



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



ARTICLE ORIGINAL

Apport de la méthode TUNEL dans l'estimation du délai post-mortem : une étude expérimentale

Contribution of the TUNEL method for post-mortem interval estimation: An experimental study

Anne Dorandeu^a, Geoffroy Lorin de la Grandmaison^{b,*}

^a Service de médecine légale, hôpital Lapeyronie, 371, avenue du Doyen-Gaston-Giraud, 34295 Montpellier cedex 5, France

^b Service d'anatomie pathologique et de médecine légale, hôpital Raymond-Poincaré, 104, boulevard Raymond-Poincaré, 92380 Garches, France

Accepté pour publication le 16 novembre 2012

Disponible sur Internet le 19 mars 2013

MOTS CLÉS

Apoptose ;
Méthode TUNEL ;
Peau ;
Délai post-mortem

Résumé L'estimation du délai post-mortem est d'importance majeure en médecine légale. De nombreuses méthodes ont été utilisées dans la période post-mortem précoce, mais elles demeurent approximatives. Afin de tester l'hypothèse d'une majoration du taux d'apoptose avec l'accroissement du délai post-mortem, nous avons appliqué la méthode TUNEL sur modèle animal (rat) pour étudier la relation entre le nombre de cellules apoptotiques de prélèvements de peau de rats et le délai post-mortem. Notre étude a montré que les processus cadavériques étaient associés à l'apoptose au niveau des cellules cutanées. Le taux d'apoptose était corrélé statistiquement au délai post-mortem dans la période post-mortem précoce (moins de 48 heures après le décès). L'application de la méthode TUNEL pour estimer le délai post-mortem en médecine légale est discutée.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDS

Apoptosis;
TUNEL method;
Skin;
Post-mortem interval

Summary The assessment of post-mortem interval is of major importance in forensic pathology. Many methods have been used in the early post-mortem period but remain rough. To test the hypothesis of an increased rate of apoptosis increasing with post-mortem interval, TUNEL method was applied in rats to study the relationship between the number of apoptotic cells in skin samples and the post-mortem interval. Our study showed that the post-mortem processes were associated with apoptosis in skin cells. The apoptosis rate was statistically correlated with post-mortem interval in the early post-mortem (less than 48 hours after death). The application of the TUNEL method for estimating the post-mortem interval in forensic pathology is discussed.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : g.lorin@rpc.aphp.fr (G. Lorin de la Grandmaison).

Introduction

L'estimation du délai post-mortem est d'importance majeure en médecine légale. De nombreuses méthodes ont été utilisées dans la période post-mortem précoce, mais elles demeurent approximatives. Plus le décès est ancien et plus l'estimation est entachée d'incertitude. Dans la période post-mortem précoce, l'estimation est principalement basée en pratique sur l'évaluation des signes cadavériques, en particulier le refroidissement cadavérique dans des pays à climat tempéré [1]. La méthode d'Henssge permet d'estimer au mieux l'heure de la mort dans une fourchette d'environ 5 h 30 ($\pm$ environ 3 heures) avec une probabilité de 95% [1,2]. Parmi les nombreuses autres méthodes testées, notamment biophysiques et biochimiques, aucune n'apparaît fiable en pratique [3].

L'apoptose est une forme spécifique de mort cellulaire associée à des aspects très caractéristiques sur le plan morphologique et biochimique : condensation de la chromatine et du cytoplasme, fragmentation nucléaire en corps apoptotiques, suivies de cassures de l'ADN par activation de certaines endonucléases [4]. Pendant les processus cadavériques sont couramment observées des modifications cellulaires à type d'autolyse et de putréfaction [5]. Une augmentation du taux d'apoptose a été observée dans des tissus traumatisés, sur des prélèvements post-mortem de peau et de cerveau [6,7]. Il n'est donc pas impossible que les processus cadavériques induisent une apoptose, les cellules étant brutalement soumises à un stress du fait d'un milieu anoxique. Afin de tester l'hypothèse d'une majoration du taux d'apoptose avec l'accroissement du délai post-mortem, nous avons appliqué la méthode Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) sur modèle animal pour étudier la relation entre le nombre de cellules apoptotiques de prélèvements de peau de rats et le délai post-mortem. La peau a été choisie comme site de prélèvement du fait de sa résistance dans la période post-mortem précoce et de modifications apoptotiques déjà décrites morphologiquement sur des prélèvements post-mortem [6].

Matériel et méthodes

Trente rats albinos (*Rattus norvegicus*) de souche Wistar masculins adultes ont été sacrifiés en respectant la législation internationale d'euthanasie des animaux de laboratoire.

Le protocole suivant a été suivi : ces animaux ont tous été maintenus à température ambiante constante (20°C) après leur sacrifice jusqu'à la fin des séries de prélèvements. Des échantillons cutanés de 2 cm ont été prélevés au niveau de la partie interne de la cuisse juste après le décès, ensuite toutes les trois heures jusqu'à la 24^e heure puis toutes les six heures jusqu'à la 48^e heure. Les prélèvements cutanés ont tous été effectués en peau saine, à distance de toute tache verte si cette dernière était éventuellement constatée. Chaque prélèvement a été immédiatement fixé dans du formaldéhyde à 10% pendant 24 heures, puis, après déshydratation inclus en paraffine et coupés au microtome selon des sections de 4 μ m.

Afin de détecter les cellules apoptotiques, la méthode TUNEL a été réalisée en utilisant le kit ApopTag ONCOR® (Q-Biogene, Illkirch, France). Cette méthode consiste en une détection des clivages de l'ADN induit par les caspases activées. Lors du clivage de l'ADN, les radicaux 3'OH sont libérés et reconnus par une transférase qui leur associe un dUTP

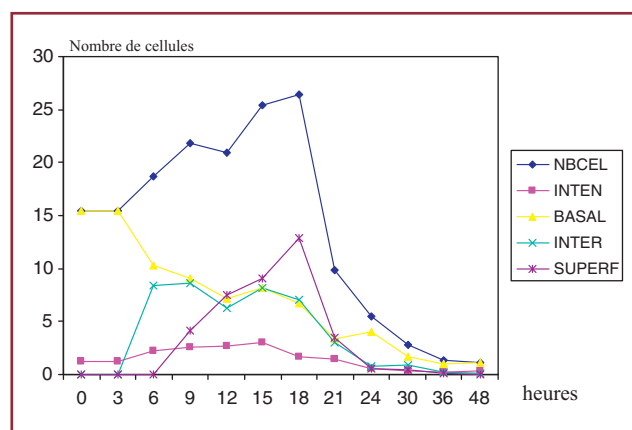


Figure 1. Nombre et intensité de marquage des cellules épidermiques en fonction de leur localisation et du délai post-mortem. *Number and intensity of epidermis apoptotic cells according to their localization and post-mortem interval.*

marqué par un fluorochrome ou biotinylé. Cette technique manquant de spécificité, une étude immunohistochimique a été réalisée en parallèle avec l'anticorps anti-caspase 9.

Concernant la technique TUNEL, l'enzyme de détection des cassures de l'ADN, la TdT a été placée sur chaque lame (54 μ l) pendant une heure à 37°C et en atmosphère humide. L'amplification s'est faite grâce à la peroxydase. La révélation a été effectuée grâce à la di-amino-benzidine (DAB). Pour obtenir un meilleur contraste, une contre-coloration à l'hématéine-éosine a été faite pendant 15 secondes. Dans chaque expérience ainsi standardisée, des témoins positifs et négatifs ont été utilisés. Les témoins négatifs ont été obtenus par l'omission de l'enzyme TdT. Des prélèvements de foie de rat, traités avec anti-FAS, ont été utilisés comme témoins positifs de la fragmentation de l'ADN.

Les cellules marquées par la technique TUNEL et par l'anticorps anti-caspase 9 ont été comptées sur toutes les lames sur trois champs contigus à fort grossissement ($\times 400$) en distinguant les cellules des différentes couches cutanées (basale, intermédiaire et superficielle).

L'intensité du marquage a été appréciée de façon semi-quantitative, en étant gradée de 0 à 3 :

- 0 = pas de marquage ;
- 1 = discret marquage du noyau ;
- 2 = marquage modéré du noyau ;
- 3 = intense marquage du noyau.

L'analyse a été faite en double insu par deux observateurs indépendants.

Pour chaque lame examinée (une par cas et par délai post-mortem), le nombre moyen de cellules marquées (quelle que soit l'intensité du marquage) par champ et pour chacune des trois couches épidermiques a été étudié.

L'étude statistique a été basée sur la base d'une régression linéaire multiple avec tests standard de Fisher et de Student. Le seuil de significativité était fixé à 5%. Le logiciel statistique utilisé était le SAS.

Résultats

Les données quantitatives relatives au nombre de cellules positives pour chaque couche de l'épiderme sont montrées dans le Tableau 1. Les mêmes résultats sont présentés sous forme d'un graphe sur la Fig. 1. L'intensité du marquage augmente depuis le moment du décès jusqu'à la 12^e heure

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/4128435>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/4128435>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)