'intervalle post-mortem court	13
Partie II. Nécrobiome et activité antibactérienne	15
II.1. Nécrobiome	15
II.1.2. Prélèvement sur terrain	15
II.1.3. Examens bactériologiques	15
II.2. Activité antibactérienne des larves	15
II.2.1. Méthode par écrasement des larves	15
II.2.2. Méthode par injection des larves	16
Partie III. Histologie post mortem des tissus	17

TABLE DES MATIERES

III.1. Mode opératoire	17
III.1.1 Sur terrain	17
III.1.2 Au niveau de laboratoire	17
III.1.2.1 Fixation et incubation	17
III.1.2.2 Enrobage et confection des coupes	18
III.1.2.3. Coloration et montage des coupes	19
III.1.2.4 Observation microscopique	20

Résultats et discussions

Partie I. Entomologie médico-légale	21
I.1. Stades de décomposition	21
I.2. Détermination de l'ordre d'arrivée des escouades	23
I.2.1. Inventaire et identification des espèces adultes capturées	23
I.2.2. Identification des larves prélevées	26
I.3. Détermination de l'intervalle post-mortem	28
Partie II. Nécrobiome et activité antibactérienne	31
II.1. Résultats des examens bactériologiques	31
II.1.1. Entérocoques	31
II.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	32
II.2. Activité antibactérienne des larves	34
II.2.1. Méthode par écrasement	34
II.2. 2. Méthode par injection	34
Partie III. Histologie post mortem des tissus	38

Conclusion et perspectives

I. Conclusion et perspectives	41
-------------------------------------	----

Références bibliographiques

Annexes

Dédicace

A mes très chers parents << Mustapha et Djamila >>

*Je vous dois ce que je suis aujourd'hui grâce à votre amour,
votre patience et vos innombrables sacrifices.*

*Que ce modeste travail, soit pour vous une petite compensation
et reconnaissance envers tout ce que vous avez fait pour moi.*

*Que dieu, le tout puissant vous préserve et vous procure santé et
longue vie, afin que je puisse à mon tour vous combler.*

A mes chers frères Faouzi, Idir, Hani et mon beau frère Hamza

*Malgré la distance, vous êtes toujours dans mon cœur. Je vous
dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de
réussite.*

*A mes très chères sœurs Abla et Chahra sans oublier mon
ange belle sœur Chahra*

*Aucun dédicace ne serait exprimer profondément ce que je
ressens envers vous. Je vous dirais tout simplement merci, je
vous aime.*

Je dédie ce travail aussi

*A mon cher Massi et à tous mes amis(es) : Soria, Dania, Cilia,
Salwa, Kahina, Hanan, Tawes, Ilham, Nacira, Siham, Mohand
et Lamine sans oublier ma chère binôme hayat.*

*Aux honorables professeurs et au noble promoteur Dr AMIR
nadir.*

A toute la promotion master II Microbiologie.

*A toute la famille et tous ce qui m'ont aidée de près ou de loin
dans la réalisation de ce travail.*

Ahlam

Dédicaces

Je tiens à dédier ce travail :

A mon très cher père, Achour, pour avoir été le meilleur enseignant que je n'ai jamais eu et sans qui je n'aurai jamais pu arriver là où je suis.

A ma très chère mère Mbarka, pour l'éducation qu'elle m'a inculquée, pour avoir toujours cru en moi et pour m'avoir toujours grandement encouragée tout au long de ma vie.

*A mes chère frères hamid et massi , je vous dédie ce travail avec
Tous mes voeux de bonheur et de réussite.*

*A mes chères sœurs nacira, kenza et thanina, Je vous exprime, mes plus
grands sentiments de fraternité et d'amour.*

A mes chers grand parents et mes oncles Azdine ,nacima et zahra.

*A mon très cher et exceptionnel Lamine pour ta précieuse aide, tes
encouragements. Je te remercie du fond Du coeur pour ton soutien moral
et ta gentillesse sans égal. Que Dieu réunisse nos Chemins.*

*A ma chère binôme Ahlam et sa famille pour sa gentillesse et pour le
sérieux avec lequel elle a su diriger la réalisation de ce travail.
Aux honorables professeurs et au noble promoteur Dr AMIR nadir.*

A toute la promotion master II microbiologie.

A tous mes amis Soria, chifa, et massi.

Hayat

Liste des figures

Figure 1: Délais d'efficacité des méthodes d'estimation du délai post mortem.....	5
Figure 2: Cycle d'un diptère (<i>calliphora vicina</i>).....	6
Figure 3: Protocole suivis sur le terrain.	11
Figure 4: Injection des larves avec différentes suspensions bactériennes.	16
Figure 5: Prélèvement pour examens histologiques.....	17
Figure 6: Fixation et d'incubation des coupes histologiques.	18
Figure 7: Enrobage et déparaffinage des coupes histologiques.....	19
Figure 8: coloration des coupes histologiques.....	20
Figure 9: Les différents stades de décomposition.....	22
Figure 10: Répartition des ordres capturés.....	25
Figure 11: Répartition des diptères capturés.....	25
Figure 12: Répartition des coléoptères capturés.....	25
Figure 13: Critères d'identification de <i>Calliphora vicina</i>	28
Figure 14: Détermination de l'IPM court.....	30
Figure 15: Evolution quantitative post-mortem des Entérocoques dans le temps.....	31
Figure 16: Evolution quantitative post-mortem de <i>S.aureus</i> dans le temps.....	32
Figure 17: Dissémination des bactéries par les larves.....	33
Figure 18: Progression de la charge <i>S.aureus</i> injectée aux larves de <i>C.vicina</i> au stade L3....	37
Figure 19: Progression de la charge <i>E. coli</i> injectée aux larves de <i>C. vicina</i> au stade L3....	38
Figure 20 : Aspect du tissu cardiaque de lapin après la mort.....	40

Liste des tableaux

Tableau I : Elevages effectués au laboratoire.....	13
Tableau II: températures spécifiques de développement de certaines espèces.....	14
Tableau III: Souches injectées aux larves.....	17
Tableau IV : Inventaire de la faune cadavérique collectée.....	24
Tableau V : Identification des larves prélevées sur les trois cadavres.....	26
Tableau VI: Tableau comparatif de l'ordre d'arrivée des escouades.....	27
Tableau VII : Emergence des imagos après élevage.....	28
Tableau VIII : donnés pour le calcul de l'IPM.....	29
Tableau IX: Résultats de l'injection des larves aux stades L2 et L3.....	35
Tableau X : Résultats de l'injection des larves aux stades L3.....	36

Glossaire

Autolyse: destruction des tissus vivant par leurs enzymes, sans agent extérieur dès l'arrêt de l'écoulement du sang.

Forensique: (de l'anglais *forensic*) ; terme désignant les sciences qui ont pour objet d'apporter des preuves objectives pour la justice.

Imago: désigne le stade final d'un individu dont le développement se déroule en plusieurs phases (en général œuf, larve, imago). Ce terme est en général utilisé pour les arthropodes, mais aussi pour les amphibiens.

IPM: (intervalle post-mortem) est le temps écoulé entre le décès et la découverte du cadavre.

Lividités cadavériques :(ou *livor mortis*) est une coloration rouge à violacée de la peau liée à un déplacement passif de la masse sanguine vers les parties déclives du cadavre, qui débute dès l'arrêt de l'écoulement du sang.

Nécrobiome: l'ensemble des bactéries que recèle un cadavre que l'on pourrait aussi appeler le microbiome post-mortem.

Nécrophage : qui se nourrit de cadavres.

Nécropsie : correspond à un examen anatomopathologique pratiqué sur un cadavre.

Nymphe: état transitoire entre la larve et l'état adulte à la métamorphose complète.

Pupe: phase intermédiaire entre le dernier stade larvaire et l'imago (adulte). Elle se compose d'une enveloppe rigide, le puparium, à l'intérieur duquel la larve va se métamorphoser. Le puparium se forme à partir de la dernière mue larvaire qui ne sera pas expulsée, mais qui va se rigidifier et ainsi créer une structure protectrice pour l'insecte. Le stade pupa est une phase longue et immobile où l'insecte est vulnérable. On retrouve donc le plus souvent les pupes à distance du cadavre (0-5 mètres), dans le sol ou au niveau d'obstacles (souches, roches, *etc.*).

Putréfaction: décomposition de matières organiques par des bactéries et des champignons.

Rigidité cadavérique: (ou *rigor mortis*) est un enraidissement progressif de la musculature causé par des transformations biochimiques irréversibles affectant les fibres musculaires au cours de la phase *post-mortem* précoce. Cet état disparaît habituellement lorsqu'apparaît la putréfaction c'est-à-dire au bout de deux à quatre jours selon les circonstances.

Introduction

Lors de la découverte d'un cadavre humain, les enquêteurs judiciaires ont besoin de déterminer précisément la date et l'heure du décès. Grâce à l'étude des caractéristiques du corps et de son état de décomposition, la médecine légale peut généralement fournir cette information. Ainsi, la présence de rigidités cadavériques, l'étude des lividités ou la mesure de la température rectale sont autant de méthodes permettant d'estimer précisément l'heure du décès. Cependant, ces techniques ne sont efficaces que durant une courte période, voir quelques jours après le décès. L'estimation de l'intervalle post mortem (IPM) par les critères thanatologiques classiques devient alors, délicate et imprécise (Charabidze, 2008).

L'estimation de l'IPM constitue le point de départ souvent indispensable à l'identification de la (des) victime(s) et des circonstances du décès. De ce fait, la détermination de l'IPM a été largement étudiée dans le cadre de la médecine légale, mais également par d'autres disciplines (l'entomologie médico-légale, l'anthropologie, la bactériologie, l'écologie, etc...). Ce sont autant de méthodes permettant chacune, dans leurs domaines d'application, d'estimer le moment de la mort. Toutes ne sont bien entendues pas équivalentes, et chacune présente ses contraintes et ses avantages (Beauthier, 2007). La seule méthode fiable permettant de dater le décès est alors l'entomologie médico-légale. Cette branche de l'entomologie, rattachée aux sciences criminelles, s'intéresse à l'étude des insectes nécrophages pour estimer le délai écoulé depuis le décès (Charabidze, 2008).

L'utilisation des insectes pour dater le décès n'est pertinente que lorsque les techniques de datation médico-légale deviennent inefficaces, c'est à -dire environ deux jours après le décès (Marchenko, 1988). En effet, durant les premières heures post mortem, le développement des insectes sur le cadavre est insuffisant pour apporter une datation précise, ou du moins plus précise que celle réalisée par les médecins légistes. L'utilisation d'œufs de diptères Calliphoridae pour estimer un IPM très court peut cependant se révéler utile et fiable lorsque les prélèvements sont réalisés immédiatement et conservés à température strictement contrôlée (Bourel et *al.*, 2003).

INTRODUCTION

Aussi, depuis quelques années, les chercheurs se sont tournés vers d'autres hôtes encore plus microscopiques que les insectes ; les bactéries. L'idée se tient ; avec une population se dénombrant en milliers de milliards répartie en plusieurs centaines d'espèces à la surface et à l'intérieur de notre corps.

La présente étude a été conçue pour répondre à cinq objectifs principaux :

- Récolter puis identifier la faune cadavérique qui est associée au processus de décomposition d'un cadavre animal ; spécifique de la région dite Akabaou à l'ouest de Darguina, wilaya de Bejaia et déterminer l'ordre d'arrivée des différentes escouades durant la période hiverno-printanière.
- Détermination de l'IPM dans le but d'estimer la date de la mort en se basant sur le cycle d'évolution d'une espèce particulière.
- Etude de l'évolution quantitative de deux espèces bactérienne (*Staphylococcus aureus* et les Entérocoques) durant la phase post-mortem.
- Etudier l'impact du développement des larves des insectes nécrophages sur l'évolution des quelques espèces bactériennes.
- Suivie de la dégradation post-mortem des tissus de quelques organes par l'analyse des coupes histologiques.

Partie I. Entomologie médico-légal

I.1. Généralités

L'entomologie médico-légale et criminelle étudie les liens qui existent entre l'activité des insectes et les différents stades de décomposition d'un cadavre. Néanmoins, cette discipline reste exclusivement consacrée à l'étude des insectes nécrophages pour l'estimation du délai poste mortem (Charabidze, 2012). Leur participation active dans le processus de décomposition est un phénomène naturel qui a trouvé une utilité dans les enquêtes criminelles. Les larves de Diptères, collectées soigneusement sur un cadavre humain et son environnement, sont principalement utilisées par des spécialistes en criminalistique comme de véritables horloges biologiques en mesure d'estimer la période écoulée entre le décès d'une victime et la découverte du corps.

Une première affaire criminelle aurait été résolue avec l'aide des insectes au treizième siècle en Chine. Mais, les bases de l'entomologie criminelle ont été posées en France à la fin du dix-neuvième siècle par le vétérinaire Jean Pierre Mégnin (1828-1905) qui publia en 1894, la faune cadavérique ; il décrivait huit vagues d'insectes qui se succèdent sur les cadavres en décomposition et dont l'étude permet de dater précisément la mort (Amendt et *al.*, 2007; Wyss et Cherix, 2013).

L'entomologie médico-légale a été appliquée en Algérie depuis 2011 par le laboratoire d'entomologie de l'Institut National de Criminalistique et de Criminologie de la Gendarmerie Nationale (INCC /GN) Bouchaoui-Alger ; plus de 200 affaires ont été traitées. Les insectes nécrophages ont été étudiés académiquement en collaboration avec l'INCC/GN et des universités (plus de 16 projets de recherche de fin d'études sur l'entomologie).

I.2. Intérêt de l'entomologie médico-légale

La détermination de la période d'activité des insectes sur le corps correspond à l'IPM. L'estimation de ce délai est basée sur la détermination de la période de ponte des premières espèces de diptères nécrophages venues coloniser un corps. Elle peut s'appuyer sur l'étude des successions de différentes communautés d'arthropodes au cours de la décomposition.

En effet, cette période d'activité des insectes peut être bien inférieure à l'IPM. Le délai d'accessibilité au corps par ces organismes peut être variable en raison de mauvaises conditions climatiques, ou d'une action humaine. En règle générale, on considère qu'il y a concomitance entre la ponte et le décès (Hamel, 2011).

I.3. Écosystème cadavérique et dégradation de la matière par les insectes

I.3.1. Entomofaune cadavérique

Au sein des écosystèmes terrestres, les insectes sont généralement les premiers organismes à arriver sur le corps peu après la mort et le colonisent selon une séquence plus ou moins prédictible (Anderson, 2001). Les insectes utilisent le micro-habitat créé par le cadavre comme un substrat nourricier, un site de pontes (reproduction), un refuge ou encore comme un territoire de chasse. Parmi ces insectes on distingue les espèces nécrophages qui se nourrissent des tissus cadavériques et des liquides de décomposition. On peut citer parmi cette catégorie les diptères appartenant aux familles des calliphoridae et des Sarcophagides, mais également des coléoptères des familles des silphidés et des dermestidés (Wyss et Cherix, 2006).

I.3.2. Décomposition d'un cadavre à l'air libre

La décomposition d'un cadavre est le résultat des actions combinées de l'autolyse et de la putréfaction (Marchenko, 2001). C'est une série de processus dynamiques qui vont induire des changements chimiques et physiques, qui entraînent un ensemble de modifications morphologiques post-mortem appelé thanatomorphose (Campobasso *et al.*, 2001). Grâce à l'étude de ces modifications, il est possible d'estimer le moment de la mort, les processus de décomposition s'enclenchent plus ou moins rapidement selon les conditions environnementales. Les scientifiques divisent le processus de décomposition en quatre stades (Anderson 2001) :

- ✓ Le stade initial.
- ✓ Le stade de gonflement.
- ✓ Le stade de décomposition active.
- ✓ Le stade de décomposition avancée.

I.4. Estimation de L'IPM grâce aux insectes nécrophages

Lorsque la mort remonte à plus de 72h ou que les signes de putréfaction avancée sont visibles, les techniques classiques usuelles (méthodes thermométriques, rigidités,...) ne sont plus efficaces pour évaluer le moment du décès. La seule méthode fiable permettant de dater le décès est alors l'entomologie médico-légale; dont la présence des insectes sur la scène du décès, sont de meilleurs bio-indicateurs pour dater la mort. La figure1 illustre les délais d'efficacité des méthodes d'estimation de l'IPM.

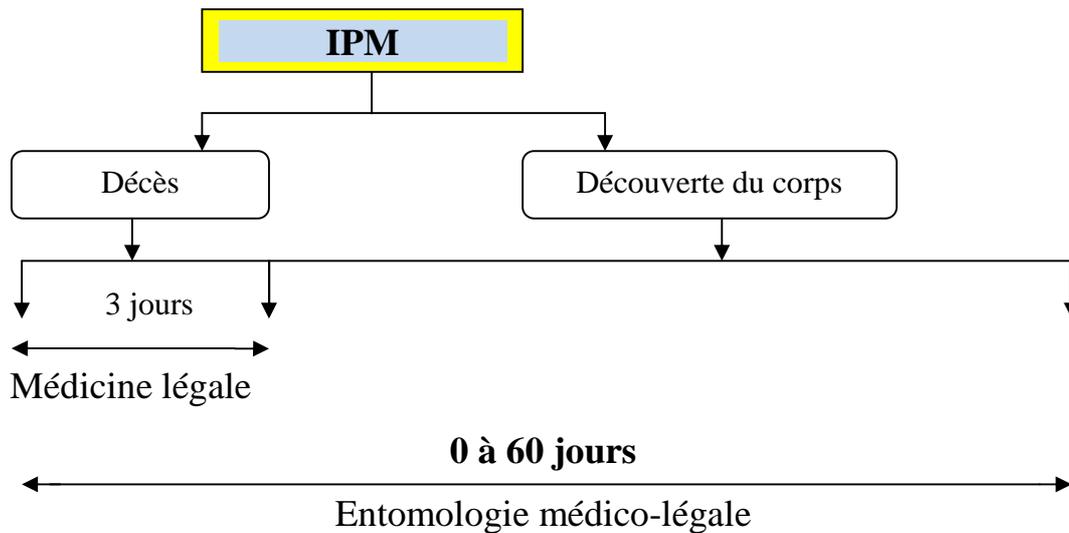


Figure 1: Délais d'efficacité des méthodes d'estimation de l'IPM.

Il existe principalement deux méthodes pour déterminer l'IPM en utilisant les insectes comme bio-indicateurs ; la première est basée sur l'étude des premiers intervenants constitués essentiellement de diptères, par contre la deuxième est basée sur l'étude de l'ordre de succession des différents groupes d'insectes qui colonisent un cadavre (Anderson, 2005 ; Wyss et Cherix, 2006).

I.4.1. Méthode pour estimer l'IPM court

Elle est fondée sur la connaissance précise des cycles de développement des insectes nécrophages principalement les Calliphoridae et des variations engendrées par les diverses conditions écologiques, et en particulier la température et l'hygrométrie. Dans des conditions équivalentes, chaque espèce d'insecte présente des durées particulières pour chacun des stades de développement. Classiquement, le développement d'un insecte

nécrophage est de type holométabole, c'est à dire qu'il est divisé en quatre phases distinctes : l'œuf, la larve, la nymphe et l'adulte ou imago (Hamel, 2011). La figure 2 illustre le cycle de développement des Diptères Calliphoridae.

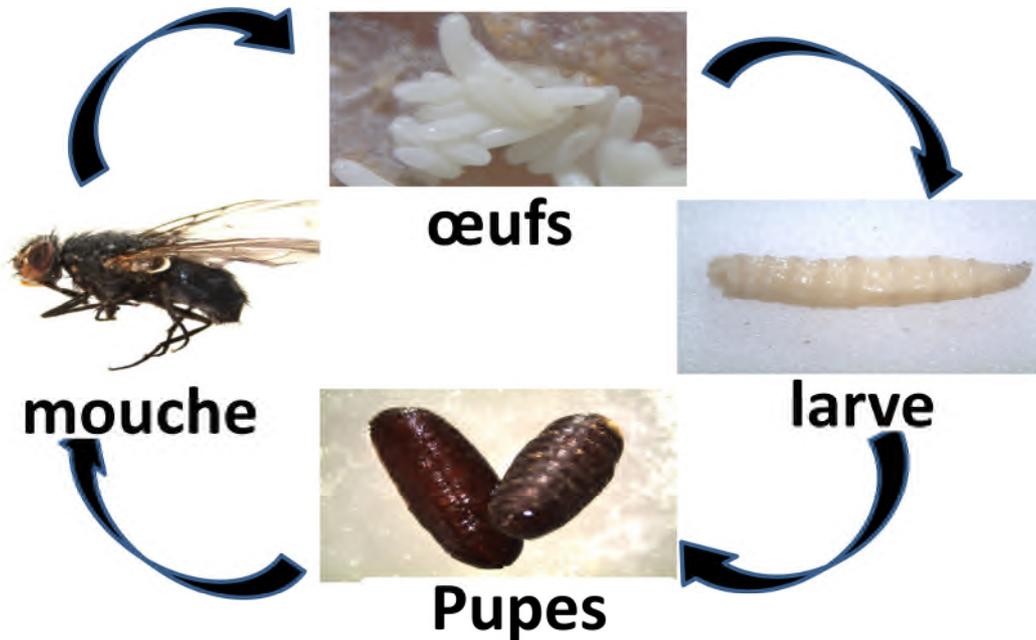


Figure 2: Cycle d'un diptère (*calliphora vicina*) (photos originales).

I.4.2. Méthode pour estimer l'IPM long

Ils s'agit de reconstituer l'histoire de la colonisation du corps par les insectes, différentes tentatives de schématisation existent ; elles consistent à diviser la communauté d'insectes nécrophages en vagues ou escouades se succédant dans des conditions normales sur le cadavre. Ainsi, Mégnin, en 1894, a réparti les arthropodes rencontrés sur les cadavres humains en huit escouades colonisant le corps au fur et à mesure de sa décomposition (Mégnin, 1894). Il existe cependant des chevauchements d'escouades, leur activité étant dépendante des modifications du substrat, des conditions météorologiques, de la taille et de la situation du corps. De même, certaines escouades peuvent manquer, ce qui apporte d'autres informations aux enquêteurs (Hamel, 2011).

I.5. Les facteurs limitant le calcul de l' IPM

I.5.1. Température

Le développement des insectes est rythmé par les températures ambiantes et leur variation ainsi que la photopériode (Turchetto et *al.*, 2004). Il existe des seuils thermiques inférieures et des seuils thermiques supérieurs au-delà des quels les insectes nécrophages sont inactifs ou meurent (Faucherre et *al.*, 1999). Les températures sont des bio-indicateurs potentiels dans l'estimation de l'IPM, compte tenu de leur lien directe avec le développement des diptères nécrophages (Marchenko, 1988). Une élévation de la température tend à accélérer les cycles évolutifs alors qu'un refroidissement accroît sa durée.

I.5.2. Hygrométrie

L'humidité est un facteur important pour la ponte chez de nombreux diptères nécrophages, parfois les fluctuations déclenchent des phases d'inertie évolutive. L'élévation du degré de l'hygrométrie n'est pas aussi dangereuse que la sécheresse pour l'épanouissement des larves, la déshydratation peut leur être fatal. La résistance au froid et à la chaleur est sous la dépendance du degré hygrométrique de l'air ambiant, si celui-ci est faible, il entraîne une dessiccation rapide de tout cadavre exposé à l'air libre, ce qui influe sur la succession des Arthropodes et favorise la colonisation par les espèces qui se nourrissent de matières organique desséchées, dont certains coléoptères du genre dermestes et certains lépidoptères.

I.5.3. Vent

Le vent est un facteur défavorable à l'activité des diptères, il perturbe le sens olfactif des mouches rendant la localisation et la ponte sur le cadavre difficile : un vent faible diminue l'activité des calliphoridae et un vent violent l'interrompt complètement.

I.5.4. Lumière

La lumière influence directement sur la ponte puisque la plupart des insectes nécrophages comme les calliphoridae ont des activités diurnes (Nabity, 2007).

Partie II. Nécrobiome et activité antibactérienne

II.1. Nécrobiome

Le nécrobiome est l'ensemble des bactéries que recèle un cadavre. Pour dater le moment d'un décès, les experts de la police scientifique font appel à plusieurs méthodes dont l'entomologie. Néanmoins, d'autres techniques sont en cours d'exploration, il s'agit du microbiome post-mortem.

En pratique médico-légale, les phénomènes microbiologiques intervenant dans la putréfaction du cadavre pourraient contribuer à l'évaluation du moment de la mort. Dans l'interprétation des examens bactériologiques post-mortem, la décroissance thermique corporelle post-mortem et l'anaérobiose semblent être les facteurs déterminants dans 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 (Mesli, 2013).

L'avènement des techniques de séquençage de nouvelle génération a permis aux scientifiques d'explorer l'éventualité de déterminer l'IPM en caractérisant les fluctuations des bactéries qui fleurissent dans tous les coins et recoins des restes humains, qui agissent comme les principaux moteurs du processus de décomposition. En effet, les insectes peuvent être absents, alors que les bactéries seront toujours présentes.

II.2. Action des larves sur les bactéries

L'émergence des bactéries résistantes, implique la recherche permanente d'autres sources d'antibiotiques. À ce jour, les insectes ont été relativement négligés en tant que sources potentiel de substances antimicrobiennes.

L'activité antimicrobienne de la larve de mouche a été longtemps soupçonnée et fut démontrée scientifiquement pour la première fois dans les années 1930. Car les asticots désinfectent généralement efficacement les plaies et blessures tout en les nettoyant. Ce phénomène est très probablement dû à certains facteurs compris dans les sécrétions des asticots et leur système digestif, qui contribueraient à réduire le nombre d'organismes pathogènes. Les larves seraient capables d'éradiquer certaines bactéries. Les raisons sont

mal connues; certaines sécrétions larvaires auraient une action antibactérienne, d'autres rendraient le milieu moins propice à la prolifération microbienne par une élévation du pH. Les bactéries ingérées ne survivraient pas au passage dans le système digestif des larves (Mumcuoglu et *al.*, 2001).

Partie III. Histologie post-mortem des tissus

L'autopsie médico-légale tient un rôle central dans les enquêtes judiciaires, en particulier la nécropsie qui correspond à l'examen anatomopathologique pratiqué sur un cadavre. Au décours de ces autopsies, il est habituel de réaliser de multiples prélèvements pour examen anatomopathologique. L'anatomie pathologique peut permettre de répondre à certaines interrogations posées dans le cadre de l'enquête judiciaire. Par exemple, la présence d'un infiltrat inflammatoire dans les berges d'une plaie permet d'affirmer le caractère poste mortem, et la nature de cet infiltrat aide à déterminer le temps de survie de la victime. Il est ainsi possible d'évaluer l'ancienneté d'ecchymoses ou d'autres blessures, en particulier de déterminer s'il existe des lésions d'âge différent, ce qui est particulièrement important dans des contextes de maltraitance. Dans certains décès d'origine traumatique, l'analyse histologique permet de préciser la cause du décès, comme cela peut être le cas lors d'un traumatisme crânien ou d'un polytraumatisme.

La mise en évidence d'un état pathologique antérieur susceptible d'avoir contribué au décès peut également avoir une importance capitale dans la qualification des faits. L'anatomie pathologique offre de nombreuses applications en pratique médico-légale.

Cependant, l'histologie standard manque encore de précision dans divers domaines, comme par exemple la datation des plaies, et la recherche et la validation de nouveau marqueur semblent indispensables afin d'améliorer la pertinence et la fiabilité de l'examen anatomo-pathologique (Gauchotte, 2014).

Partie I. Entomologie médico-légal

I.1. Présentation du site de l'étude et du lieu de stage

Le site choisit pour le déroulement de notre expérience, à savoir sacrifice des animaux, prélèvement des larves, pupes et insectes se trouve au lieu dit Akabaou à l'ouest de DARGUINA, wilaya de Bejaia à une altitude de 163 m. L'élevage a été effectué au niveau du laboratoire de l'université A.MIRA de Bejaia. L'identification de la faune cadavérique a été effectuée au niveau du laboratoire d'entomologie de l'Institut National de Criminalistique et de Criminologie de la Gendarmerie Nationale (INCC /GN), Bouchaoui-Alger.

I.2. Conditions climatiques

Notre expérience a été effectuée à l'extérieur ; donc sous l'influence de plusieurs paramètres météorologiques qu'il fallait prendre en considération. Afin de pouvoir caractériser le climat de cette région, les principaux paramètres retenus sont ; la température, l'humidité relative, la vitesse du vent ainsi que le taux de précipitations.

La période hiverno-printanière est caractérisée par un climat froid et humide, avec une température moyenne enregistrée de 13°C, alors que le taux d'humidité variait entre 75% et 90%. Les précipitations moyennes journalières étaient de 6mm, alors que la vitesse maximale du vent a atteint parfois 52Km/h.

I.3. Matériel utilisé

I.3.1. Matériel de terrain

Pour la réalisation de ce travail nous avons eu besoin de cinq lapins albinos, un couteau bien aiguiser, des Cages métalliques avec des mailles de 2 cm de diamètre qui laissent passer les insectes, des gants et bavettes, cuillères, pièges pour les insectes volants, filet fauchoir, un appareil photos numérique et un thermomètre.

I.3.2. Matériel de laboratoire

Pour l'élevage, nous avons eu besoin de flacons et récipients en plastique avec couvercle, viande rouge. Alors que pour la conservation nous avons utilisé l'éthanol 70%.

I.3.3. Matériel d'identification

Pour l'identification des insectes et des larves, le laboratoire d'entomologie de l'institut national de criminologie et de criminalistique a mis à notre disposition, des loupes binoculaires (Agrandissement 50x), Pincettes, et aiguilles, ainsi que des clés d'identification.

I.4. Protocole suivie sur terrain

Cinq lapins de 2 à 3kg ont été achetés d'une ferme d'élevages à la localité d'Ait smail (Bejaia) puis transportés vers le site d'expérimentation à DARGUINA (zone forestière). Un trou de 1m x 1m sur 8cm de profondeur a été creusé, dans lequel nous avons déposé un drap et recouvert de terre, afin d'empêcher la migration des larves à l'extérieur du dispositif conçu (Figure 3). Le tout couvert de cages métalliques de 50cm x 80cm, grillagée à mailles fines permettent l'accès des insectes tout en protégeant les cadavres des prédateurs éventuels.



a. Creuser un trou

b. Mettre un drap

c. Remettre la terre



d. Déposer le cadavre



e. Couvrir avec une cage

Figure 3: Protocole suivis sur le terrain.

Toutes les informations journalières ont été régulièrement notées sur une fiche (Jours, climat et températures) (Annexe 01).

Le sacrifice des lapins a été effectué par égorgement, sur le dispositif conçu décrit précédemment, le 03/03/2018 à 10h du matin avec un couteau bien aiguisé. Immédiatement après leur mort, les cadavres ont été aussitôt recouverts de cages.

Une vérification journalière du cadavre est obligatoire afin de prendre en photographies les différents stades de décompositions observés.

I.4.1. Prélèvements, conditionnement et acheminement

Avant de procéder aux prélèvements nous nous sommes équipées du matériel de protection individuelle (gant et bavette).

I.4.1.1. Prélèvement des insectes adultes

Pour collecter les diptères adultes ; plusieurs méthodes de piégeages ont été utilisées (annexe 02). Les Prélèvements ont été effectués chaque jour pendant 10 jours.

I.4.1.2. Prélèvement des larves

Les prélèvements des larves et des pupes ont été effectués à partir des cadavres, le 12/03/2018 (après 10 jours) à l'aide d'une cuillère en plastique.

Les larves ont été récoltées dans un pilulier muni d'un couvercle avec de petits trous recouverts de la gaze permettant la respiration lors du transport. Une étiquette comportant le lieu, la date, l'heure et le stade de développement a été collée. Pour une identification ultérieure au niveau du laboratoire de l'INCC/GN, une dizaine de larves a été conservée dans l'alcool à 70%.

I.5. Protocole suivie au laboratoire

I.5.1. Elevage

Les larves vivantes ont été acheminées au laboratoire pour élevage. Le fond des boîtes a été rempli de terre. Une tranche de viande de bœuf a été placée, sur laquelle les larves ont été déposées. L'hydratation des larves a été assurée en les vaporisant quotidiennement avec de l'eau.

Deux élevages ont été effectués (Tableau I) au niveau du laboratoire de l'université de Bejaia à température ambiante.

Tableau I : Elevages effectués au laboratoire.

Elevage	Date de début	Origine des larves
1	12/03/2018	Lapin 2 et 3
2	18/03/2018	Lapin 1

Quelques jours plus tard, l'émergence des adultes se produit, la boîte a été alors mise au congélateur à -20°C pendant 10 min afin d'immobiliser les adultes, puis ont été conservées dans de l'éthanol à 70%.

I.5.2. Épinglage

L'épingle a été placée dans le thorax du spécimen, l'endroit varie selon l'ordre auquel appartient l'insecte :

- ✓ Chez les Hyménoptères et chez les Diptères, l'épingle a été placée légèrement à droite sur le mésothorax, entre les ailes.
- ✓ Chez les Coléoptères, l'épingle a été enfoncée dans le premier tiers de l'élyt.

I.5.3. Identification

L'identification des diptères adultes a été effectuée au niveau de l'INCC/GN par nous même en présence des spécialistes du laboratoire d'entomologie à l'aide d'un stéréomicroscope avec caméra.

I.5.4. Étiquetage

Après identification, les insectes ont été placés sur une planche de polystyrène avec des étiquettes portant les informations sur chaque spécimen puis laissés sécher à l'air libre.

I.6. Détermination de l'IPM court

Une fois les insectes prélevés sur le cadavre, élevés et identifiés, le choix de la méthode de datation dépend principalement des espèces présentes et de leurs stades de développement. On opte pour l'IPM court lorsque les individus issus des pontes des premiers insectes colonisateurs (diptères Calliphoridae) sont encore en train de se développer sur le corps lors de sa découverte, ce qui est le cas pour notre étude. Ce cas de figure correspond généralement à une période de quelques jours à quelques semaines après le décès.

Il est alors possible de calculer directement l'âge des insectes au moment où ils ont été prélevés sur le corps. L'estimation de la date de la ponte correspondra donc à l'IPM minimum.

Les calculs ont été faits selon la méthode de Marchenko (2001), basée sur la technique des degrés jours accumulés (Accumulation degree day (ADD)), qui tient compte des températures moyennes journalières, L'auteur affirme que la marge d'erreurs est de l'ordre ± 24 heurs.

Les données de la température enregistrées au cours de la période expérimentale ont été utilisées. Pour qu'une mouche nécrophage puisse se développer, de l'œuf à l'adulte, il lui faut un cumul de températures spécifique à l'espèce (C), en retenant un seuil minimal ou un indice (I), également spécifique à l'espèce, en dessous duquel le développement de l'insecte s'arrête. Les adultes émergeront lorsque la somme des températures est atteinte, elle correspond au jour de ponte de l'espèce. Cette somme est calculée par la formule suivante :

$$\text{Température accumulée} = \Sigma (T^{\circ} - I)$$

T° : moyennes des températures /jour.

I : indice ; température minimale nécessaire au développement de l'espèce.

Cette durée est définie comme la somme d'ADD. La température prise en compte est la température effective égale à la différence entre la température moyenne sur 24H et la température seuil de l'espèce. En dessous de sa température seuil, l'espèce ne se développe pas (Marchenko, 2001) (Tableau II).

Le nombre de jours j pour atteindre l'état adulte, pour une température constante T, est donc :

$$j = C / (T - I)$$

Tableau II: Température spécifique de développement de certaines espèces (Marchenko, 2001).

Espèces	seuil minimal spécifique à l'espèce (I)	cumul de températures spécifique à l'espèce (C)
<i>Calliphora vicina</i>	2° C	388° C
<i>Calliphora vomitoria</i>	3° C	472° C
<i>Lucilia sericata</i>	9° C	207° C

Partie II. Nécrobiome et activité antibactérienne

II.1. Nécrobiome

Le but de cette étude est de suivre l'évolution quantitative post-mortem, dans le temps de deux bactéries (gram positif) : *staphylococcus aureus* et les Entérocoques.

II.1.2. Prélèvement sur terrain

Des prélèvements buccaux par écouvillonnage ont été effectués sur trois lapins directement après le sacrifice et pendent 10 jours. Les écouvillons prélevés ont été conservés dans une glacière afin de stopper la prolifération bactérienne puis acheminés au laboratoire pour analyses le jour même.

II.1.3. Examens bactériologiques

Chaque prélèvement a été mis en culture, en ajoutant du bouillon nutritif puis incubé à 37°C pendant 20minutes. Après homogénéisation, une quantité de 100µl a été prélevée à partir de l'échantillon contenant l'écouvillon etensemencée par étalement sur deux milieux sélectifs BEA ou Chapman et incubée pendant 24h/37°C. Une série de dilutions a été réalisée afin d'effectuer un dénombrement et d'estimer la charge bactérienne.

II.2. Activité antibactérienne des larves

A fin d'étudier l'action des larves de mouches sur l'évolution quantitative des souches prélevés sur les cadavres ainsi que sur d'autres bactéries, deux méthodes ont été testées.

II.2.1. Méthode par écrasement des larves

Des larves ont été mises en contact avec des cultures bactériennes (20 larves par boîte de pétriensemencée) des deux souches prélevée (*S.aureus* et Entérocoques), ainsi que neuf souches de la collection du laboratoire d'écologie microbienne (*Escherichia coli* 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ViM P510, *Acinetobacter baumannii* VEB-1 ATCCC A131107588, *Bacillus cereus* ATCC 11778, SARM RMA34, *Listeria innocua* CLIP 74915, *Enterococcus faecalis* pathogène, *Citrobacter deversus* pathogène), afin de stimuler la sécrétion d'éventuelles substances antibactériennes. Après 72 heures, les larves ont été récupérées, lavées à l'eau distillée puis à l'éthanol 70%, puis

rinçage, avant broyage. L'extrait obtenu a été utilisé pour les tests antibactériens par deux méthodes : méthode des puis et méthode des disques.

II.2.2. Méthode par injection des larves

Des suspensions de différentes bactéries (11 souches) ont été préparées ; en dissociant 20 colonies dans 500µl d'eau physiologique. Les solutions ainsi obtenues ont été dénombrées et injectées à différentes larves au niveau de l'abdomen (stades larvaires non identifiés) (figure 4). Par la suite les différents stades larvaires ont été identifiés et le taux de mortalité déterminé après 24 h (Tableau III).

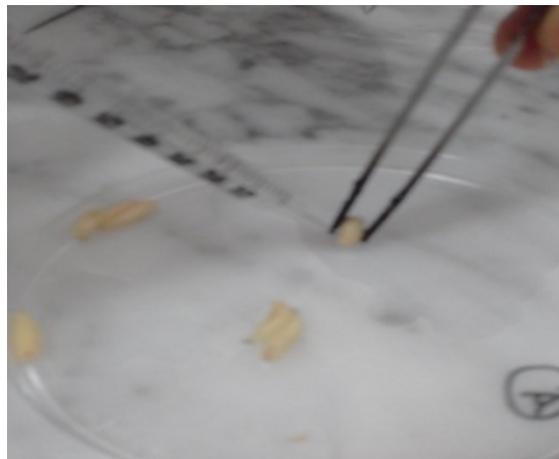


Figure 4: Injection des larves avec différentes suspensions bactériennes.

Dans un deuxième temps, d'autres suspensions bactériennes (04 souches) ont été préparées ; en dissociant 03 colonies dans 500µl d'eau physiologique. Les solutions ainsi obtenues ont été dénombrées et injectées à des larves de *C. vicina* au stade larvaire 3 (Tableau III). Le taux de mortalité des larves a été déterminé en fonction du temps. Les larves vivantes ont été soigneusement lavées avec l'eau puis l'alcool, écrasées et ensemencées dans les milieux sélectifs correspondant aux souches injectées. Des larves non injectées avec suspension bactérienne ; utilisées comme témoin négatif, ont été également ensemencées dans les mêmes milieux. Le dénombrement a été effectué, pour l'ensemble, après 24h d'incubation. Le protocole suivi dans cette partie est inspiré de la méthode de Menard et *al.*, (2018) rapportée dans leur étude sur la virulence de *S. aureus*. L'analyse statistique a été effectuée avec le logiciel Statistica 5.5.

Tableau III: Souches injectées aux différentes larves

20 colonies / 500µl d'eau physiologique						
Souches	Entérocoques	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> 25922	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ViM P510	
Nbr de larves injectées	33	30	09	08	07	
Souches	<i>Citrobacter deversus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> VEB-1 ATCCC A131107588	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	SARM RMA34	<i>Listeria innocua</i> CLIP 74915
Nbr de larves injectées	08	08	07	10	08	08
03 colonies / 500µl d'eau physiologique						
Stade larvaire	L3					
Souches	Entérocoques	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ViM P510		
Nbr de larves injectées	82	69	23	28		

Partie III. Histologie post mortem des tissus

III.1. Mode opératoire

III.1.1. Sur terrain

Des prélèvements ont été réalisés sur trois organes (cœur, foie et rein) à partir de deux lapins, sur 7 jours, dans le but de suivre la décomposition des tissus durant la phase post-mortem. Les tissus prélevés ont conservé dans le formol à 10% (Figure 5).



Figure 5: Prélèvement pour examens histologiques.

III.1.2. Au niveau de laboratoire

La préparation et l'observation des coupes histologiques ont été réalisées au niveau du laboratoire d'anatomopathologie de la faculté de médecine de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia, dont les techniques utilisées sont adaptées de l'ouvrage de René Hould (1984) intitulé: Technique d'histopathologie et de cytopathologie, ainsi que les produits, instruments et appareils utilisés lors des différentes étapes de l'histologie sont illustrées dans l'annexe 03.

III.1.2.1. Fixation et incubation

Les coupes de foie, cœur et rein prélevés, ont été fixés dans une solution de formol à 10% à un volume 10 fois plus important que l'organe, pendant une durée d'environ un mois à 4°C (Figure 6). Cette étape a pour but de préserver la morphologie cellulaire et tissulaire afin de garder l'échantillon dans un état aussi proche que possible de l'état *in vivo*, tout en renforçant la consistance du tissu (Djoudad-Kadji *et al.*, 2011).

Les organes ont été placés dans des cassettes histologiques marquées (Figure 6A) avant d'être plongées dans un erlenmeyer contenant le fixateur (Figure 6B). Ces cassettes ont ensuite été mises dans un panier de l'appareil automate de circulation, contenant 12 cuves (Figure C), qui a permis la réalisation de trois étapes :

- **La déshydratation**, qui a été faite par passage des échantillons dans 8 cuves d'éthanol de concentration croissante (de 70° à 100°) pour une durée de 45 min chacune. Cette étape permet d'éliminer l'eau des tissus pour les préparer à l'inclusion.
- **La clarification**, qui a durée une heure, a été effectuée par passage du panier dans deux bains de xylène. Cette étape élimine toute trace d'éthanol dans l'échantillon.
- **L'inclusion** (imprégnation), qui a été faite par immersion des cassettes dans deux bains successifs de paraffine de 1h30 chacun à une température de 56°.

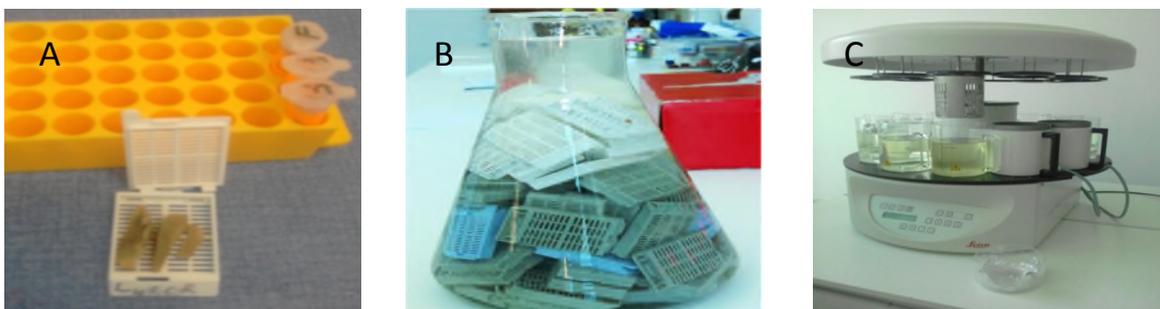


Figure 6: Fixation et d'incubation des coupes histologiques (Photo originale).

A. Les coupes mise dans une cassette ; B. La fixation des échantillons dans le formol 10% ; C. L'inclusion des échantillons dans un automate de circulation.

III.1.2.2. Enrobage et confection des coupes

Les échantillons ont été délicatement retirés des cassettes avec une pince puis misent dans des moules en inox (Figure 7), avant de les remplir de paraffine liquide (Figure 7A). Les moules ont été par la suit déposés sur une plaque refroidissante afin de solidifier la paraffine pour la réalisation des coupes. Les blocs de paraffine ont été démoulés pour y être placés dans un microtome afin de confectionner des coupes d'environ 3 μm (Figure 7B). Ces rubans ont été déposés sur des lames marquées recouvertes d'une fine couche d'eau albumineuse, puis immergées un court instant dans un bain marie à 60°C.

Les lames ont été rangées sur un porte-lame puis placées dans l'étuve pendant 30 minutes (Figure 7C), avant d'être immergées dans un solvant (bain de xylène) pendant la même durée afin d'éliminer toute trace de paraffine, et permettre ainsi la pénétration des colorants hydrophiles dans les tissus.

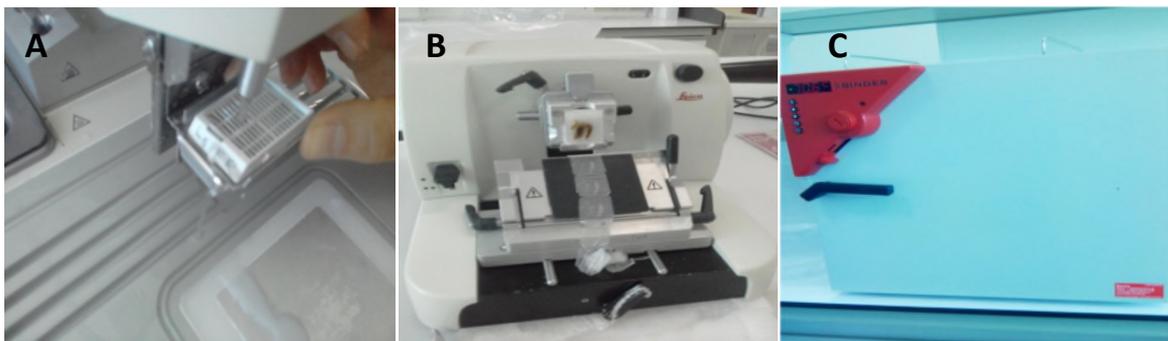


Figure 7: Enrobage et déparaffinage des coupes histologiques (Photo originale).

A. l'enrobage des échantillons ; B. La coupe des blocs au microtome ; C. Le déparaffinage des lames dans l'étuve.

III.1.2.3. Coloration et montage des coupes

Cette étape a été précédée d'une hydratation consistant en l'immersion des lames dans un bain d'éthanol suivi d'une immersion dans un bain d'eau pour une durée de 10 min chacun. La coloration des lames a été faite avec deux colorants qui permettent de mettre en évidence la morphologie cellulaire et tissulaire: L'hématoxyline basique qui colore le noyau acide (basophile) en bleu-violet et l'éosine acide qui colore le cytoplasme basique (acidophile) en rose (Figure 8).

Les lames ont tout d'abord été plongées dans un bain d'hématoxyline pendant 5 minutes, puis rincées à l'eau du robinet. Par la suite, elles ont été plongées dans un bain d'éosine pendant 3 minutes avant de subir un ultime rinçage.

La dernière étape est le montage ; elle s'opère par le passage des lames dans un bain d'éthanol suivi d'un bain contenant un mélange d'éthanol/xylène et pour finir dans deux bains successifs de xylène (Figure 8A). Quelques gouttes d'Eukit (colle biologique) ont été déposées sur des lamelles avant d'être placées sur les lames, l'ensemble lame et lamelles a été séché à l'air libre (Figure 8B).



Figure 8: Coloration des coupes histologiques (Photo originale).

A. Les produits utilisés lors de la coloration et du montage des lames; B. L'ensemble lame et lamelles séché à l'air libre.

III.1.2.4. Observation microscopique

Les lames ont été observées à l'aide d'un microscope optique de type Leica DM1000LED muni d'une caméra Leica MC170HD. Les images obtenues par cette caméra ont été transférées sur l'écran d'ordinateur à l'aide du logiciel Leica Application EZ (LASEZ).

Partie I. Entomologie médico-légale

I.1. Stades de décomposition

L'observation et l'examen du processus de décomposition des lapins sacrifiés a permis de dégager quatre stades distincts, à savoir : un stade frais, un stade gonflé, pourri et desséché (Figure 9).

a. Stade frais

Ce stade a commencé au moment de la mort et s'est poursuivi jusqu'à ce que le ballonnement de l'abdomen soit évident, néanmoins le corps est resté intact (Figure 9A). Aucun changement morphologique ne s'est produit et aucune odeur de décomposition n'est ressentie à ce stade (excepté par les mouches). Ce stade a attiré les diptères nécrophages.

b. Stade gonflé

Ce stade a débuté lors de l'apparition du ballonnement au niveau abdominal, et s'est terminé avec le dégonflement. Il marque le début du processus de putréfaction, (Figure 9B)

c. Stade pourri

Le début de ce stade a été marqué par la libération des fluides corporels, le dégonflement du cadavre, l'odeur de la pourriture qui devient perceptible et forte. L'étape s'est terminée lorsque la plupart des débris sont devenus relativement secs. La peau est fissurée en un ou plusieurs endroits à cause de l'alimentation des larves de diptères nécrophage et la perte de poils est remarquable, en particulier dans cette zone où les asticots manifestent une grande activité (Figure 9C).

d. Stade desséché

Cette étape a été la dernière du processus de décomposition des trois cadavres de lapins. Ces derniers n'étaient constitués que de la peau sèche, de la fourrure, du cartilage et des os. La fin de ce stade est difficile à définir en raison de sa longue durée (Figure 9D).



A. Stade frais



B. Stade gonflé



C. Stade pourrie



D. Stade desséché

Figure 9: Les différents stades de décomposition.

Dans la présente étude, la durée totale du processus de décomposition des trois cadavres de lapins était supérieure à 28 jours ; 2 jours pour le stade frais, 2 jours pour le stade gonflé, 9 jours pour le stade pourri et plus de 15 jours pour le stade desséché.

La période de notre expérimentation était dominée par un climat froid et humide (période hiverno-printanière), la température moyenne journalière variait de 8°C à 18°C. Ces conditions climatiques ont prolongés la conservation des cadavres retardant ainsi leur décomposition qui a atteint près de 28 jours.

Les résultats d'une expérience similaire réalisée par le laboratoire d'entomologie de l'INCC (résultats non publiés), dans la région de Bouchaoui (Alger), durant une période estivale dominée par un climat chaud et sec (température variant de 24°C à 31°C), montrent que la décomposition est plus rapide (9 jours). Ces observations attestent que les

conditions environnementales sont des facteurs importants dans la détermination de la durée de processus de décomposition des cadavres.

La relation entre la température et la vitesse de décomposition est linéaire, plus la température augmente plus le processus de décomposition est accélérée, ce qui est en accord avec les résultats rapportés par Anderson (2001), Campobasso *et al.* (2001) et Al-Mesbah (2010), qui ont démontré la présence d'une influence significative de ces paramètres, mais également d'autres tels que l'emplacement du corps (ombragé ou ensoleillé), l'habillement et enfin l'accessibilité du corps aux organismes vivants. La durée de l'étape de dessèchement est particulièrement longue.

I.2. Détermination de l'ordre d'arrivée des escouades

I.2.1. Inventaire et identification des espèces adultes capturées

Durant toute la période de cette étude allant du 03/03/2018 au 12/03/2018, un total de 144 spécimens ont été récoltés. L'identification des insectes capturés a permis leur répartition en neuf familles différentes comprenant 14 espèces dont neuf appartenant à l'ordre des diptères (Calliphoridae, Phoridae, Piophilidae, Muscidae et Fannidae) et quatre espèces à l'ordre des coléoptères (Staphylinidae, Trogidae, Histeridae) et une espèce à l'ordre des Hyménoptères (Ptéromalidae) (Tableau IV).

Les résultats montrent que les Diptères étaient les prédominants avec 75%, suivie par les Coléoptères et les Hyménoptères avec des proportions respectives de 21.53% et 3.47% (Figure 10). Pendant cette saison hiverno-printanière, les familles de Diptères les plus fréquentes étaient les Calliphoridae (74.07%), suivies par les Piophilidae (15.74%), les Muscidae (6.48%), les Phoridae (2.78%) et les Fannidae (0.93%) (Figure 11). Les familles de Coléoptères les plus fréquentes étaient les Staphylinidae (74.19%), les Trogidae (19.35%), et les Histeridae (6.45%) (Figure 12).

RESULTATS & DISCUSSIONS

Tableau IV : Inventaire de la faune cadavérique collectée.

Stade	N° jour	Ordre	Famille	Espèce	Nbr
Frais	Jour 1 03/03/ 2018	Diptera	Calliphoridae	<i>Calliphora vicina</i> <i>Lucilia sericata</i>	18 1
			Muscidae	<i>Musca sp</i>	1
	Jour 2 04/03/ 2018	Diptera	Calliphoridae	<i>Calliphora vicina</i> <i>Lucilia sericata</i> <i>Lucilia silivarum</i>	2 2 1
			Fannidae	<i>Fannia canicularis</i>	1
Gonflé	Jour 3 05/03/ 2018	Diptera	Calliphoridae	<i>Calliphora vicina</i>	1
		Hyménoptera	Ptéromalidae	<i>Alysia sp</i>	5
	Jour 4 06/03/ 2018	Diptera	Calliphoridae	<i>Calliphora vicina</i>	5
		Coléoptère	Trogidae	<i>Trox sabusus sabulosus</i>	1
Pourri	Jour 5 07/03/ 2018	Diptera	Calliphoridae	<i>Calliphora vicina</i>	2
		Coléoptère	Trogidae	<i>Trox sabusus sabulosus</i>	2
	Jour 6 08/03/ 2018	Diptera	Calliphoridae	<i>Lucilia sericata</i>	3
			Muscidae	<i>Muscina stabulans</i>	2
	Jour 7 09/03/ 2018	Diptera	Calliphoridae	<i>Calliphora vicina</i> <i>Calliphora vomitoria</i> <i>Lucilia sericata</i>	24 4 2
			Muscidae	<i>Hydrotaea (ophyra)</i> <i>Capensis</i>	4
		Coléoptère	Staphylinidae	<i>Creophilus maxillosus</i>	2
	Jour 10 12/03/ 2018	Diptera	Calliphoridae	<i>Calliphora vicina</i> <i>Lucilia sericata</i> <i>Lucilia silivarum</i> <i>Calliphora vomitoria</i>	10 2 2 1
			Coléoptère	Staphylinidae	<i>Creophilus maxillosus</i>
				Histeridae	<i>Saprinus semistriatus</i>
	Après Jour 10	Diptera	Phoridae	<i>Phoridae sp</i>	3
			Piophilidae	<i>Stearibia nigriceps</i>	17
Coléoptère		Trogidae	<i>Trox sabusus sabulosus</i>	3	
		Staphylinidae	<i>Creophilus maxillosus</i>	13	
		Histeridae	<i>Saprinus semistriatus</i>	1	

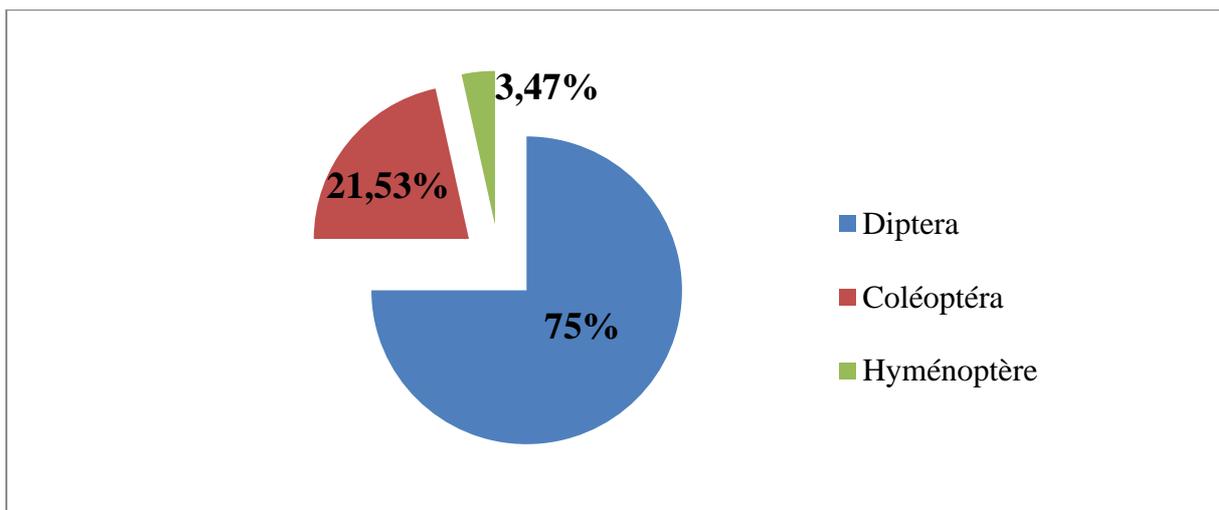


Figure 10: Répartition des ordres capturés.

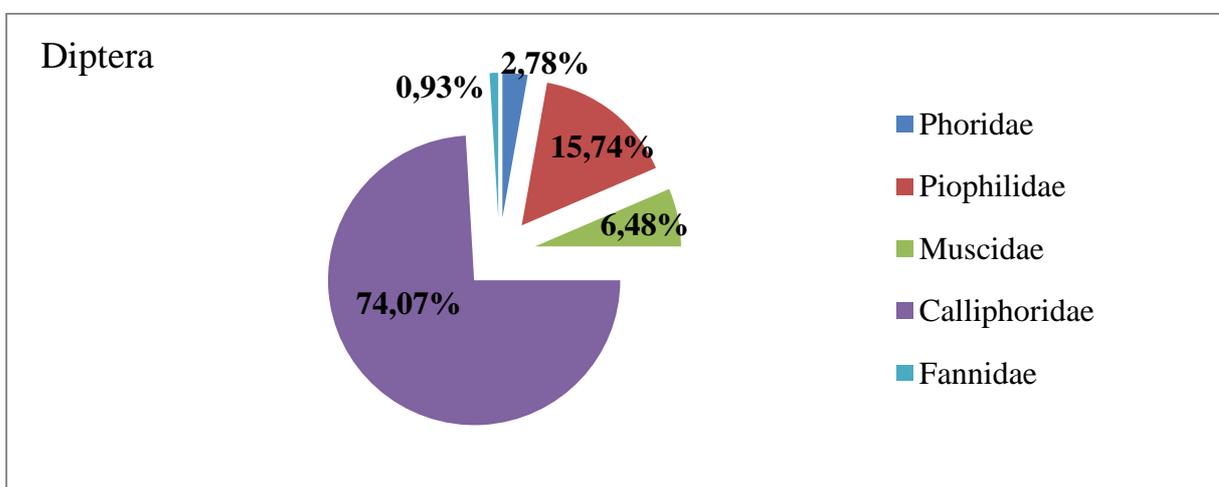


Figure 11: Répartition des diptères capturés.

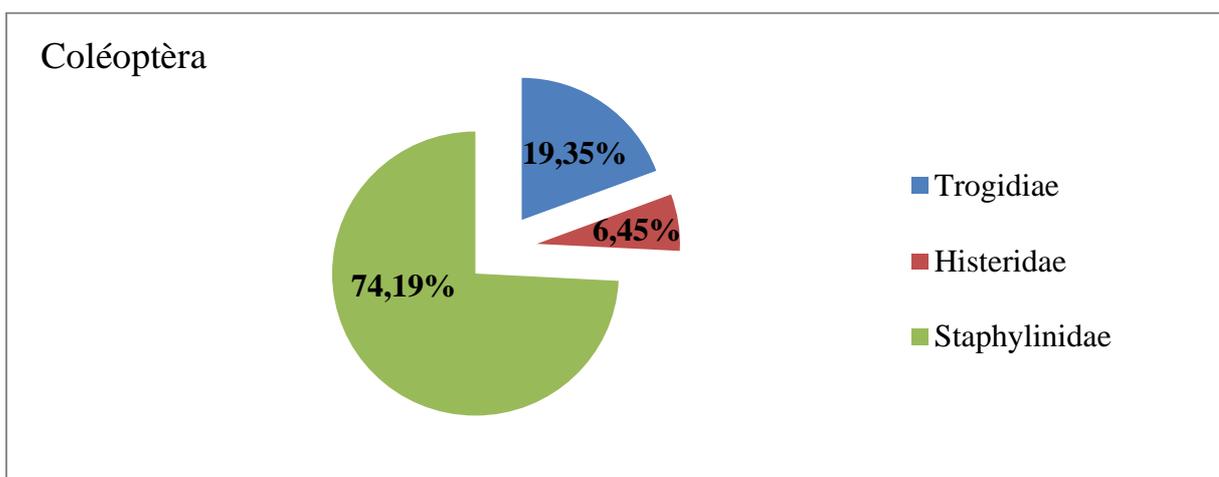


Figure 12: Répartition des coléoptères capturés.

I.2.2. Identification des larves prélevées :

Durant cette étude nous avons procédé aux prélèvements de larves sur les trois cadavres et leur identification (Tableau V) avec des clés spécifiques au niveau du laboratoire d'entomologie de l'INCC/GN.

Les principaux critères d'identification des larves de diptères sont : la structure des stigmates respiratoires postérieurs, la forme de croches buccales et la distance entre les tubercules P1, P2 et P3 (Annexe 04).

Le stade larvaire a été déterminé en examinant le nombre des stigmates postérieurs de la larve, qui laisse apparaître deux structures circulaires appelées sclérites ou plaques stigmatiques.

Tableau V : Identification des larves prélevées sur les trois cadavres.

Date de prélèvement	Ordre	Famille	Espèce	Nombre
Jour 5 (07/03/2018)	Coléoptère	Staphylinidae	<i>Creophilus maxillosus</i>	2
Jour 10 (12/03/2018)	Diptera	Calliphoridae	<i>Calliphora vicina</i>	2
			<i>Lucilia sericata</i>	6

Les résultats de l'identification des larves prélevées sur les trois cadavres de lapins montrent qu'une espèce appartient à l'ordre de Coléoptère de famille de Staphylinidae et deux espèces à l'ordre de Diptera de la famille Calliphoridae (*Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*).

Durant cette saison hiverno-printanière, nous avons constaté que les insectes nécrophages sont arrivés des les premières minutes qui ont suivi la mort des lapins. Cela peut être dû aux conditions climatiques qui étaient favorables à l'activité des insectes (Filali, 2010).

Le long de cette expérience, nous avons constaté que les premiers colonisateurs étaient les diptères de la famille des Calliphoridae (*Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*) qui étaient présents durant tous les stades de décomposition avec abondance.

RESULTATS & DISCUSSIONS

Le suivi de la succession diversifiée d'insectes nécrophages sur les cadavres nous donne un ordre d'arriver des escouades dont les diptères de Calliphoridae étaient les premiers colonisateurs et les prédominants avec la présence de quelque Muscidae et Fannidae durant le stade frais. Il a été noté que la famille des Calliphoridae de l'ordre des diptères a été active durant une longue période allant du 03/03/2018 jusqu'au 12/03/2018 (10 jours), alors que la famille de Ptéromalidae de l'ordre des Hyménoptera ne sont apparus qu'au troisième jour, durant le stade gonflé. A la fin de ce stade, au quatrième jour, nous avons noté la présence d'insectes de la famille de Trogidae de l'ordre de Coléoptère. Par la suite quelques coléoptères (Trogidae, Staphylinidae, et Histeridae) ont été également observés durant le stade pourri. Après 10 jours, au début du stade desséché, il a été observé la présence, en plus des coléoptères déjà présents, des Phoridae et Piophilidae de l'ordre de Diptera en abondance.

La comparaison des différentes escouades identifiées dans la présente étude avec une autre étude réalisée dans la région d'El-Kseur et celles rapportées par Mégnin (1894), révèle plusieurs similitudes (Tableau VI), mais avec des différences dans leur ordre d'arrivée. Pour les trois études les premières arrivées étaient les Calliphoridae. Les Fannidae et les Hyménoptera, arrivés respectivement en deuxième et troisième position dans notre étude et en quatrième et sixième position pour l'étude d'El-Kseur, étaient absents de la classification de Mégnin. Ce qui permet de conclure que l'ordre d'arrivée des différents colonisateurs, peut varier d'une région à une autre durant la même période (hiverno-printanière). Ce qui concorde avec les travaux de Wyss et Cherix, (2013).

Tableau VI: Tableau comparatif d'ordre d'arrivée des escouades.

Ordre d'arrivée des escouades	Présente étude	Mégnin (1894)	Région EL-KSEUR (2017)
1	Calliphoridae et Muscidae	Calliphoridae et Muscidae	Calliphoridae et Sarcophagidae
2	Fannidae	Sarcophagidae	Sarcophagidae
3	Hyménoptera	Dermestidae	Muscidae
4	Trogidae	Piophilidae	Fannidae
5	Staphylinidae	Histeridae	Coléoptères
6	Histeridae	Acarien	Hyménoptera
7	Piophilidae et Phoridae	Coléoptères	/
8	Coléoptères	Tenebrionidae et Ptinidae	/

I.3. Détermination de l'intervalle post-mortem

En principe, l'estimation de l'intervalle post-mortem s'effectue sur la base du matériel entomologique le plus âgé prélevé identifié, qui sont les individus ayant émergé en premier (Marchenko, 2001).

Afin de calculer l'IPM, deux élevages ont été effectués à partir de stades immatures des insectes prélevés sur les trois cadavres. Ces élevages ont été effectués au niveau du laboratoire de l'université de Bejaia à température ambiante.

Tableau VII : Emergence des individus après enlevages

Elevages	Date de début	Stade de décomposition	Origine des larves	Date d'émergence	Adulte émergé
1	12/03/2018	Pourrie	Lapin 2 et 3	06/04/2018	<i>Calliphora vicina</i>
2	18/03/2018	desséché	Lapin 1	Pas d'émergence	Pupe mortes Pupe parasité

L'identification de l'adulte émergé a été basée sur la forme, la taille, la couleur du thorax, les appendices, les stigmates et la nervation des ailes.

Calliphora vicina est caractérisée par un thorax non métallique, Basicosta jaune orangé, Calypter inférieur poilu, trois paires de poils au niveau du thorax et des poils géniques orangés (Figure 13).

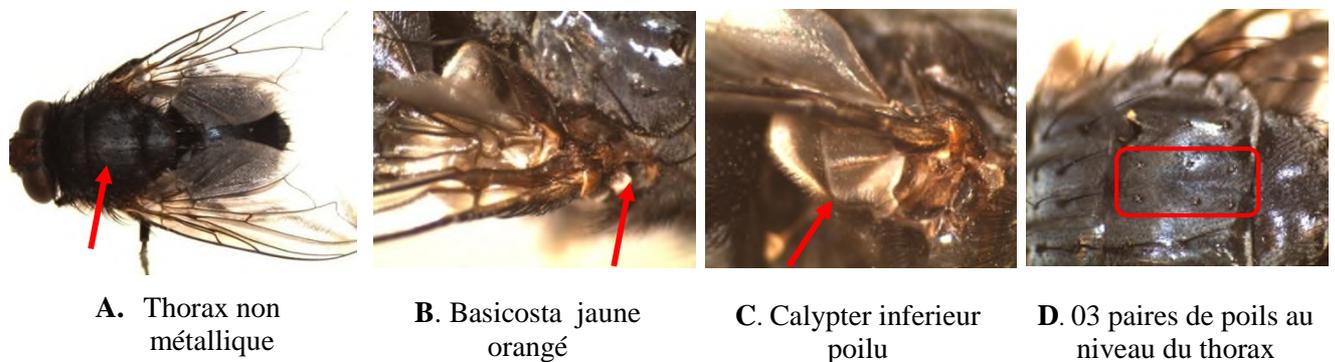


Figure 13: Critères d'identification de *Calliphora vicina*.

RESULTATS & DISCUSSIONS

Le calcul de l'IPM est effectué sur la base du cycle de développement de *C. vicina* qui nécessite un cumul de température de 388°C à partir de la ponte pour obtenir un adulte, en retenant un seuil minimal de 2°C (Marchenko, 2001), au dessous duquel le développement de l'insecte s'arrête. L'émergence des adultes a survenu le 06/04/2018 ; la valeur de 388°C se trouve donc atteinte à cette date en partant du 03/03/2018, date correspondant au jour de la ponte de *C. vicina* (Tableau VIII).

Tableau VIII : données pour le calcul de l'IPM.

Espèce identifiée	Seuil minimal spécifique à l'espèce (indice I)	Cumul de températures spécifique à l'espèce (C)	T° moyenne d'élevage	Date de ponte	Date d'émergence
<i>C. vicina</i>	2°C	388°C	14°C	03/03/2018	06/04/2018

Afin de calculer l'IMP (Figure 14), certaines valeurs ont été déterminées à savoir :

- ✓ La température moyenne cumulée sur terrain était de 13°C.
- ✓ La température moyenne cumulée au laboratoire était de 14°C.
Donc la température moyenne cumulée est de 13,5°C.
- ✓ La température moyenne cumulée par jour utilisée pour le calcul de l'IPM est calculée en retranchant la valeur de l'indice de la température moyenne soit : $13,5 - 2 = 11,5^\circ\text{C}$.
- ✓ Le nombre de jour nécessaires pour atteindre le cumul spécifique de l'espèce (388°C) est de $388/11,5 = 33,7$ jours. Ce qui signifie qu'il lui a fallu 33,7 jours pour compléter le cycle de *Calliphora vicina*.
- ✓ La température cumulée du prélèvement à l'émergence des imagos est de 25 jours X (14°C-2°C) soit 300°C.
- ✓ La température cumulée de la pente au prélèvement est de $388 - 300 = 88^\circ\text{C}$
- ✓ Cette température a été cumulée durant : $88^\circ\text{C}/(13^\circ\text{C}-2^\circ\text{C}) = 8$ Jours qui correspond à l'IPM.

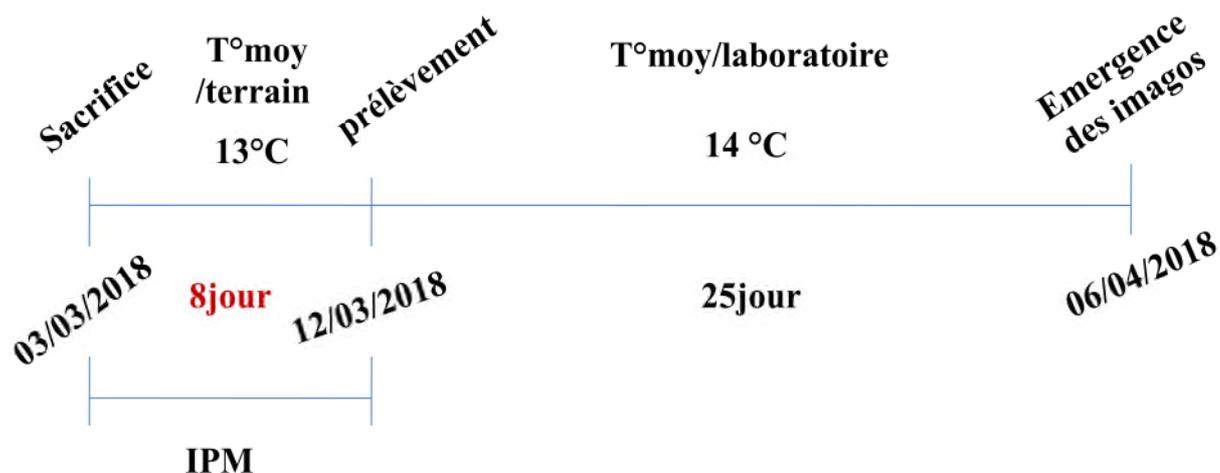


Figure 14: Détermination de l'IPM court.

L'IPM obtenu a permis de déterminer avec précision la date de la mort (qui correspond au jour du sacrifice). Ces résultats démontrent que *Calliphora vicina* est l'espèce la mieux indiquée pour la détermination de l'IPM dans la région de Darguina (Bejaia) durant la saison hiverno-printanière.

En effet, *Calliphora vicina* était présente durant les premiers stades de décomposition avec abondance. Il est intéressant de se référer à une étude réalisée à Bouchaoui/Alger durant la même période que notre étude (saison hiverno-printanière), qui a démontré que *C. vicina* était l'espèce la plus commune et la plus fréquente durant cette période (71% de larves présentes) (résultats non publiée). Cette espèce adaptée au froid a été également observée avec des effectifs élevés par de nombreux auteurs dans différentes régions du monde en particulier en Europe (Wyss et Cherix, 2013). Ces résultats confirment l'importance forensique de *C. vicina* dans la datation de mort, durant les périodes froides.

Partie II. Nécrobiome et activité antibactérienne

II.1. Résultats d'examens bactériologiques

II.1.1. Entérocoques

Après incubation, de fines colonies avec halo noir ont été observés sur le milieu BEA suite à l'hydrolyse d'esculine en glucose et esculétine par les Entérocoques. Les résultats de l'analyse quantitative de cette souche bactérienne dans le temps, montrent une augmentation de la charge bactérienne buccale du premier au sixième jour. Cette augmentation est significative ($p < 0.05$) à partir du quatrième jour. Par la suite cette charge bactérienne a diminuée du sixième au dixième jour. Elle a été significative ($p < 0.05$) du sixième au huitième jour (Figure 15).

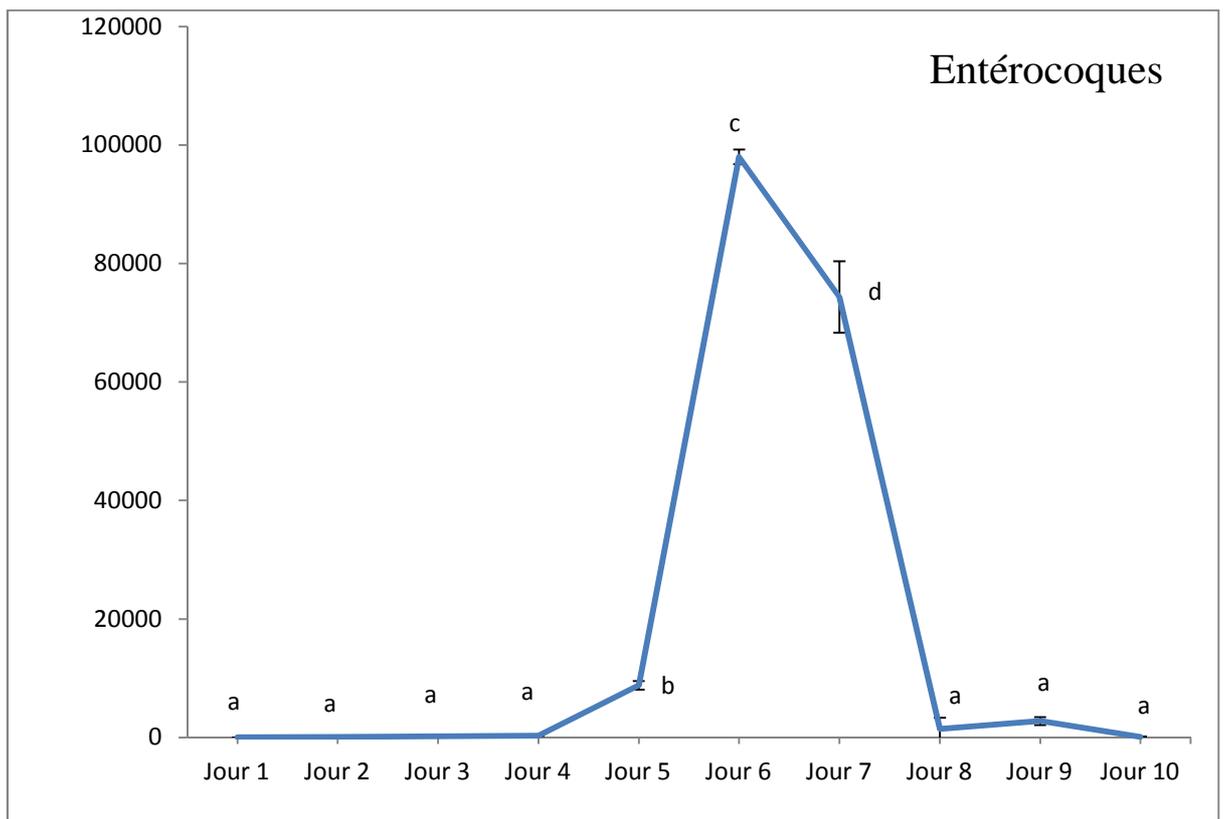


Figure 15: Evolution quantitative post-mortem des Entérocoques dans le temps.
a, b, c, d : significativement différents ($p < 0.05$).

II.1.2. *Staphylococcus aureus*

Après incubation à 37°C/24h sur milieu Chapman, des colonies jaune-dorées ont été observées, suite à la fermentation du mannitol (+) par *Staphylococcus aureus*.

Les résultats de l'analyse quantitative de cette souche bactérienne dans le temps sont très similaires à ceux des Entérocoques. Ils montrent également une augmentation de la charge bactérienne buccale post-mortem du premier au sixième jour. Cette augmentation est significative ($p < 0.05$) à partir du quatrième jour. Par la suite cette charge bactérienne a diminuée du sixième au dixième jour. Elle a été significative ($p < 0.05$) du sixième au huitième jour (Figure 16).

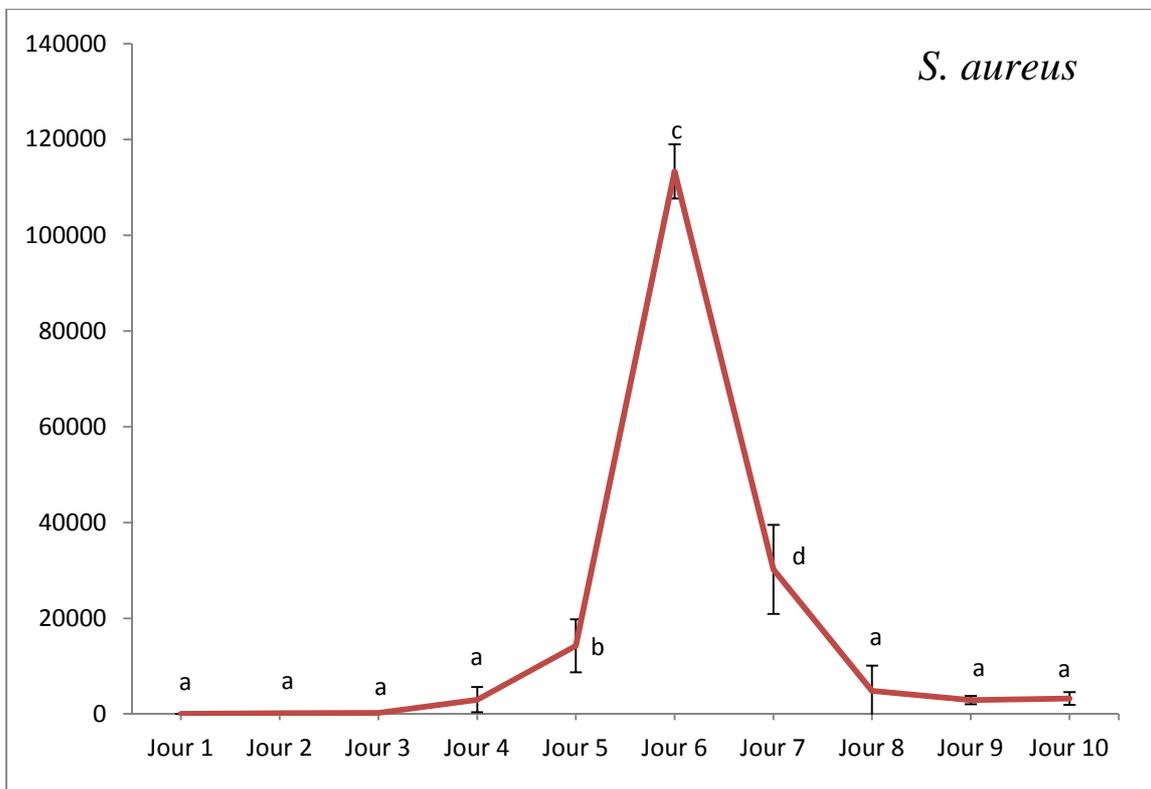


Figure 16: Evolution quantitative post-mortem de *S.aureus* dans le temps.
a, b, c, d : significativement différents ($p < 0.05$).

L'augmentation de la charge bactérienne des deux souches serait due aux changements dans certaines conditions du milieu (milieu cadavérique) ; notamment les paramètres physico-chimiques, dont le pH, la température, la présence d'O₂, de CO₂ et la

disponibilité de l'eau. Mais également la perte du système immunitaire. L'état de décomposition des cadavres, où les tissus deviennent plus mous, faciliterait l'accès des bactéries aux nutriments, ce qui favorise leur prolifération. Un autre facteur important est la dissémination de ces bactéries par les larves. En effet des larves mises dans des boîtes en traversant la culture de bactéries comme le montre la figure 17 laissent derrière elles un tracé libre de ces mêmes bactéries.

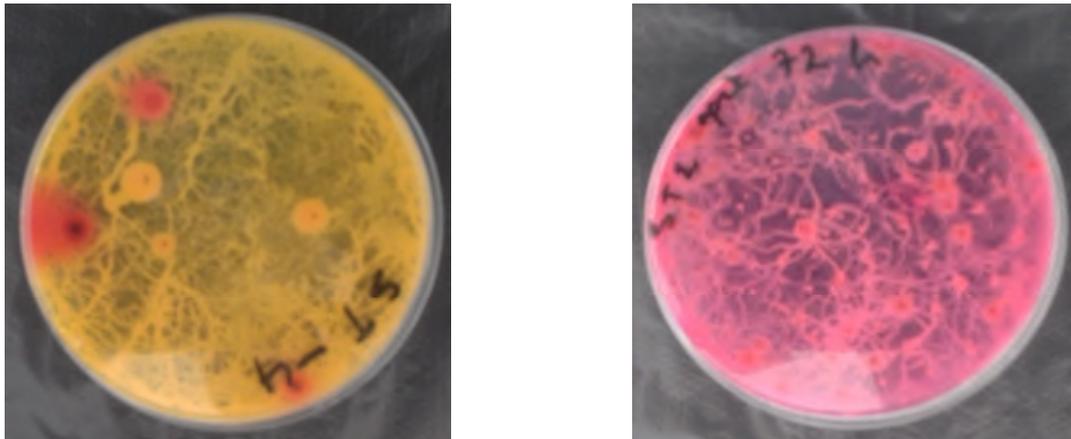


Figure 17: Dissémination des bactéries par les larves (photos originales).

Alors que la diminution, serait due à plusieurs paramètres notamment à une augmentation de l'alcalinité du milieu (pH défavorable). Le nombre croissant de larves et de colonisateurs des cadavres durant les différents stades de décompositions (144 spécimens identifiés dans la présente étude), et les différents stades de développement larvaire, seraient à l'origine de cette décroissance de la charge suite à une compétition sur les nutriments. Le système digestif des larves contribuerait également, en ingérant et digérant les bactéries, à réduire le nombre de pathogènes. En effet Mumcuoglu et *al.*, (2001) ont démontré que des bactéries *E. Coli* colorées sont ingérées et métabolisées par l'asticot.

Le stade larvaire, mais également les sécrétions des larves, qui pourraient être en relation avec cette chute de croissance, auraient un effet antibactérien sur ces souches. Ratcliffe et *al.*, (2015), ont testée l'activité antimicrobienne des excréments / sécrétions (ES) natives des larves au troisième stade, de trois espèces de calliphoridae brésiliens, *Chrysomya mégacéphalies*, *Chrysomya albiceps* et *Chrysomyaputoriae*. Ces excréments / sécrétions ont été filtrées stérilement et testées sur *Staphylococcus aureus* 9518, *Escherichia coli* K12 4401 et *Serratia marcescens* 365. Les ES des larves de ces espèces

ont significativement inhibé la croissance bactérienne. Huberman et *al.*, (2007), ont montré que les excréments et les sécrétions larvaires extériorisées dans des plaies ont une activité contre les bactéries Gram positif et Gram négatif. Certains de ces composés antimicrobiens pourraient également être liés à la réponse immunitaire des larves qui est activée au cours du contact prolongé avec les bactéries. Les mêmes effets antibactériens ont été obtenus avec les excréments / sécrétions dérivés des larves de *L. sericata* sur les mêmes micro-organismes (Andrea et *al.*, 2014).

Dans le présent travail, nous avons tenté d'explorer le potentiel antibactérien des larves des insectes nécrophages sur les deux souches prélevées, mais également sur d'autres souches bactériennes de la collection du laboratoire d'écologie microbienne de l'université de Bejaia.

II.2. Activité antibactérienne des larves

II.2.1. Méthode par écrasement

En suivant la méthode des puits ou la méthode des disques ; aucune zone d'inhibition n'a été obtenue avec les extraits de larves testés sur les deux souches prélevées et les onze souches de collection. Ce résultat pourrait être expliqué par la limite de la méthode suivie, qui n'a pas permis de libérer la substance active sur les différentes souches bactériennes, ou par une faible teneur en cette substance dans les larves (20 larves écrasées pour chaque test). Le temps de stimulation des larves serait également un facteur limitant dans la sécrétion de ces substances, ce qui affecterait les résultats de cette activité antibactérienne.

Vu les résultats de cette méthode, l'activité antibactérienne a été également explorée par une seconde méthode à savoir ; par injection directe des suspensions bactériennes pour les larves.

II.2. 2. Méthode par injection

a. Injections aux stades L2 et L3

Les résultats de l'injection des larves par les suspensions bactériennes (Tableau IX). (20 colonies/ 500µl, soit environ 22.2×10^6 UFC/larve), montrent un taux de mortalité qui varie en fonction de la souche bactérienne administrée et du stade de développement larvaire des larves injectées.

RESULTATS & DISCUSSIONS

Le taux de mortalité varie de 55,5% à 100% pour les larves au stade L2 et de 10% à 42,8% des larves au stade L3.

Pour les larves au stade L2, le taux de mortalité le plus important (100%) a été enregistré suite à l'injection de *P. aeruginosa* ViM P510, alors que le taux le plus faible a été constaté après injection d'*E. coli* 25922 (55,5%).

Pour les larves au stade L3, le taux de mortalité le plus important (42,8%) a été enregistré suite à l'injection d'*Acinetobacter baumannii* VEB-1 ATCCC A131107588 alors que le taux le plus faible a été constaté après injection d'*Entérocooccus faecalis* (10%). Ce qui laisse suggérer que les larves sont plus résistantes au stade larvaire L3. Plusieurs explications pourraient être avancées, telle qu'une plus forte synthèse de substances antibactérienne (peptides ou autres...), au niveau de ce stade, ou le développement d'autres mécanismes de défense des larves vis-à-vis de souches bactériennes.

Une étude réalisée sur un nombre égal de larves des calliphoridae à différents stades larvaires, pour obtenir des Excrétion/Sécrétion, a montré que la production de ces substances était plus importante durant le troisième stade larvaire (Cazander *et al.*, 2009). Les mêmes auteurs ont montré une réduction plus importante des bactéries au troisième stade larvaire, par rapport au deuxième stade dans une évaluation *in vivo* de l'activité antibactérienne sur des biofilms.

Tableau IX: Résultats de l'injection des larves aux stades L2 et L3.

Stade larvaire	L2 (20 colonies/ 500µl)					L3 (20 colonies/ 500µl)					
	Entérocoques	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> 25922	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. aeruginosa</i> ViM P510	<i>L. innocua</i> CLIP 74915	<i>C. deversus</i>	<i>A. baumannii</i> VEB-1 ATCCC A131107588	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	SARM RMA34
Nbr de larves injectées	33	30	09	08	07	08	08	07	10	08	08
Nbr de larves vivantes après 24h	07	08	04	02	00	07	07	04	09	06	07
Nbr de larves mortes après 24h	26	22	05	06	07	01	01	03	01	02	01
Taux de mortalité (%) après 24h	78.8	73.3	55.5	75	100	12.5	12.5	42.8	10	25	12.5

Afin de confirmer la résistance des larves au stade L3. Des larves de *Calliphora vicina* ayant atteint ce stade de développement, ont été injectées par des suspensions bactériennes

RESULTATS & DISCUSSIONS

(03 colonies/500µl d'eau physiologique) de *S. aureus*, entérocoques, *Escherichia coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ViM P510. L'objectif étant de suivre quotidiennement le taux de mortalité et la progression de la charge bactérienne administrée aux larves.

b. Injections aux larves L3 de *C. vicina*

Le taux de mortalité quotidien des larves est très faible pour l'ensemble des souches considérées (Tableau X), il ne dépasse pas 15%, valeur obtenue le deuxième jour après l'injection des entérocoques. Pour toutes les souches, les taux de mortalités les plus importants ont été constatés également le deuxième jour, excepté pour *E. coli* 25922, où il a été constaté le premier jour. Pour l'ensemble, les taux de mortalité les plus faibles ont été obtenus le cinquième jour après l'administration des différentes suspensions bactériennes. Ils varient de 0% (*P. aeruginosa* ViM P510 et *E. coli* 25922,) à 1.2% (entérocoques et *S. aureus*).

Tableau X : Résultats de l'injection des larves aux stades L3.

Stade larvaire	L3 (03 colonies/ 500µl)																			
Souches	Entérocoques					<i>S. aureus</i>					<i>Escherichia coli</i> 25922					<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ViM P510				
Nbr de larves injectées	82					69					23					28				
Observation chaque jours	1j	2j	3j	4j	5j	1j	2j	3j	4j	5j	1j	2j	3j	4j	5j	1j	2j	3j	4j	5j
Nbr de larves vivantes	82	74	69	64	63	69	62	58	54	53	20	19	18	16	16	27	25	24	23	23
Nombre de larves mortes	00	08	05	05	01	00	07	04	04	01	03	01	01	02	00	01	02	01	01	00
Taux de mortalité (%)	00	10.9	7.2	7.8	1.6	00	11.3	6.9	7.4	1.9	15	5.3	5.5	12.5	00	3.7	8.0	4.2	4.4	00

c. Suivi de la progression de la charge bactérienne

Les résultats de culture et dénombrement du contenu des larves de *C. vicina* (stade L3) injectées avec les suspensions contenant les souches de *S. aureus* et *E. coli* 25922 (03 colonies/ 500µl) montrent une cinétique décroissante de la charge bactérienne; de l'injection à la pupaison.

RESULTATS & DISCUSSIONS

La charge bactérienne de *S.aureus* injectée, diminue significativement ($p<0.05$) chaque jour, jusqu'au troisième jour (Figure 18). Puis une diminution légère du 3^{ème} au 5^{ème} jour, où la charge (77 colonies dénombrées) tend à se rapprocher de celle des larves non injectées (8 colonies dénombrées).

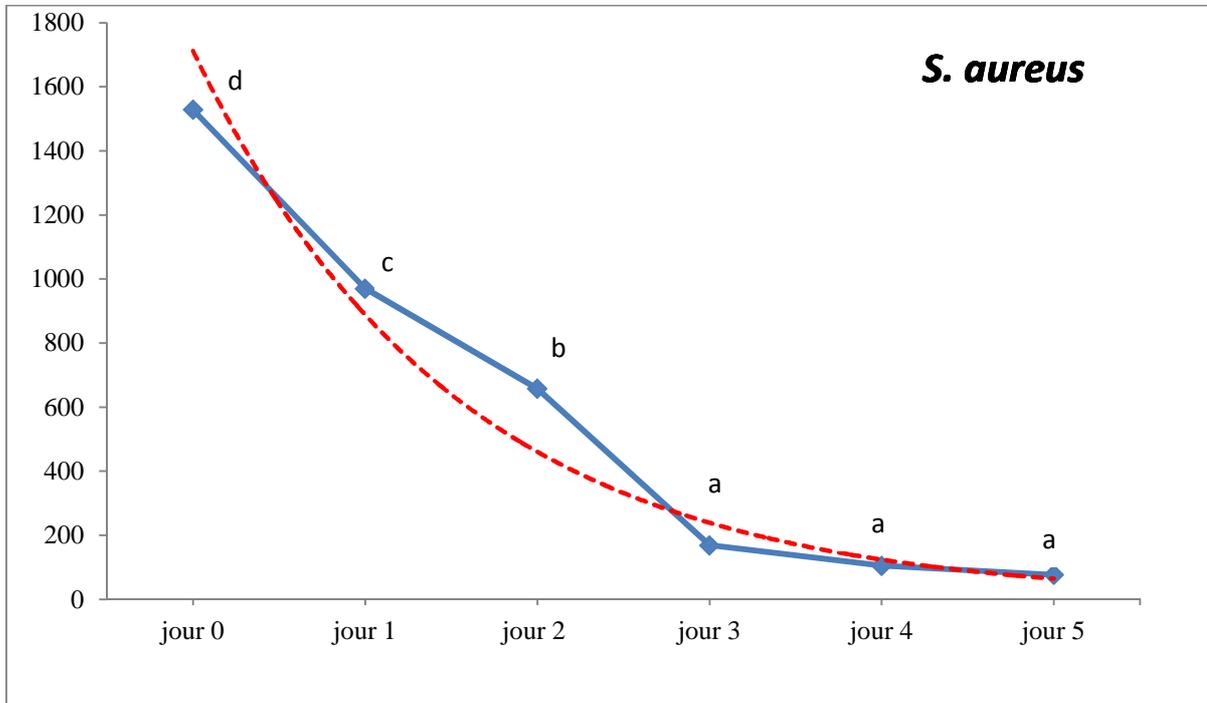


Figure 18: Progression de la charge de *S.aureus* injectée aux larves de *C. vicina* au stade L3. *a, b, c et d* sont significativement différents ($p<0.05$).

La charge bactérienne de *E. coli* 25922 injectée, diminue significativement ($p<0.05$) le 1^{er} et le 2^{ème} jour (Figure 19). Néanmoins, la charge bactérienne continue de diminuer jusqu'au passage des larves au stade nymphe (pupe), où la charge de *E. coli* 25922 (69 colonies dénombrées) tend également, à se rapprocher de celle des larves non injectées (2 colonies dénombrées).

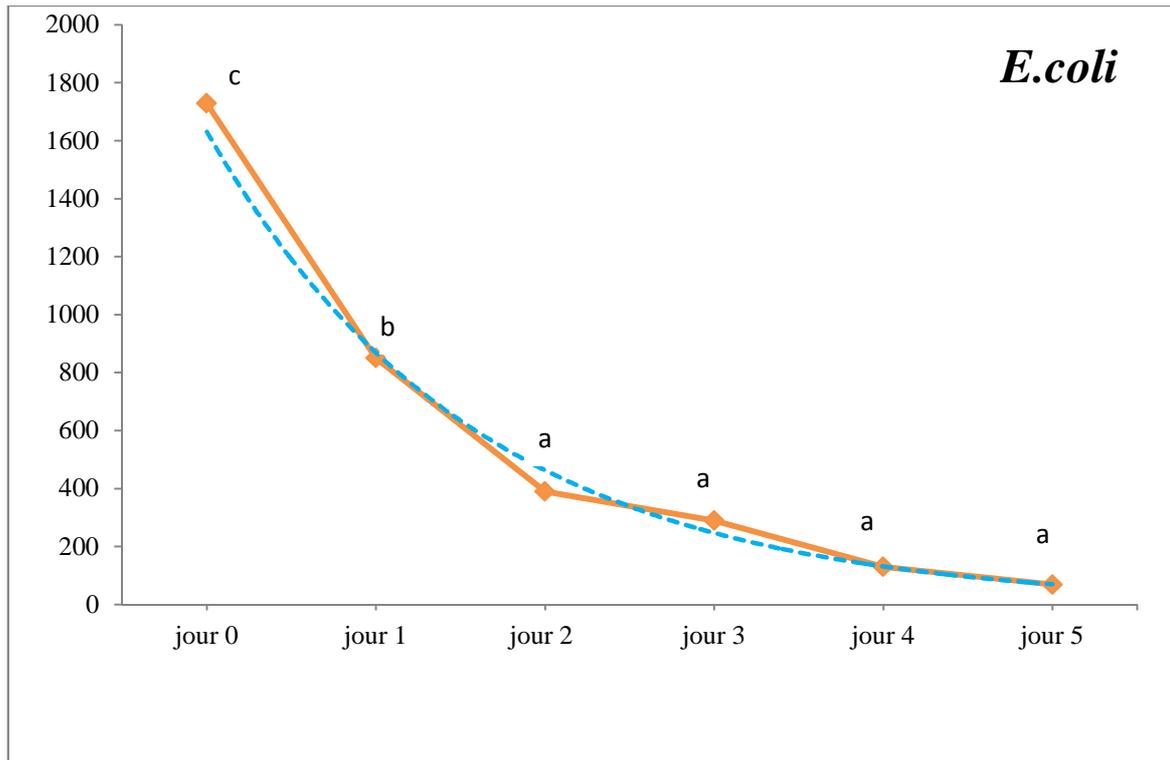


Figure 19: Progression de la charge d'*E. coli* injectée aux larves de *C. vicina* au stade L3. *a, b et c* sont significativement différents ($p < 0.05$).

La décroissance de la charge bactérienne, serait due à l'activité antibactérienne des laves sur les souches testées. Une activité antibactérienne puissante contre *E. coli* 25922 et *S. aureus* a également été observée dans les excréctions/sécrétions natives des larves des autres espèces de Calliphoridae (Bexfield et al., 2004; Barnes et al., 2010). Les larves de *L. sericata*, font actuellement l'objet d'investigations intenses. Bien que le mécanisme d'action antibactérienne n'ait pas encore clair (Zhang et al., 2013), il a été démontré que les sécrétions de cette espèce contiennent une variété de composés alcalins qui inhibent la croissance bactérienne, notamment le carbonate d'ammonium, le calcium, l'allantoïne et l'urée.

Partie III. Histologie post mortem des tissus

La mort cellulaire a inspiré les travaux des anatomopathologistes dès le XIXe siècle. L'avènement de la microscopie optique associée à des techniques de coloration du cytoplasme et des différentes structures qu'il entoure, celui du microscope électronique il y

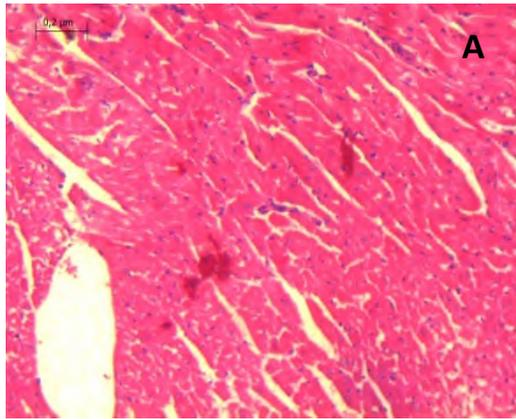
a près de 70 ans, ont permis d'en décrire les aspects morphologiques. Dans cette partie, nous allons essayer de suivre l'évolution de cet aspect dans le temps après la mort.

Les observations des différentes coupes histologiques réalisées quotidiennement sur les trois organes (foie, cœur et reins), permettent de relever de nombreuses modifications post mortem dans l'aspect des cellules. La figure 20, montre les modifications au cours du temps des tissus cardiaques des lapins sacrifiés.

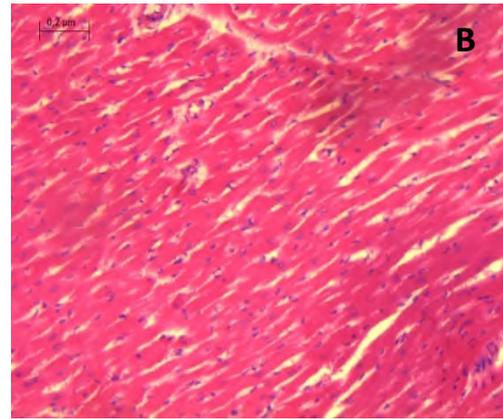
Au deuxième jour qui a suivi la mort (Figure 20A), l'aspect des cellules était conservé, le cytoplasme apparaît inhomogène, éosinophile et augmenté de volume. L'augmentation du volume cellulaire et la désintégration du cytosquelette modifient la forme du cardiomyocyte qui se ballonne. Le tissu cardiaque prend alors un aspect «ondulé». Alors qu'au 3^{ème} jour (Figure 20B), l'architecture cardiaque est plus ou moins conservée avec densification cytoplasmique (début de l'autolyse). Au 4^{ème} jour (Figure 20C), l'architecture cardiaque est toujours plus ou moins conservée avec densification cytoplasmique, des noyaux petits pycnotiques, voir absents, avec absence de réaction inflammatoire (autolyse plus ou moins prononcée). Au 5^{ème} jour après le sacrifice (Figure 20D), nous avons constaté un aspect plus ou moins conservé avec densification du cytoplasme, très éosinophile, avec absence de réaction inflammatoire.

L'observation des tissus prélevés au 6^{ème} jour (Figure 20E), montre un aspect éosinophile dense, fantomatique avec disparition des contours de noyaux sans réaction inflammatoire (autolyse avancée). Le volume nucléaire s'accroît dans un premier temps puis se réduit (pycnose) devenant minuscule et hypercolorable avant de se désintégrer (karyolyse), la chromatine disparaissant et le nucléoplasme est clair. Le Parenchyme cardiaque devient méconnaissable avec un aspect fantomatique des cellules, éosinophiles dense laqué. L'autolyse en phase avancée. Une présence de quelques structures larvaires a été également constaté (Figure 20F).

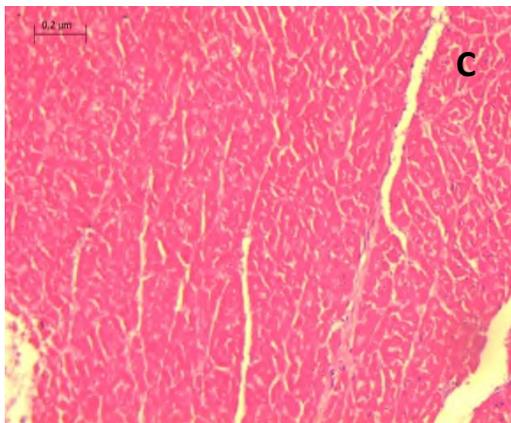
L'ensemble de ces modifications, laissent suggérer que les tissus, passent par plusieurs stades avant l'autolyse complète, ce qui pourrait être exploité dans l'estimation de la date de la mort.



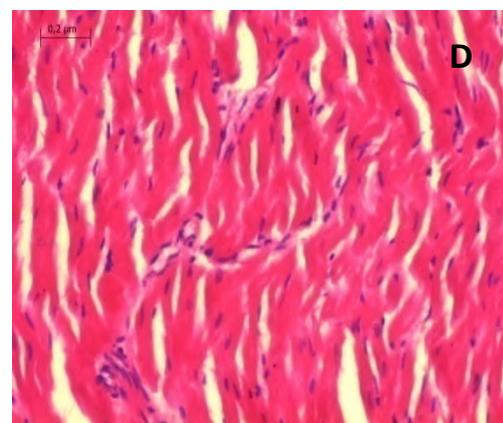
2^{ème} jour après la mort (X10)



3^{ème} jour après la mort (X20)



4^{ème} jour après la mort (X10)



5^{ème} jour après la mort (X20)



6^{ème} jour après la mort (X10)



6^{ème} jour après la mort (X20)

Figure 20: Aspect du tissu cardiaque de lapin après la mort.

Conclusion et perspectives

L'estimation du délai post-mortem est l'une des tâches les plus importantes à accomplir lors d'une enquête judiciaire. Le temps de colonisation des cadavres par les insectes influencent fortement ce calcul.

Le long de cette étude, il y'avait eu une succession diversifiée d'insectes nécrophages sur le substrat étudié. Un total de 144 Spécimens a été capturé repartis en 09 familles. Seules les mouches de la famille des diptères, notamment les Calliphoridae étaient les premiers colonisateurs et les prédominants durant les premières heures qui suivent la mort. *Calliphora vicina* était présente dès les premières minutes après la mort, ce qui confirme l'importance forensique de cette espèce dans la datation de la mort durant les périodes les plus froides.

Les présents résultats obtenus avec *Calliphora vicina*, ont démontré que la méthode de degré jours (ADD) donne une estimation précise de l'IPM. Elle permet de dater la mort dans une fourchette de temps souvent étroite, bien que le corps ait atteint un stade de putréfaction avancée. Les données obtenues lors de cette étude fournissent des informations de base sur l'entomofaune nécrophage de la région de Darguina, qui vont servir de base de données à des études similaires dans différentes régions géographiques et climatiques de l'Algérie.

Le suivie de la charge bactérienne des deux souches prélevées sur les cadavres, montre une évolution particulière. Cette charge augmente de manière significative durant les premiers jours qui suivent la mort, pour diminuer par la suite au sixième jour, qui coïncide avec le stade larvaire L3.

Le pouvoir antimicrobien des larves de diptères, démontré dans la présente étude contre une large gamme de souches bactériennes Gram positif et Gram négatif, suggère que les espèces de la famille des Calliphoridae pourraient fournir une source alternative de substances antimicrobienne et une application en thérapie larvaire.

L'étude du taux de mortalité des larves, combinée à l'évolution de la charge bactérienne, met en évidence que la synthèse des substances bactériennes serait importante au stade larvaire L3, soit après un contact prolongé avec les bactéries.

L'ensemble de ces modifications, laissent suggérer que les tissus, passent par plusieurs stades avant l'autolyse complète, ce qui pourrait être exploité dans l'estimation de la date de la mort.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Il serait pertinent de compléter la présente étude en :

- Réalisant des études similaires sur l'ensemble du territoire national sur divers substrats à diverses périodes de l'année ce qui permettrait de mettre en place, en collaboration avec d'autre chercheur, une base de donnée entomologiques nationale.
- Caractérisant génétiquement les différentes espèces d'insectes nécrophages en Algérie.
- Etudiant les paramètres qui influenceraient le cycle de développement des insectes nécrophages notamment ceux utilisées pour dater la mort.
- Suivant l'évolution d'autres bactéries dans le temps durant la phase post-mortem, ce qui pourrait apporter des indications supplémentaires sur la date de la mort.
- Explorant d'avantage le potentiel antibactérien des larves sur une plus large gamme de bactéries résistantes et pathogènes.
- Caractérisant des substances actives secrétées par les larves d'insectes nécrophages en particulier les calliphoridae.
- Approfondissant les recherches anatomopathologiques des tissus post-mortem dans différents conditions afin de suivre leur évolution dans le temps.

Référence bibliographique

- 1) Al Mesbah, H. (2010). A study of forensically important necrophagous Diptera in Kuwait. Mémoire de master, university of Central Lancashire (UK), 124 p.
- 2) Amendt, J., Campobasso, C.P., Gaudry, E., Reiter, C., Leblan, H.N., Hall, M.J.R.(2007). Best practice in forensic entomology standards and guidelines. International journal of legal medicine, 121(2):90-104.
- 3) Anderson, G.S. (2001). Insect succession on carrion and its relationship to determining time of death. In J.H Castner and J.L Byrd, Forensic entomology-The Utility of Arthropods in Legal Investigations, CRC press, Boca Raton .143-169.
- 4) Anderson, G.S. (2005). Forensic entomology in Forensic Science, an introduction to Scientific and investigative techniques, SH. JAMES, JJ. Nordby (eds) second edition, Taylor et Francis, Boca Raton FL, 778 P.
- 5) Andrea, D-R., María, A.G., Nydia, AS., Diana, S., Manuel, AP., Felio, J.B. *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) excretions and secretions have potent antibacterial activity. Journal Acta Tropica (2014) 136 37–43. Home page: www.elsevier.com/locate/actatropica.
- 6) Barnes, K.M., Gennard, D.E., Dixon, R.A., (2010). The antibacterial potency of the medicinal maggot, *Lucilia sericata* (Meigen): variation in laboratory evaluation .J. Microbiol. Methods 82, 234–237.
- 7) Beauthier, J. P. (2007). Traité de médecine légale. 2nd ed. De Boeck, Bruxelles, 837 p.
- 8) Bexfield, A., Nigam, Y., Thomas, S., Ratcliffe, N.A., (2004). Detection and partial characterization of two antibacterial factors from the excretion/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against méthicilline resistant *Staphylococcus aureus*. Microbes Infect. 6, 1297–1304.
- 9) Bourel, B., Callet, B., Hedouin V., Gosset D. (2003). Flies eggs: a new method for the estimation of short-term post-mortem interval? Forensic Sci. Int. 135: 27-34.
- 10) Campobasso, C.P. Introna, F. (2001). The forensic entomologist in the context of the forensic pathologist's role. Forensic Science International, 120, 132-139.
- 11) Cazander, G., van Veen, K.E., Bernards, A.T., Jukema, G.N., (2009). Do maggots have an influence on bacterial growth? A study on the susceptibility of strains of six different bacterial species to maggots of *Lucilia sericata* and their excretions/secretions. J. Tissue Viability 18, 80–87.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 12) Charabidze, D. (2008). Entomologie médico-légale : recherché et expertises. Études de la biologie des insectes nécrophages et Applications pour la datation des corps.
- 13) Charabidze, D. (2010). La biologie des insectes nécrophages et leur utilisation pour dater le décès en entomologie médico-légale. Annales de la société entomologique de France 48 (3-4) :239-252.
- 14) Djoudad-Kadji, H., Benslimane, S., Chevalier, C., Kadji, B., Exbrayat, J-M., and Iguer-Ouada, M. (2011). Visualisation des coupes histologiques des follicules ovariens de *barbus callensis* variation de fixateurs et de colorants. Revue Française d'Histotechnologie, 24 (1) : 21-28.
- 15) Faucherre, J., Cherix, D et Wyss, C. (1999)., Behavior of *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae) under extreme conditions .Journal of insect Behavior 12(5): 687-690.
- 16) Filali, F. (2011). Contribution a l'étude de la colonisation préférentielle d'un cadavre animal par les insectes nécrophages mémoire de Master Université Mentouri Constantine, 38p.
- 17) Gauchotte, G. Apport de l'anatomie pathologique en médecine légale thanatologique. ResartchGate. (2014). 20p. <https://www.researchgate.net/publication/287968247>.
- 18) Hamel, K. (2011). Contribution à L'étude de l'influence de la température sur le développement des insectes nécrophages. Mémoire de Master. Université Mentouri Constantine, 58 p.
- 19) Huberman, L., Gollop, N., Mumcuoglu, K.Y., Breuer, E., Bhusare, S.R., Shai, Y., Galun, R., (2007). Antibacterial substances of low molecular weight isolated from the blowfly, *Lucilia sericata*. Med. Vet. Entomol. 21, 127–131.
- 20) Marchenko, M.I. (1988). Medico-legal relevance of cadaver entomofauna for the determination of the time since death. Acta Medicinæ Legalis and Socialis.38:257-302.
- 21) Marchenko, M.I. (2001). Medico-legal relevance of cadaver entomofauna for the determination of time of death. Forensic Science international.120:89-109.
- 22) Mégnin, R. (1894). La faune des cadavres : Application de l'entomologie à la médecine légale. Masson, Paris.214p.
- 23) Menard. G, Ghukasyan. G, Rouillon .A, Felden .B.,Donnio. P.Y. Le modèle larvaire *Galleria mellonella* : un modèle alternatif pour étudier l'expression des ARNs bactériens au cours de l'infection à *Staphylococcus aureus* .Médecine et Maladies Infectieuses, (2018), vol.48.4, pS42-S43.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 24) Mesli, V. (2013) .Translocation bactérienne post-mortem : une approche bactériologique et médico-légale (étude préliminaire).Thèse pour le diplôme d'état de docteur en médecine. Université du droit et de la santé - Lille 2, faculté de médecine Henri Warembourg, 84p.
- 25) Mumcuoglu, K.Y., Miller, J., Mumcuoglu, M., Friger, M., Tarshis, M., (2001). Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). J. Med. Entomol. 38, 161–166.
- 26) Nabity, P.D., Higley, L.G., Heng-moss., T.M. (2007).Light-induced variability in development of forensically important blow fly *phormia Regina* (Diptera: Calliphoridae). J. Med. Entomology 44:351-8.
- 27) Ratcliffe, N.A., Vieira, C.S., Mendonc P.M., Caetano, R.L., Margareth Maria de Carvalho Queiroz., Garcia E.S., Mellod, C.B., Azambuja P. Detection and preliminary physico-chemical properties of antimicrobial components in the native excretions/secretions of three species of *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) in Brazil. Journal Acta Tropica. (2015). 147, 6–11p homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica.
- 28) Turchetto, M., Vanin, S. (2004).Forensic entomology and climatic change. Forensic Science international 146S:S207-S209.
- 29) Wyss, C.et Cherix, D. (2006). Traité d'entomologie forensique. Les insectes sur la scène de crime. Presse Polytechniques Universitaires Romandes, Lausanne.
- 30) Wyss, C.et Cherix, D. (2013).Traité d'entomologie forensique: les insectes sur la scène de crime. Presses Polytechniques et Universitaires romandes, Lausanne, 317 p.
- 31) Zhang, Z., Wang, J., Zhang, B., Liu, H., Song, W., He, J., Lv, D., Wang, S., Xu, X., (2013). Activity of antibacterial protein from maggots against *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. Int. J. Mol. Med. 31, 1159–1165.

Annexe 01

Tableau I: Suivie des températures journalières durant la période d'étude sur terrain

Jours	Climat	T° moyenne/jour
1 (03/03/2018)	Ensoleiller	14°C
2 (04/03/2018)	Nuageux	14°C
3 (05/03/2018)	Pluies	13°C
4 (06/03/2018)	Trouble	13°C
5 (07/03/2018)	Pluies	11°C
6 (08/03/2018)	Pluies	12°C
7 (09/03/2018)	Trouble	14°C
8 (10/03/2018)	Ensoleiller	16°C
9 (11/03/2018)	Nuageux	14°C
10 (12/03/2018)	Pluies	13°C

Annexe 02

I. Piégeage

Le piégeage est une méthode d'échantillonnage indispensable. Plusieurs pièges ont été utilisés pour la collecte des diptères nécrophages.

I. 1. Pièges attractifs

I. 1.1. Piège aérien

Un piège a été fabriqué en se basant sur le principe du piège attractif d'Upto (1991). Ce piège est construit avec une boîte en plastique. Plusieurs orifices sous forme de cônes ont été placés sur les côtés d'une façon à permettre aux insectes nécrophages de pénétrer à l'intérieur tout en les empêchant de ressortir, vu que ces derniers se déplacent toujours vers le haut, ils se retrouveront ainsi bloqués.

I.1.2. Piège Barber

Un moyen de base pour la collecte des insectes du sol. Nous avons placé des récipients en plastique remplis de liquide attractif dans des trous creusés préalablement au ras du sol.

I.1.3. Piège jaune

Composé d'un récipient rempli d'eau et un peu de savon liquide installé juste à côté du cadavre, il nous permet de récolter de nombreux Diptères et même des Coléoptères.

I.2. Pièges actifs

I.2.1. Filet fauchoir

Pour collecter les diptères adultes, il faut juste faucher autour de soi par un mouvement de vas et vient tout autour de la cage.

I.2.2. Collecte manuelle

A l'aide d'une pince entomologique et des cuillères jetables, des asticots ont été prélevés et même d'autres insectes qui se trouvaient sur les cadavres.

Annexe 03

Matériel utilisée en histologie

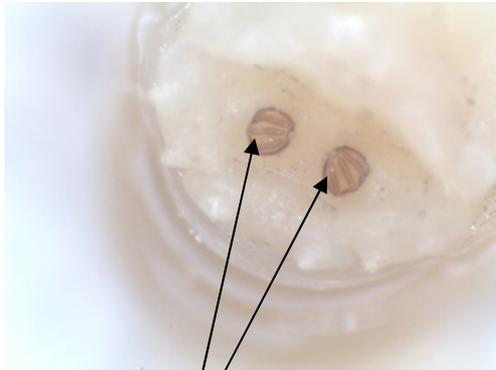
Tableau II: Produits, instruments et appareils utilisés lors des différentes étapes de l'histologie.

Produit	Instrument	Appareils *
Eau du robinet	Histocassettes	Appareil d'enrobage
Formol (10%)	Paniers	Plaque refroidissante
Ethanol	Moules pour l'enrobage	Microtome
Xylène	Bain marie	Automate d'inclusion
Paraffine	Lame et lamelles	Plaque chauffante
Hématoxyline éosine (H&E)	Porte-lame	Etuve
Eukit	Pinces	Microscope photonique (Leica DM1000LED)

** Tous les appareils utilisés sont de la marque Leica*

Annexe 04

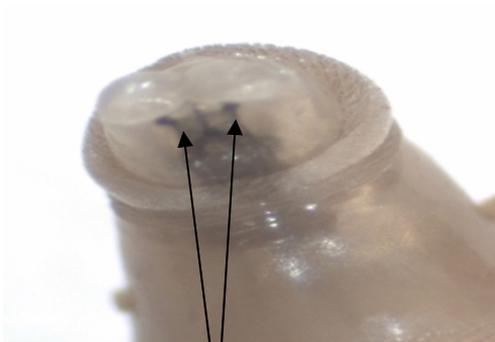
Figure : Les critères d'identification des larves



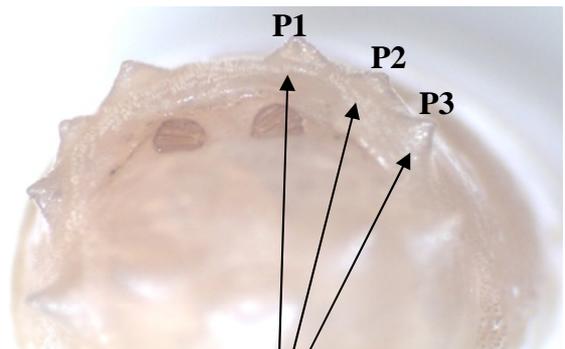
plaques stigmatiques



Une larve de diptère



Des crochets buccaux



Tubercule P1, P2 et P3

Résumé

L'entomologie médico-légale, criminelle ou forensique, étudie les liens qui existent entre l'activité des insectes et les différents stades de décomposition d'un cadavre. Néanmoins, cette discipline reste exclusivement consacrée à l'étude de l'insecte nécrophage pour l'estimation du délai post mortem. Le présent travail est une étude entomologique visant à identifier la faune cadavérique dans la région de Darguina Bejaia, durant la saison hiverno-printanière, mais également étudier l'évolution quantitative de quelques bactéries et leur relation avec l'évolution des insectes nécrophages, ainsi qu'une étude anatomopathologique des tissus post-mortem. Le site choisi pour le déroulement de notre expérience, à savoir sacrifice des animaux (cinq lapins), prélèvement des larves, pupes et insectes se trouve à DARGUINA, wilaya de Bejaia. L'élevage des larves et l'étude bactériologique ont été effectués au niveau du laboratoire de l'université A.MIRA de Bejaia. L'identification de la faune cadavérique a été effectuée au niveau du laboratoire d'entomologie du département de Médecine légale de l'Institut National de Criminologie et de Criminologie de la Gendarmerie Nationale (INCC /GN) Bouchaoui-Alger. Les résultats obtenus montrent que les diptères étaient les prédominants (75%), des 144 spécimens collectés et identifiés. Les insectes capturés ont été répartis sur 9 familles différentes. L'intervalle post mortem a été déterminé en suivant le cycle d'évolution de *Calliphora vicina*, qui est l'espèce la mieux indiquée pour dater la mort dans la région de Bejaia. L'analyse quantitative des prélèvements bactériologiques réalisés sur les cadavres montre que la charge bactérienne est fonction du stade larvaire des larves qui évoluent sur les trois cadavres. L'étude des coupes histologiques post-mortem réalisée sur différents organes, laisse suggérer que les tissus, passent par plusieurs stades avant l'autolyse complète, ce qui pourrait être exploité dans l'estimation de la date de la mort.

Mots clés : Entomologie forensique, *Calliphora vicina*, Datation de la mort, Nécrobiome, Larves, Insectes nécrophages, Coupes histologiques.

Summary

Forensic entomology, criminal or forensic, studies the links between the activity of insects and the different stages of decomposition of a corpse. Nevertheless, this discipline remains exclusively devoted to the study of the necrophagous insect for the estimation of the delay post mortem. The present work is an entomological study aiming to identify the cadaverous fauna in the Darguina Bejaia region, during the winter-spring season, but also to study the quantitative evolution of some bacteria and their relation with the evolution of the necrophagous insects, as well as an anatomopathological study of post-mortem tissues. The site chosen for the conduct of our experiment, namely sacrifice of animals (five rabbits), collection of larvae, pupae and insects is DARGUINA, wilaya of Bejaia. The rearing of the larvae and the bacteriological study were carried out at the laboratory level of A.MIRA University of Bejaia. The identification of the cadaverous fauna was carried out at the entomology laboratory of the Department of Forensic Medicine of the National Institute of Forensic Science and Criminology of the National Gendarmerie (INCC / GN) Bouchaoui-Algiers. The results show that Diptera were the predominant (75%), 144 specimens collected and identified. The captured insects were distributed over 9 different families. The post mortem interval was determined by following the cycle of evolution of *Calliphora vicina*, which is the best species to date in the Bejaia region. The quantitative analysis of the bacteriological samples taken on the cadavers shows that the bacterial load is a function of the larval stage of the larvae which evolve on the three corpses. The study of post-mortem histological sections performed on different organs suggests that the tissues go through several stages before complete autolysis, which could be exploited in estimating the date of death.

Keywords: Forensic entomology, *Calliphora vicina*, Death dating, Necrobiosis, Larvae, Necrophagous insects, Histological sections.